



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Instituto de Biotecnología

**SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE GLICÓSIDOS DE FENILPROPANOIDEOS CON
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Q. JORGE ARTURO GONZÁLEZ RÍOS

TUTOR PRINCIPAL

Dr. EDMUNDO CASTILLO ROSALES – Instituto de Biotecnología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL:

Dr. AGUSTÍN LÓPEZ-MUNGUÍA CANALES – Instituto de Biotecnología
Dra. MARCELA AYALA ACEVES – Instituto de Biotecnología
Dr. JAIME ESCALANTE GARCÍA – Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Este trabajo esta dedicado a mi familia (Patricia, Paty, Oscar, Selene y Emiliano) quienes han sido siempre una gran inspiración y motivación.

Con todo mi cariño y aprecio ...

Este proyecto se desarrolló en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Edmundo Castillo Rosales, en el laboratorio del Dr. Agustín López-Munguía Canales.

Durante los estudios de Maestría se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de registro 313184. Al término de éste se contó con un apoyo por parte del Sistema Nacional de Investigadores otorgado por el Dr. Agustín López-Munguía.

Agradecimientos

Al Dr. Edmundo Castillo, quien me brindó la oportunidad de participar en este maravilloso proyecto.

Al Dr. Agustín López de quien agradezco el apoyo, la confianza, las críticas, y porque no, las Charlas musicales, y con Científicos.

A los otros miembros de mi comité sinodal, la Dra. Marcela Ayala y el Dr. Jaime Escalante, quienes con sus comentarios y aportaciones contribuyeron a la realización de este proyecto.

A los miembros de mi comité sinodal: la Dra. Leonor Pérez, el Dr. Adelfo Escalante, el Dr. José Pedraza, el Dr. Humberto García y la Dra. Laura Álvarez quienes con sus revisiones y comentarios, ofrecieron a este trabajo un nutrida retroalimentación.

Al Dr. Alfonso Miranda, quien ayudó a realizar los estudios de RMN y masas de este trabajo, además de se un gran apoyo en la elucidación estructural.

Al Dr. Tomás López, quien nos facilitó el uso del equipo de fluorescencia del laboratorio Arias-López para estudio de actividad antioxidante.

Al Dr. José Pedraza, quien nos facilitó las instalaciones de su laboratorio en la Facultad de Química de la UNAM, y al Dr. Omar Medina quien auxilió al montaje de los experimentos de actividad antioxidante.

A la Dra. Ana Martínez, a la C.D. Yanet Romero y al Q. Miguel Reina quienes realizaron estudios teóricos sobre el mecanismo de la actividad antioxidante.

Más agradecimientos.

De manera especial quisiera agradecer al Dr. Agustín López, quien con su amabilidad, capacidad y sencillez, es siempre una gran inspiración. Con quien además disfruto platicar sobre música, política y ciencia.

Al Dr. Edmundo Castillo por permitirse ser su hijo académico. Donde la libertad, confianza y paciencia fueron un gran aprendizaje para mi.

A los ALMs, como la M. Male quien con su gran honestidad hace del laboratorio un ambiente agradable. Siempre eres un gran apoyo. Ojalá tu pensamiento progresista permeara hacia todos. A doña Au (Aucita), un miembro esencial en este laboratorio, no solo por su trabajo profesional, sino por el humano. A los demás miembros del laboratorio de ALM, y los que ya no están. Agradezco a Fernando González, Clarita Olvera, Judith Uribe, Nadia Maturano, Victor Manso, Alfonso Miranda, Ángela Escudero, Jaime Porras, Oscar Vázquez, Enrique Raga, Francisco Vera, Helena Méndez y Alma Tremari (q.p.d) por hacer del laboratorio un lugar especial de trabajo. En especial a Domingo Rivera con quien disfruto platicar.

A todos mis compañeros de Maestría, quienes la pasamos genial. En especial extrañaré gente como Paulina, Daniel, Armando, Karina, Fernando, Carol, José e Itzia. En especial a Arlen Peña, Irene Palacios, Miguel Silva y Grecia Fuentes con quienes disfrute estos tres años. Con gran cariño para Grecia, con quien he pasado maravillosos momentos. A Violeta Matus con quien siempre la pasé genial. Este espacio-tiempo no habría sido igual sin ti “bombín”.

A otros amigos como Esteban Peguero y Adriana Vega con quienes siempre pase divertidas tardes y noches en una carne asada. A Karla Cedano quien me abrió las puertas de Inno-Ba, donde conocí gente maravillosa, y un ambiente de trabajo inigualable. A los miembros de Más Ciencias por México (Ared, Pepe Toño, Ale Medina, Ale Zayas, Emiliano y Violeta) con quienes he pasado muy buenos momentos en el programa de Charlas con Científicos estos casi dos años. A mi muy estimada Gina, quien hace de las tardes nubladas, días soleados.

Finalmente las personas más importantes en mi vida, mi familia, quienes han sido siempre de gran apoyo durante todo este tiempo. En especial mi madre, que es siempre un motor de cambio, quien me motiva a ser mejor. A mi hermana Paty quien su nobleza y solidaridad he aprendido a ser mejor cada día. A mi hermano Oscar quien con su disciplina y constancia me muestra que es posible lograr todo. A Selene quien con su carácter y deseo de progreso siempre me hace recordar a mi mamá (je je), pero además, su compromiso por los demás me muestra que nuestra sociedad puede mejorar. Y a Emiliano quien durante estos tres años ha sido un gran apoyo, alguien que me ha ayudado a crecer enormemente, y con quien estaré en deuda eternamente.

Gracias de corazón a todos ustedes..

Índice

Resumen	11
1. Introducción.....	12
2. Antecedentes.....	14
2.1 Antioxidantes y estrés oxidativo.....	14
2.2 Compuestos fenólicos: fuentes de obtención naturales y función antioxidante	16
2.2.1 Los ácidos benzoicos y fenilpropiónicos.....	19
2.3 Actividad antioxidante en carbohidratos.....	20
2.4 Los PPGs y su actividad antioxidante.....	21
2.4.1 Métodos de síntesis química de PPGs	24
2.4.2 Síntesis enzimática de PPGs	27
2.5 Síntesis enzimática de glicósidos.....	28
2.6 Esterificación enzimática catalizada por lipasas.....	32
2.7 Ensayos para la evaluación de la capacidad antioxidante	34
3. Justificación	37
4. Hipótesis	37
5. Objetivos	38
5.1 Objetivo general	38
5.1.1 Objetivos específicos	38
6. Estrategia experimental.....	39
7. Materiales y métodos.....	40
7.1 Reactivos utilizados	40
7.2 Expresión y purificación de β -glucosidasa de <i>T. maritima</i>	40
7.2.1 Ensayo de actividad de β -glucosidasa de <i>T. maritima</i>	41
7.3 Síntesis del α -glucósido de alcohol homovainillínico	41
7.4 Síntesis del β -glucósido de alcohol homovainillínico	42
7.5 Purificación de glucósidos por cromatografía flash	42
7.6 Síntesis de ácidos dihidroferúlico y dihidrocafeico	43
7.7 Síntesis de PPGs empleando lipasa B de <i>C. antarctica</i> (CalB).....	44
7.7.1 Purificación de PPGs	44
7.8 Cuantificación de productos de glucosilación y esterificación	45
7.9 Análisis estructural de compuestos sintetizados.....	45
7.10 Ensayo de actividad atrapadora de radicales libres usando el 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH)	45
7.11 Análisis de confórmeros estructurales	46
8. Resultados y discusión	47
8.1 Obtención de proteínas para procedimientos enzimáticos.....	47
8.1.1 Purificación de β -glucosidasa de <i>T. maritima</i>	47
8.2 Síntesis del α -glucósido del alcohol homovainillínico [2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil- α -D-glucopiranosido].....	48
8.2.1 Purificación del α -glucósido del alcohol homovainillínico.....	50
8.3 Síntesis del β -glucósido de alcohol homovainillínico 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil- β -D-glucopiranosido	53
8.3.1 Purificación del β -glucósido de alcohol homovainillínico	54
8.4 Análisis estructural de glucósidos.....	55

8.5 Síntesis de PPGs.....	58
8.5.1 Purificación de PPGs	61
8.5.1.1 Análisis estructural de PPGs.....	62
8.6 Actividad antioxidante de glucósidos de alcohol homovainillínico y PPGs sobre el radical DPPH	65
8.6.1 Efecto de la velocidad de atrapamiento del radical DPPH por α y β compuestos.	70
8.7 Análisis de conformeros estructurales de glucósidos	74
9. Conclusiones.....	79
10. Perspectivas.....	80
11. Bibliografía	81
12. Anexos.....	86

Índice de figuras

Figura 1: Estructura del verbascósido (PPG).....	12
Figura 2.- Reacción de peroxidación lipídica vía radicales libres.....	16
Figura 3.- Ruta de biosíntesis para derivados de fenilpropanoides.	18
Figura 4.- Principales familias de compuestos fenólicos presentes en plantas.	19
Figura 5.- Principales fenilpropanoides y ácidos cinámicos abundantes en plantas.	20
Figura 6.- Estructura de algunos glicósidos de fenilpropanoides identificados en especies vegetales.	23
Figura 7.- Principales métodos de síntesis química de glicósidos.	26
Figura 8.- Ruta de síntesis química para el Grayanosido A.	27
Figura 9.- Estrategia de síntesis enzimática para PPGs en dos etapas.	28
Figura 10.- Mecanismos de glicosilación presentes en glicosidasas.	30
Figura 11.- Mecanismos de actividad presentes en CGTasas.	31
Figura 12.- Reacción de atrapamiento del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.....	34
Figura 13.- Reacción de generación de radical peroxilo y oxidación de fluoresceína en ensayo ORAC.....	35
Figura 14.- Reacción de generación del 2-hidroxitereftalato.	36
Figura 15.- Resultados de purificación de β -glucosidasa de <i>T. maritima</i> A: SDS-PAGE y B: Actividad de β -glucosidasa de fracciones durante purificación.	48
Figura 16.- Reacciones y enzimas involucradas en la síntesis del α -glucósido.....	49

Figura 17.- TLC de reacciones para síntesis del 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil- α -D-glucopiranosido.	50
Figura 18.- Cromatograma de purificación de productos de α -glucosilación.....	51
Figura 19.- Cromatograma de purificación del 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil- α -D-glucopiranosido por fase reversa.	52
Figura 20.- Reacción catalizada por la enzima b-glucosidasa para la síntesis del β -glucósido.....	53
Figura 21.- TLC de la reacción de síntesis de 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil- β -D-glucopiranosido.	54
Figura 22.- Cromatograma de purificación del 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil- β -D-glucopiranosido y placa de fracciones colectadas.....	55
Figura 23.- Espectro de RMN de ^1H del 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil- β -D-glucopiranosido.	56
Figura 24.- Espectros de RMN ^{13}C del 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil- β -D-glucopiranosido.	57
Figura 25. Espectros de RMN de ^1H del 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil- α -D-glucopiranosido.....	58
Figura 26.- síntesis de PPGs mediante reacciones la esterificación catalizada por CalB.....	59
Figura 27.- Placas de TLC de reacciones de esterificación entre glucósidos y ácidos fenil propanoides utilizando CalB como biocatalizador.....	60
Figura 28.- Cromatograma de purificación del 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil-6-O-dihidroferuloil- β -D-glucopiranosido.	62
Figura 29. Espectro gHSQC del PPG AHV- β -DHF.	63
Figura 30. Espectro gCOSY del PPG AHV- β -DHF.	64
Figura 31. Espectro gHSQC del PPG AHV- β -DHF.	64
Figura 32.- Curva de atrapamiento del radical DPPH vs concentración.....	66
Figura 33.- Valores de EC_{50} obtenidos para el atrapamiento de radical DPPH.....	68
Figura 34.- Gráfico de velocidad inicial de atrapamiento a distintas concentraciones de los compuestos sintetizados.	72
Figura 35.- Constantes de velocidad de atrapamiento del radical DPPH.	73
Figura 36.- Átomos considerados en análisis estructural de los confórmers.....	75
Figura 37.- Confórmers de Glu- α -AHV y gráfico de su relación DRI - ángulo dihedral.	76
Figura 38.- Confórmers de Glu- β -AHV y gráfico de su relación DRI - ángulo dihedral.....	76
Figura 39.- Confórmers de Gal- β -AHV y gráfico de su relación DRI - ángulo dihedral.	77
Figura 44.- Cinéticas de atrapamiento del radical DPPH.....	91

Índice de esquemas

Esquema 1.- Reacciones tipo Fenton y Haber-Weiss para la generación de radicales hidroxilo.	15
Esquema 2.- Mecanismo SPLET de actividad antioxidante propuesto para PPGs.	24

Índice de tablas

Tabla 1.- Nombre y tipo de las principales especies reactivas.	15
Tabla 2.- PPGs sintetizados y conversiones obtenidas a partir de la esterificación de glucósidos con CalB.	61
Tabla 3.- Actividad antioxidante sobre DPPH de algunos PPGs descritos previamente.	70

Abreviaturas

PPGs:	glicósidos de fenilpropanoides
AHV:	alcohol homovainillínico
AF:	ácido ferúlico
AC:	ácido cafeico
ADHF:	ácido dihidroferúlico
ADHC:	ácido dihidrocafeico
HT:	hidroxitirosol
DPPH:	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
<i>A. niger</i> :	<i>Aspergillus niger</i>
CalB:	lipasa B de <i>Candida antarctica</i>
<i>T. maritima</i> :	<i>Thermotoga maritima</i>
Glu- α -AHV:	α -glucósido de alcohol homovainillínico [2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil- α -D-glucopiranosido]
Glu- β -AHV:	β -glucósido de alcohol homovainillínico [2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil- β -D-glucopiranosido]
PPG- β -DHC:	PPG 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil-6-O-dihidrocafeil- β -D-glucopiranosido
PPG- β -DHF:	PPG 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil-6-O-dihidroferuloil- β -D-glucopiranosido
PPG- α -DHC:	PPG 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil-6-O-dihidrocafeil- α -D-glucopiranosido
PPG- α -DHF:	PPG 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil-6-O-dihidroferuloil- α -D-glucopiranosido
ppm:	partes por millón
Pd-C:	paladio sobre carbono
HPLC:	cromatografía de líquidos de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography)
kDa:	kilo daltones
psi:	libras por pulgada cuadrada.
2M2B:	2-metil-2-butanol
δ :	desplazamiento químico
TLC:	cromatografía de capa fina (Thin Layer Chromatography)
CD ₃ OD:	metanol deuterado.
FAB:	bombardeo atómico rápido (Fast Atom Bombardment)
AV:	alcohol vainillínico
min:	minutos
seg:	segundos
Glu:	glucosa
Gal:	galactosa
Rha:	ramnosa
Fuc:	fucosa

Resumen

En este proyecto se desarrolló una metodología para la síntesis enzimática de glicósidos de fenilpropanoides (PPGs) con actividad antioxidante. Para su síntesis se emplearon el alcohol homovainillínico, los ácidos dihidroferúlico y dihidrocafeico y la D-glucosa. La estrategia sintética utilizó dos etapas: la primera consistió de una glicosilación catalizada por las enzimas β -glucosidasa de *Thermotoga maritima* y CGTasa de *Thermoanaerobacter sp.*; posteriormente una etapa de esterificación catalizada por la lipasa B de *Candida antactica* inmovilizada. Esta estrategia permitió la generación de PPGs con glucosa en sus formas anoméricas α y β , así como la incorporación de distintos ácidos fenilpropanoides. En la síntesis de los glucósidos de alcohol homovainillínico se obtuvieron conversiones entre 9-10 %, mientras que en la etapa de esterificación de los glucósidos se observaron conversiones entre 23-43%. Una vez sintetizados, se evaluó su capacidad antioxidante utilizando el radical 2,2-difenilpicrilhidrazilo (DPPH), donde se encontró que la glicosilación de alcohol homovainillínico mejoró su actividad antioxidante en comparación con su forma aglicona. Se encontró además un efecto originado por la configuración del azúcar presente mostrando valores de EC_{50} menores para el Glu- β -AHV ($44.03 \pm 0.472 \mu\text{M}$) y el Gal- β -AHV ($44.47 \pm 0.94 \mu\text{M}$) y mayores para el Glu- α -AHV ($49.64 \pm 1.79 \mu\text{M}$). Sobre los PPGs generados, encontramos que las moléculas PPG- β -ADHC ($11.73 \pm 0.29 \mu\text{M}$) y PPG- α -ADHC ($13.61 \pm 2.08 \mu\text{M}$) tuvieron la mejor actividad antioxidante de todos los compuestos evaluados, la cual fue incluso superior a la descrita para el ácido ascórbico usado como referencia. Además, se estableció la velocidad de atrapamiento de las moléculas sintetizadas hacia el radical DPPH, observándose un comportamiento similar al encontrado en la evaluación del EC_{50} . Finalmente, se realizó un análisis de conformeros de los glucósidos generados y se observó que los β -glicósidos presentan características geométricas que permiten diferenciarlos con respecto a los α -glicósidos en tanto que moléculas antioxidantes.

I. Introducción

Los glicósidos de fenilpropanoides (PPGs) son compuestos naturales presentes en una gran variedad de plantas. Estas moléculas están constituidas por compuestos fenólicos de tipo C6-C3, los cuales se encuentran asociados a uno o varios azúcares mediante enlaces tipo éster y enlaces glicosídico (Figura 1).

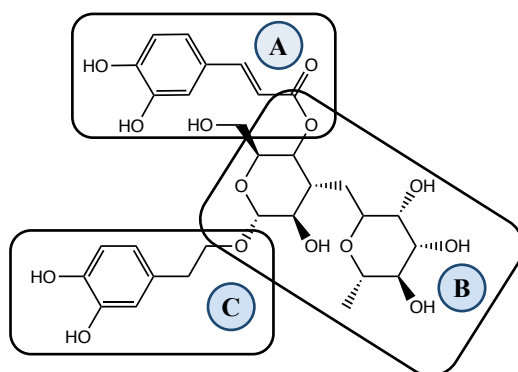


Figura 1: Estructura del verbascósido (PPG). A: cafeoil (fenilpropanoide), fenólico del tipo C6-C3; B: glucosa y ramnosa (azúcar); C: hidroxitirosil (arilalquilo), fenólico tipo C6-C3.

En los últimos años se ha resaltado el potencial de aplicaciones farmacéuticas que presentan los PPGs, ya sea como antioxidantes, antivirales, antitumorales, fungicidas y agentes inmunomoduladores. En la actualidad se distribuye comercialmente solo uno de ellos, el verbascósido bajo el nombre de Planox-L, del cual se han descrito funciones como anti-inflamatorio y antimicrobiano (Funes L. *et al.*, 2010).

En los PPGs la actividad antioxidante es propiedad comúnmente evaluada, la cual está íntimamente relacionada a la presencia de compuestos fenólicos en su estructura. Se sabe que el número y tipo de hidroxilos fenólicos está relacionado a su actividad. Así un mayor número de hidroxilos fenólicos se relaciona con una mejor actividad antioxidante.

Es importante mencionar que la presencia de carbohidratos en numerosas moléculas se ha asociado a la modificación de sus propiedades farmacocinéticas, a la protección de grupos reactivos, al aumento en la estabilidad y a la modificación de propiedades fisicoquímicas como su solubilidad y su polaridad. Una función adicional de los azúcares en la estructura de los PPGs se

relaciona con una función de tipo conectora entre los diferentes grupos que los constituyen. Sin embargo, cabe señalar que estudios recientes sugieren que los carbohidratos son también interesantes antioxidantes (Stoyanova S. *et al.*, 2011), haciendo relevante su estudio en relación con su asociación a otro tipo de moléculas. Es claro, que contar con moléculas que integren todas estas propiedades resulta interesante desde un punto de vista tecnológico y/o industrial.

La principal fuente de obtención de los PPGs son los extractos vegetales en los que su abundancia es menor al 5%. Por lo que en la búsqueda de estrategias para su obtención de PPGs, se han desarrollado métodos de síntesis química tradicional que permiten su obtención con rendimientos aceptables (20-25%). Sin embargo, éstas presentan múltiples desventajas como: numerosas etapas de protección y desprotección de grupos reactivos, generación de subproductos, y el uso de reactivos y catalizadores tóxicos, lo cual en su conjunto presentan considerables limitaciones para su implementación.

Las enzimas son catalizadores altamente selectivos, que han resultado ser una buena alternativa para el desarrollo de metodologías de síntesis. Entre sus principales ventajas se encuentran el empleo de condiciones suaves de reacción ($T = \text{amb}$, $P = 1 \text{ atm}$), disminución de etapas de protección y desprotección de grupos funcionales, una alta quimio-, enantio- y estereoselectividad en su actividad, así como la facilidad de recuperar al biocatalizador. En este sentido, el desarrollo de una metodología de síntesis enzimática de PPGs resulta ser una muy atractiva herramienta para la construcción de novedosas moléculas como este tipo de estructura.

Bajo esta perspectiva, este trabajo contempla el desarrollo de un método alternativo en la síntesis de PPGs aplicando las ventajas que ofrecen los métodos enzimáticos.

2. Antecedentes

2.1 Antioxidantes y estrés oxidativo

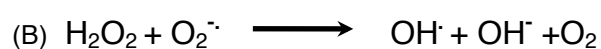
El oxígeno es un elemento esencial para la vida de los organismos aeróbicos, estos lo requieren para llevar a cabo su actividad catabólica. En la mitocondria la molécula de oxígeno es el aceptor final de los electrones transferidos desde las coenzimas de óxido reducción a través de la cadena de transporte de electrones con la consecuente formación de agua y la generación de energía. Si bien este proceso se encuentra altamente controlado, bajo determinadas condiciones este equilibrio puede alterarse dando origen a especies parcialmente reducidas de oxígeno: las especies reactivas del oxígeno (ROS) y los radicales libres (RL). Estas especies reactivas que actúan como agentes oxidantes, pueden provocar daños acumulativos en moléculas fundamentales para el funcionamiento celular, tales como proteínas, lípidos y ADN. De manera natural el organismo posee mecanismos de defensa para contrarrestar la presencia de especies oxidantes, sin embargo, en algunos casos estos mecanismos de protección llegan a ser sobrepasados por la excesiva generación de ROS y RL. Este desequilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes se conoce como estrés oxidativo, y se ha asociado a numerosas enfermedades, así como al proceso normal de envejecimiento [Lee R. *et al.*, 2004].

Una especie oxidante es definida como aquella capaz de aceptar electrones generando un desequilibrio electrónico en moléculas vecinas. Los radicales libres son especies oxidantes que poseen uno o más electrones desapareados, lo cual los hace altamente inestables y reactivos. Para estabilizarse, estos radicales reaccionan rápidamente con moléculas vecinas mediante reacciones de oxidación-reducción. Es importante precisar que el término especies reactivas es un término colectivo que incluye radicales libres y ciertas especies no radicales (Tabla I), las cuales pueden dar origen fácilmente a especies radicales (Esquema 1).

Tabla 1.- Nombre y tipo de las principales especies reactivas.

Radicales	
Nombre	Fórmula
Hidroxilo	$\cdot\text{OH}$
Alcoxilo	$\text{RO}\cdot$
Hidroperoxilo	$\text{HOO}\cdot$
Superóxido	$\text{O}_2\cdot^-$
Peroxilo	$\text{ROO}\cdot$
Óxido nítrico	$\text{NO}\cdot$
Dióxido de nitrógeno	$\text{NO}_2\cdot$
No radicales	
Nombre	Fórmula
Peróxidos orgánicos	ROOR'
Oxígeno molecular	O_2
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Ácido hipocloroso	HClO
Ácido nitroso	HNO_2
Catión nitrilo	NO_2^+
Peroxinitrito	ONOO
Ácido peroxinitroso	ONOOH
Ozono	O_3

Es importante mencionar que aunque las condiciones ambientales favorecen la formación de especies reactivas y radicales libres, de manera natural los procesos fisiológicos generan *per se* cierta tasa de estas sustancias oxidantes [Lee R. *et al.*, 2004]. En efecto, durante la cadena de transporte de electrones se pueden generar especies como el radical superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). Este último es una de las especies más reactivas que se producen a través de reacciones tipo Fenton, catalizadas por metales de transición, aunque también pueden ser generadas por reacciones de tipo Haber-Weiss (Esquema 1).



Esquema 1.- Reacciones tipo Fenton (A) y Haber-Weiss (B) para la generación de radicales hidroxilo.

Otra fuente importante de generación de especies oxidantes ocurre mediante la peroxidación lipídica, en la cual los radicales libres y otra especies reactivas como el ión hidroxilo son capaces

de extraer un átomo de hidrógeno de un ácido graso saturado generando un radical lipídico ($R\cdot$), el cual a su vez puede reaccionar con O_2 dando lugar a un radical peroxilo ($ROO\cdot$) (Figura 2).

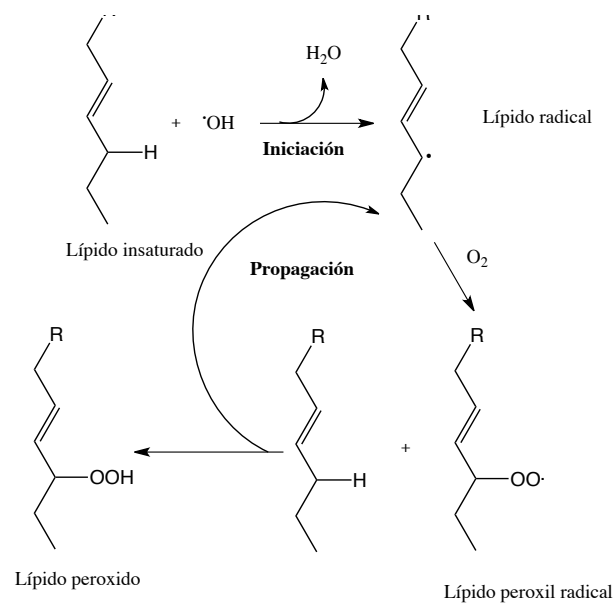


Figura 2.- Reacción de peroxidación lipídica vía radicales libres.

Para contrarrestar los efectos nocivos de las especies reactivas los organismos han desarrollado sus propios mecanismos de defensa antioxidante, integrados por sistemas enzimáticos y no enzimáticos. El término antioxidante es referido a una sustancia que presente a una concentración baja es capaz de retrasar o prevenir la oxidación de sustratos.

Entre los sistemas de reducción de especies reactivas enzimáticos se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), superóxido reductasa (SOR), catalasa, mieloperoxidasas, peroxirredoxinas, glutatión peroxidada, entre otras. Por otro lado entre los no enzimáticos, existen moléculas que cumplen con esta función antioxidante como el NADH y el glutatión, las cuales ofrecen poder reductor para estabilizar especies reactivas. De hecho, en la naturaleza existe un gran número de sustancias con potencial actividad antioxidante entre ellas vitaminas hidrosolubles y liposolubles, carotenoides y una gran variedad de compuestos fenólicos [Lampe J., 1999; Prior R. *et al.*, 2003], cuya actividad antioxidante y potenciales efectos beneficiosos están siendo investigados.

2.2 Compuestos fenólicos: fuentes de obtención naturales y función antioxidante

Los compuestos fenólicos constituyen en las plantas uno de las principales grupos de metabolitos secundarios. Se sabe que en estos organismos desempeñan funciones fisiológicas durante su desarrollo y reproducción, aunque también se ha descrito que participan en procesos defensivos frente a patógenos y depredadores, además de actuar como filtros solares contra radiación ultravioleta (Vogt T., 2009). Los compuestos fenólicos presentan una estructura de anillo benceno hidroxilado como elemento común en su estructura, y sobre la cual se pueden incluir grupos funcionales como ésteres, metil ésteres, éteres, glicósidos, etc. [Martínez-Valverde *et al.*, 2000]. La presencia de estos grupos funcionales generan una gran variedad de compuestos fenólicos con importante actividad antioxidante, entre los que se encuentran alcoholes, difenoles, ácidos fenólicos, ácidos cinámicos, cumarinas, flavonoides, flavonas e isoflavonas, flavonoles, flavononas (Maestro-Durán R. & Borja Padilla R., 1993).

Los compuestos fenólicos están presentes en todo el reino vegetal y sus cantidades y tipos varían en función de la especie vegetal y variedad, así como la parte de la planta considerada (frutos, semillas, hojas, tallos, etc.), las horas de exposición solar, el grado de madurez y las condiciones ambientales. Los compuestos fenólicos habitualmente se presentan conjugados con azúcares como la glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, xilosa, o los ácidos glucurónico y galacturónico. Pero también pueden unirse a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas y lípidos. Se considera que estas asociaciones estructurales contribuyen en buena manera a mejorar su estabilidad y en consecuencia a mejorar su actividad.

La actividad antioxidante en los compuestos fenólicos se atribuye principalmente a su facilidad para ceder átomos de hidrógeno del grupo hidroxilo aromático a un radical libre, además de permitir la deslocalización de cargas en el sistema de dobles enlaces del anillo aromático. En numerosos reportes se ha establecido que el número y tipo de grupos hidroxilo presentes en compuestos fenólicos son determinantes para su actividad antioxidante (Heilmann J. *et al.*, 2000; Wang P.F. *et al.*, 1996; Shi Y. *et al.*, 1999; Siquet P. *et al.*, 2006; Xiong, Q. *et al.*, 1998; Xiong, Q. *et al.*, 1996). Estos compuestos presentan además una estructura química ideal para captar iones metálicos (principalmente hierro y cobre). De hecho, se ha propuesto que este proceso ocurre mediante la quelación de metales de tipo Fe^{2+} (Li J. *et al.*, 1997), favoreciendo así eventos de acomplejación por parte de los grupos hidroxilo fenólicos y evitando así la formación de radicales libres a través de reacciones tipo Fenton [Rice-Evans *et al.*, 1997]. Es importante señalar que además de cumplir una función como antioxidantes, se sabe que este tipo de moléculas también

poseen actividades biológicas beneficiosas diversas, entre las que se encuentran efectos vasodilatadores, anticarcinogénicos, antiinflamatorios, bactericidas, estimuladores de la respuesta inmune, antialérgicos, antivirales e inhibidores de enzimas pro-oxidantes.

Un gran número de compuestos fenólicos diversos se han identificado en plantas. Se sabe además, que el origen metabólico de estos es la ruta del ácido shikímico (Ácido (3R,4S,5R)-3,4,5-trihidroxi-1-ciclohexen-1-carboxílico) y la de los fenilpropanoides [Robards K. *et al.*, 1999] (Figura 3).

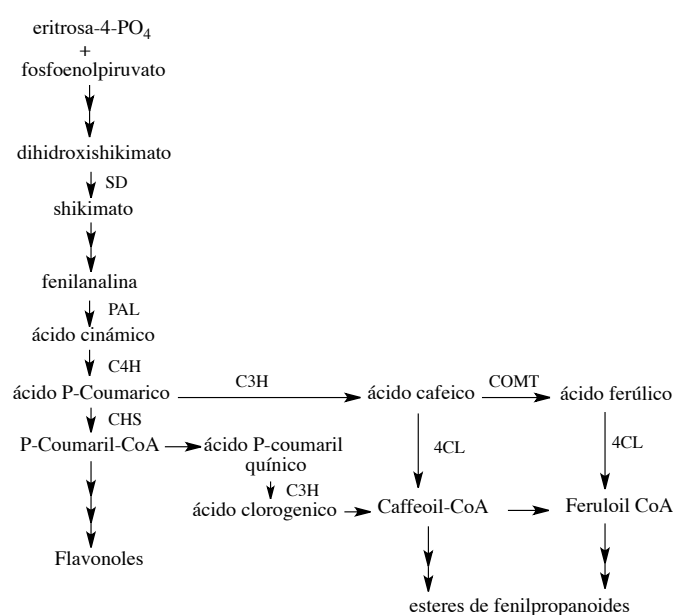


Figura 3.- Ruta de biosíntesis para derivados de fenilpropanoides. SD: ácido shikímico deshidrogenasa; PAL: fenilalanina amonio liasa; C4H: ácido cinámico 4-hidroxilasa; CHS: chalcona sintasa; C3H: p-cumarato 3-hidroxilasa; 4CL: 4-cumarato-CoA ligasa; COMT: cafeato O-metiltransferasa (Modificado de Zhao S. *et al.*, 2012).

Existen distintas familias de compuestos fenólicos, las cuales se caracterizan por el número de átomos de carbono de su esqueleto molecular. Entre los que se encuentran los ácidos fenólicos formados por el grupo de los ácidos cinámicos (C6-C3) y los ácidos benzoicos (C6-C1 o C6-C2); flavonoides (C6-C3-C6), proantocianidinas o taninos condensados ((C6-C3-C6)_n); estilbenos (C6-C2-C6); cumarinas (C6-C3), lignanos (C6-C3-C3-C6) y ligninas ((C6-C3)_n) (Figura 4).

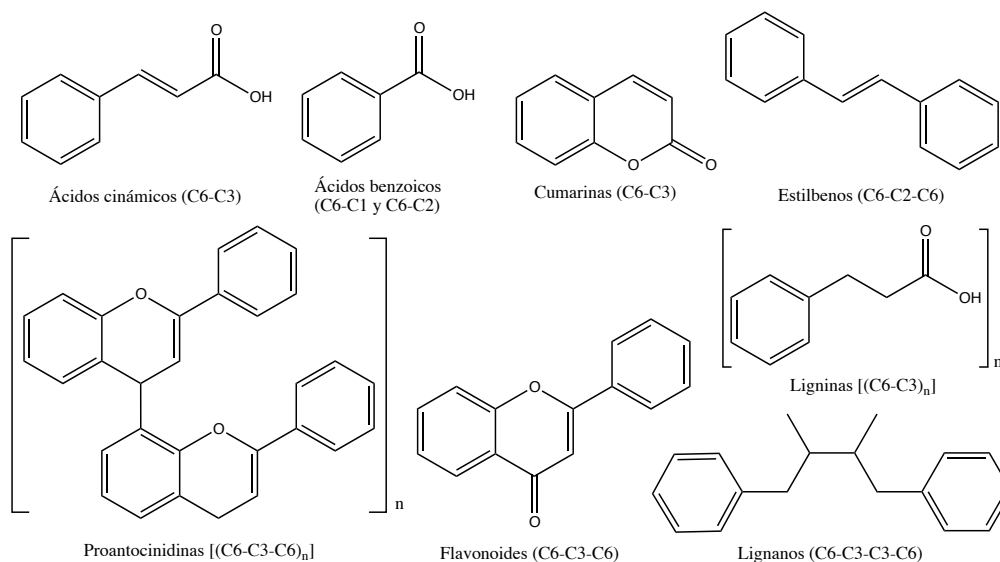
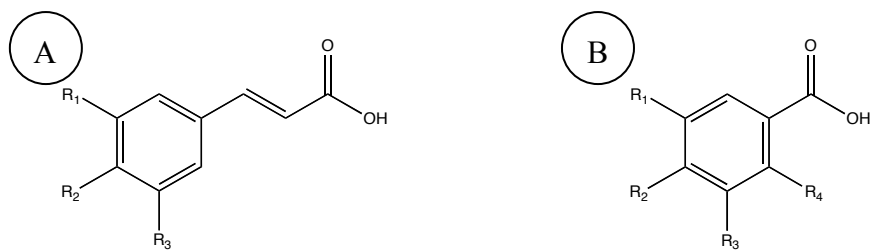


Figura 4.- Principales familias de compuestos fenólicos presentes en plantas.

2.2.1 Los ácidos benzoicos y fenilpropiónicos

Los ácidos benzoicos o derivados del ácido hidroxibenzoico poseen una estructura básica C6-C1. Entre los principales ácidos benzoicos se encuentran los ácidos gálico, salicílico, p-hidroxibenzoico, protocatéuico, vanílico y siringico, estos cuatro últimos son abundantes ya que forman parte de las ligninas (Figura 5). Estos ácidos se presentan en general de forma conjugada formando dímeros (ácido elágico), trímeros (ácido tergálico) o tetrameros (ácido galágico).

Entre los compuestos fenólicos de tipo fenilpropanoide más abundantes en plantas se encuentran el ácido cafeico [Manach C. *et al.*, 2004]; y en menor proporción el ácido ferúlico, ambos presentan una amplia distribución en especies vegetales. El ácido cafeico y sus derivados se encuentran principalmente formando ácidos clorogénicos, los cuales son producto de la esterificación entre los ácidos cafeico y quínico. Por su parte, el ácido ferúlico se encuentra generalmente formando enlaces éster con la hemicelulosa de la fibra dietética. Cabe destacar que tanto el ácido ferúlico, como el cafeico pertenecen a la familia de los ácidos fenilpropanoides (o ácidos cumáricos), los cuales presentan un esqueleto molecular tipo C3-C6 (Figura 5).



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃
Á. ferulico	OCH ₃	OH	H
Á. cafeico	OH	OH	H
Á. sinápico	OCH ₃	OH	OCH ₃
Á. <i>p</i> -cumarico	H	OH	H

Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Á. salicílico	H	H	H	OH
Á. gálico	OH	OH	OH	H
Á. <i>p</i> -hidroxibenzoico	H	OH	H	H
Á. protocatécuico	H	OH	OH	H
Á. vanílico	H	OH	OCH ₃	H
Á. siringico	OCH ₃	OH	OCH ₃	H

Figura 5.- Principales fenilpropanoides (A) y ácidos cinámicos (B) abundantes en plantas. Principales compuestos de la familia de los ácidos fenólicos con estructura tipo C6-C3 (A) y C6-C1 (B).

2.3 Actividad antioxidante en carbohidratos

Los carbohidratos son biomoléculas con una amplia y diversa distribución en seres vivos, son moléculas de gran relevancia en procesos biológicos tales como metabolismo energético, señalización, función estructural, entre otras. En la actualidad la actividad antioxidante de estas moléculas ha estado tomando gran importancia, ya que se ha demostrado que moléculas como glucosa, fructosa, sacarosa, esteviosidos, inulina y levana presentan una mejor actividad antioxidante hacia radicales hidroxilo y superóxido que el manitol (Stoyanova S. *et al.*, 2011). Por consiguiente existe el interés en estudiar la función de los carbohidratos como moléculas antioxidantes (Chen X. *et al.*, 2013; Wu Q. *et al.*, 2010; Jia X. *et al.*, 2013) y a discernir cual es la naturaleza y origen de esta actividad.

Estructuralmente los carbohidratos son moléculas polihidroxiladas de tipo aldehído o cetona. Estos grupos son químicamente susceptibles a oxidación y sus propiedades reductoras son una característica normalmente evaluada en procedimientos de bioquímica común tales como las pruebas de Benedict, Tollens y Fehling. En un estudio reciente ha propuesto que el posible mecanismo mediante el cual los carbohidratos actúan como antioxidante sobre radicales hidroxilo ocurre a través de la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT). Este estudio propone que los átomos de hidrógeno de carbonos hidroxilados son energéticamente más

susceptibles a disociarse que los unidos a un átomo de oxígeno (Hernández-Marín E. & Martínez A., 2012). La inclusión de los carbohidratos a un nuevo grupo como moléculas antioxidantes, hace interesante su estudio sobre los efectos ocasionados sobre otro tipo de moléculas como glucósidos y algunas otras donde puedan ser encontrados como los glicósidos de fenilpropanoides.

Otro efecto importante que se presenta en carbohidratos, es el llamado efecto anomérico. Este efecto se caracteriza por proporcionar a moléculas como los carbohidratos una configuración (estereoquímica) particular en función de los grupos presentes sobre el carbono anomérico del azúcar. Algunas de características que influyen sobre este efecto son: contribuciones estéricas y conformacionales de la molécula, así como propiedades electrónicas de los átomos que la componen. Este tipo de efecto suele tener consecuencias importantes sobre la energía, estructura y comportamiento cinético de las moléculas (Tvaroska I. & Bleha T., 1989).

2.4 Los PPGs y su actividad antioxidante

Los PPGs son compuestos estrechamente asociados a las rutas biosintéticas de compuestos fenólicos presentes en plantas. Algunas variedades vegetales de las que han sido aislados son *Callicarpa dichotoma* (temprano amatista), *Lippia triphylla* (cedrón), *Rhodiola rosea* (raíz de oro), *Eleutherococcus senticosus* (ginsen siberiano), *Syringa vulgaris* (lila), *Echinacea purpurea* (equinácea), *Melissa officinalis* (citronela) y *Silybum marianus* (cardo mariano) (Kurkin V. A., 2003). Actualmente los PPGs se estudian con gran interés debido a su amplio potencial farmacológico, ya que una gran número de actividades terapéuticas como antitumorales, antivirales, anti-inflamatorios, antibacteriales, anti-ateroescleróticos, anti-agregadores de plaquetas, anti-hipertensivos, relajantes, analgésicos, hepatoprotectores, inmunosupresores, preventivos de la neurodegeneración, atrapadores de radicales libres, reparadores de daño oxidativo sobre DNA han sido relacionadas a estas moléculas, las cuales están presentes en plantas medicinales (Pan X. *et al.*, 2003; Kurkin V., 2003)

Los PPGs puede ser estructuralmente sencillos cuando se observa que están formados únicamente por tres moléculas; dos compuestos fenólicos del tipo C6-C3, los cuales también es posible encontrar en configuración C6-C2, y un núcleo de carbohidrato. Estas moléculas están unidas mediante un enlace glicosídico y otro de tipo éster, ambos sobre la molécula de

carbohidrato. En estos compuestos la presencia de carbohidratos permite modular propiedades como solubilidad, reactividad y biodisponibilidad, pero además funcionar como un conector entre las estructuras. En los PPGs naturales la D-glucosa es el carbohidrato más abundante, aunque también es común encontrar D-ramnosa, D-fucosa, D-xilosa, D-galactosa y D-fructosa. La configuración anomérica de los carbohidratos presentes en los PPGs es en su mayoría del tipo β , formando enlaces glicosidos con aril alcoholes tipo C6-C3 como el alcohol vainillínico, el 3-hidroxitirosol, el DL-3,4-hidroxiifenilglicol, el 2-hidroxibencil alcohol y el alcohol cinámico. Por otra parte, entre los fenilpropanoides más abundantes en PPGs se encuentran el ácido cinámico, el ácido *p*-cumárico, el ácido cafeico, el ácido ferúlico y el ácido sinápico, entre otros, aunque también es común encontrar moléculas con un arreglo tipo C6-C2 (Nenadis N. *et al.*, 2003). Entre las posiciones de esterificación más comunes de este tipo de compuestos fenólicos sobre los carbohidratos en PPGs se encuentran la 2, 4 y 6 y de manera menos frecuente la posición 3 (Kurkin V., 2003; Boeckler G. *et al.*, 2011).

Se ha propuesto que muchas de las propiedades farmacológicas presentes en los PPGs están relacionadas con su actividad como antioxidantes, donde los grupos fenólicos son los principales responsables de esta actividad como antioxidantes y atrapadores de radicales libres (López-Munguía A. *et al.*, 2011; Moon J. & Shibamoto T., 2009). Algunos de los PPGs que han sido analizados como poderosos antioxidantes son el pedicularósido A, incanósido C, verpectósido, luteósido B, verbascosido, grayanosido A, entre muchos otros (Figuras 1 y 6); los cuales han mostrado una potente actividad como antioxidante contra radicales como DPPH, $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot$ (Figura 6) (Li X. *et al.*, 2010; Gao J. *et al.*, 2000; Shi Y. *et al.*, 2007; Abdel-Mageed W. *et al.*, 2012; Kyriakopoulou I. *et al.*, 2001).

La concentración de PPGs en especies vegetales es baja (<5%), lo cual ha limitado su disponibilidad comercial. Esta limitación ha conducido al desarrollo de metodologías que permitan su obtención en grandes cantidades, pero además, en su construcción se pueden integrar estrategias que faciliten la síntesis de moléculas novedosas, aumentando así su variabilidad estructural. Esto facilitará la construcción de bibliotecas moleculares que puedan ser utilizadas para estudiar los efectos estructurales sobre la actividad, y entender como es que ésta se relaciona con sus actividades farmacológicas.

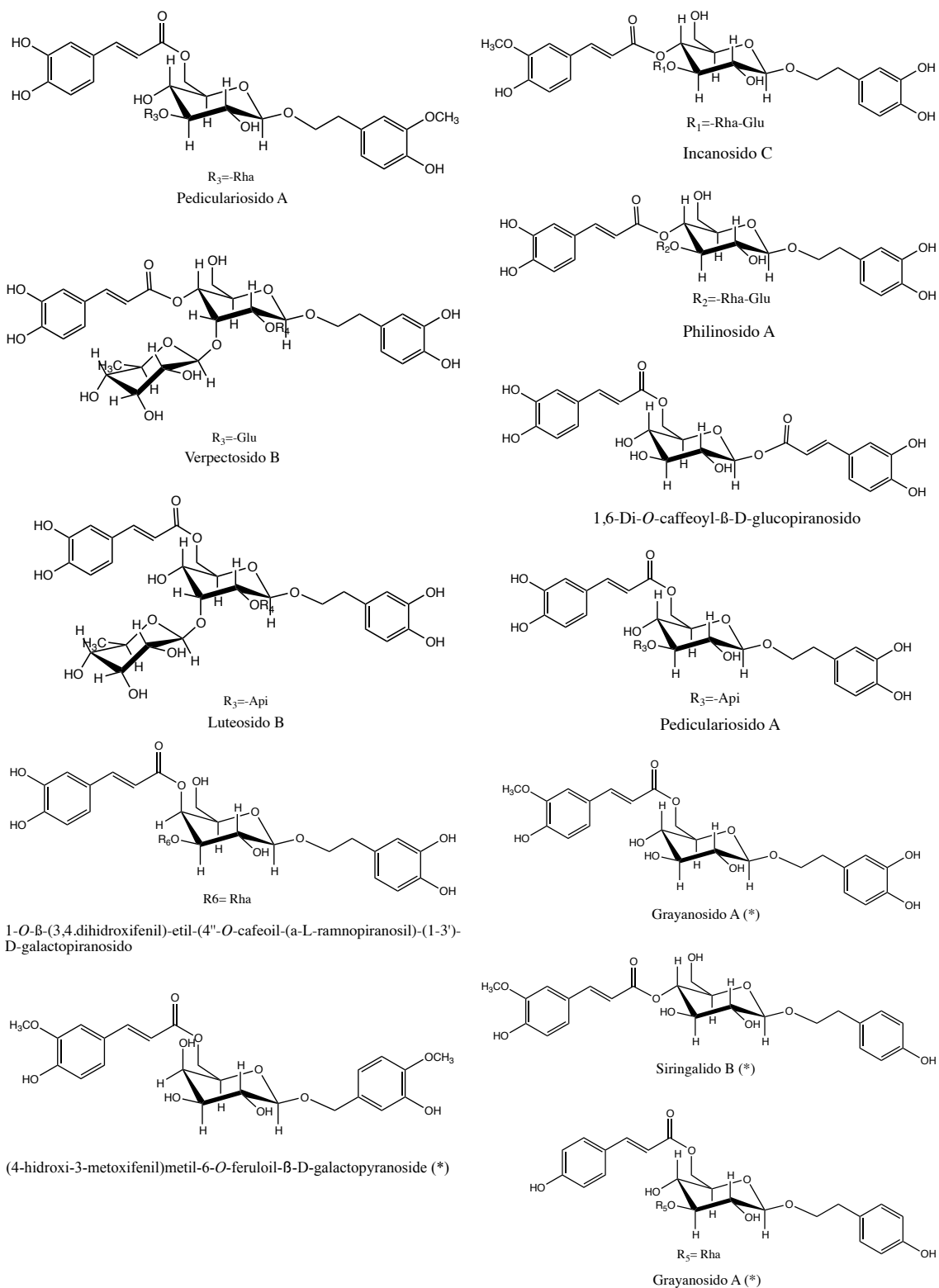
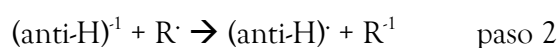


Figura 6.- Estructura de algunos glicósidos de fenilpropanoides identificados en especies vegetales. Las moléculas marcadas (*) disponen de una metodología de síntesis. Se ha descrito actividad antioxidante para una gran cantidad de estas moléculas.

En años recientes se propuso, en base a estudios de química cuántica, que el mecanismo principal para la actividad antioxidante de los PPGs es el denominado SPLET (transferencia de

electrón por pérdida sencilla de protón). Este mecanismo propone la pérdida sencilla de un protón en una primera reacción, para posteriormente transferir un electrón del antioxidante cargado negativamente hacia la especie radical, generando así una especie radical en el antioxidante, la cual es en principio más estable que el radical mismo (Esquema 2) (López-Munguía A. *et al.*, 2011). El radical fenoxilo generado es menos reactivo ya que es estabilizado por resonancia con los electrones π del anillo aromático. Otra característica que favorece está actividad es la presencia de dobles enlaces, los cuales favorecen la deslocalización de los electrones y la estabilización del radical fenoxilo.



Esquema 2.- Mecanismo SPLET de actividad antioxidante propuesto para PPGs.
(Esquema tomado de López-Munguía *et al.*, 2012)

En nuestro grupo de trabajo se ha logrado sintetizar PPGs compuestos por galactosa, alcohol vainillínico y ácido cafeico, los cuales resultaron ser mejores antioxidantes que el ácido ascórbico. Sin embargo, la abundancia de la glucosa en la naturaleza hace interesante la síntesis de PPGs que presenten este tipo de carbohidrato, donde además la relativa abundancia de PPGs en configuración β puede ser estudiado, para entender los efectos originados de la configuración del carbohidrato sobre una propiedad como lo es la actividad antioxidante.

2.4.1 Métodos de síntesis química de PPGs

Con las actuales demandas en la síntesis de fármacos, la industria de la síntesis química ha desarrollado herramientas sumamente versátiles en la construcción de moléculas ya conocidas, así como en el desarrollo de moléculas sumamente novedosas. Los PPGs son moléculas de gran interés, ya que su diversidad en propiedades farmacológicas hace de éstas un grupo de potencial explotación. En la literatura existen un número considerable de informes del aislamiento y análisis de las propiedades farmacológicas de PPGs. Su principal fuente de obtención ha sido a partir de especies vegetales, desafortunadamente, su concentración en estas fuentes rara vez

rebasar, en el mejor de los casos, concentraciones por arriba del 5% (w/w). Bajo este panorama, el desarrollo de nuevas metodologías para su síntesis ha despertado en los últimos años un gran interés. Si bien se han descrito métodos para su síntesis química, este tipo de metodologías presentan en general rendimientos relativamente bajos, menores al 20-25%. Entre otro tipo de desventajas para su aplicación, se encuentran las numerosas y complicadas etapas de preparación y purificación, así como el empleo de reactivos y catalizadores que presentan una toxicidad considerable.

En general la ruta de síntesis química de PPGs se lleva a cabo mediante procedimientos de glicosilación-esterificación, en una estrategia de dos etapas, las cuales requieren la protección de grupos funcionales en los carbohidratos. La glicosilación de moléculas es una de las metodologías más estudiadas y antiguas, siendo que uno de los primeros métodos de glicosilación química fueron los informados por Michael en 1879 y Fischer en 1893, los cuales presentan diferencias en el número de etapas utilizadas, así como en sus rendimientos. La reacción de Michael para la síntesis de O-glicósidos ocurre por desplazamiento de un grupo saliente en el carbono anomérico, en la cual además se debe tener la protección del resto de los grupos OH. Uno de los principales inconvenientes de esta metodología radica en la necesidad de convertir al aceptor de glicosilo en su respectiva sal de potasio (Mydock L. & Damchenko A., 2010; Michael A., 1879). Por otro lado la síntesis de Fischer (1893) es una reacción actualmente relevante dada su considerable sencillez. Sin embargo, tiene como principales limitaciones bajos rendimientos (35%), un reducido número de alcoholes que presentan reacción bajo estas condiciones y una reactividad casi exclusiva en alcoholes de cadena. Existen otro tipo de metodologías empleadas para síntesis de glicósidos, entre ellos se encuentran los métodos de Koenigs Knorr, Smith, tricloroacetamido y la 1-O-alkilación (Figura 7). Todas estas rutas han logrado mejorar los rendimientos de reacción de glicosilación, así como aumentar la variabilidad estructural de los glicósidos sintetizados. Sin embargo, cuentan con las desventajas ya descritas, así como una complejidad en su empleo debido a etapas como la protección-desprotección de grupos reactivos.

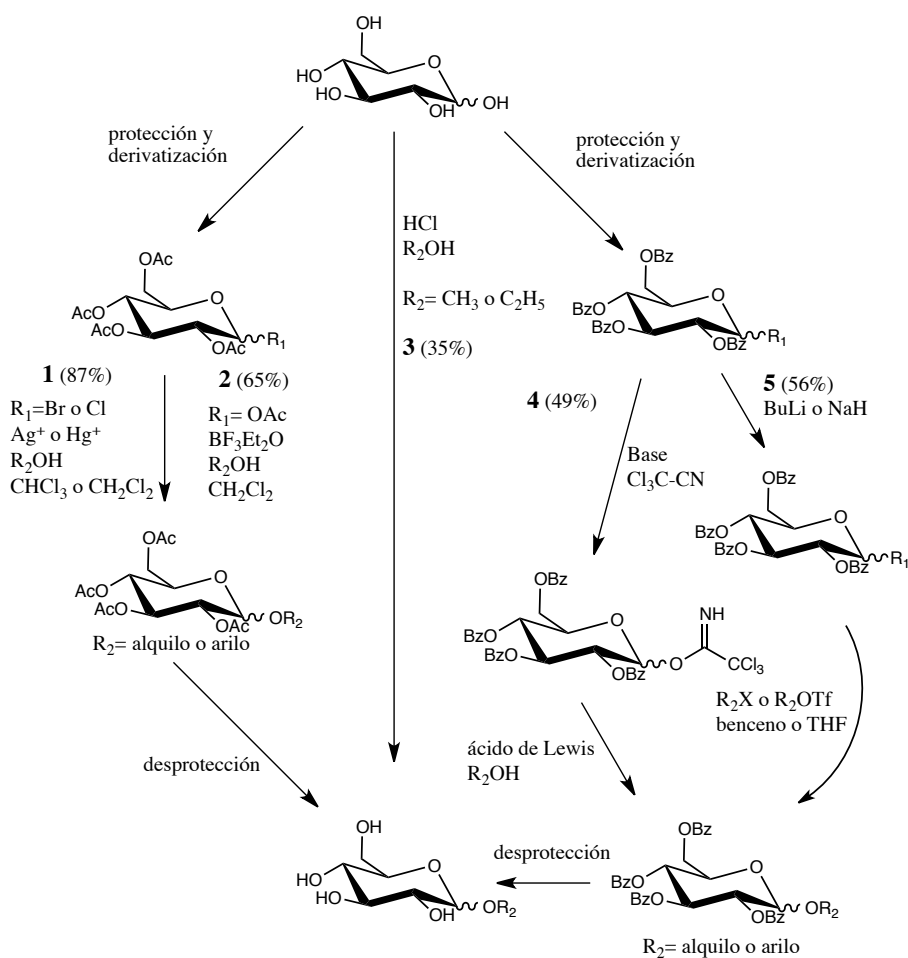


Figura 7.- Principales métodos de síntesis química de glicósidos. 1: método de Koenigs Knorr, 2: método Smits, 3: método Fischer, 4: método tricloroacetamido, 5: 1-O-alkilación. Ac: acetilo y Bz: bencilo (imagen tomada de Roode B., 2001).

En relación a la síntesis total de PPGs, uno de los métodos más empleados en la glicosilación es la metodología de Koenigs-Knorr, la cual consiste en la glicosilación selectiva mediante la protección de grupos reactivos en el carbohidrato con grupos acetilo, para posteriormente llevar a cabo su esterificación (Figura 8). Algunos PPGs que se han sintetizado utilizando esta metodología son el grayanosido A, siringalido B (San-Qi Z. *et al.*, 1997), osmantusido B6 (San-Qi Z. *et al.*, 1998) y el verbascosido (Kawada T. *et al.*, 1999) (Figura 6). Otra metodología de síntesis ocurre mediante la adición de grupos fenilos protectores logrando disminuir el número de etapas y mejorar el rendimiento global de los procedimientos descritos. Se han sintetizado PPGs como el grayanosido A y siringalido B bajo esta metodología (Saibal K. *et al.*, 2007).

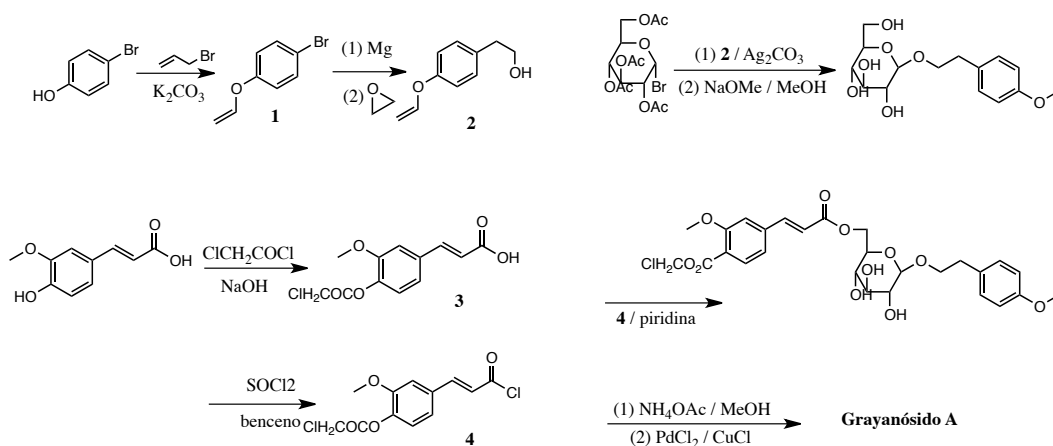


Figura 8.- Ruta de síntesis química para el Grayanosido A. Ruta de síntesis empleando la metodología de Koenigs-Knorr para la síntesis de glicósidos y posteriormente se realiza la feruloilación del glicósido, estrategia basada en la protección de grupos (tomada de San-Qi Z. *et al.*, 1997).

2.4.2 Síntesis enzimática de PPGs

Las enzimas son una herramienta de interés en síntesis debido a sus múltiples ventajas ecológicas y económicas. Entre dichas ventajas se encuentran una mayor estereo-, enantio- y quimioselectividad. Se asumen como catalizadores químicamente verdes debido a sus condiciones suaves de reacción, a su origen natural y a su biodegradabilidad. Otras ventajas de este tipo de procedimientos son la ausencia de reactivos tóxicos, a la sencillez en su recuperación y la posible reutilización del biocatalizador.

Los PPGs son moléculas sintéticamente sencillas si son observadas a partir de los enlaces que conectan sus principales moléculas (aril alcohol, fenilpropanoide, carbohidrato), los cuales son un enlace éter de tipo glicosídico y éster sobre el carbohidrato (Figura 1). De manera natural la formación y transformación de este tipo de enlaces ocurre mediante reacciones catalizadas enzimáticamente. Existe un gran número de enzimas disponibles comercialmente que pueden llevar a cabo la formación de este tipo de enlaces, lo cual facilita su implementación. En la formación de enlaces glucosídicos (éter), las enzimas glucosilantes han sido ampliamente estudiadas, particularmente enzimas de tipo glucosidasas y transferasas. Por otra parte, enzimas como lipasas, esterasas y proteasas han sido aplicadas de manera exitosa en la formación y ruptura de enlaces tipo éster. Una de las grandes ventajas para el empleo de enzimas en la síntesis

de moléculas como los PPGs se centra en su capacidad para aceptar diferentes tipos de sustratos y en la posibilidad de manipular su selectividad bajo diferentes estrategias.

Una primera estrategia exitosa reportada en la síntesis enzimática de PPGs ocurre mediante una síntesis secuencial a dos etapas: glicosilación y esterificación, respectivamente. Esta estrategia para la construcción PPGs utilizó compuestos fenólicos como el tipo alcohol homovainillínico, el ácido ferúlico y el ácido cafeico, entre otras. En el proceso se emplearon las enzimas β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* y lipasa B de *Candida antarctica* (Figura 9), las cuales tuvieron rendimientos del 30-35% y 40-60% respectivamente, demostrando la viabilidad de este tipo de procedimientos para ser utilizados como procesos alternativos en la síntesis de este tipo de compuestos (López-Munguía A. *et al.*, 2011). La elección en el orden de las enzimas se debió a la naturaleza de las reacciones, ya que generalmente los medios de reacción para la síntesis de ésteres en lipasa requieren medios de reacción hidrofóbicos, mientras que la molécula de carbohidrato presenta características polares.

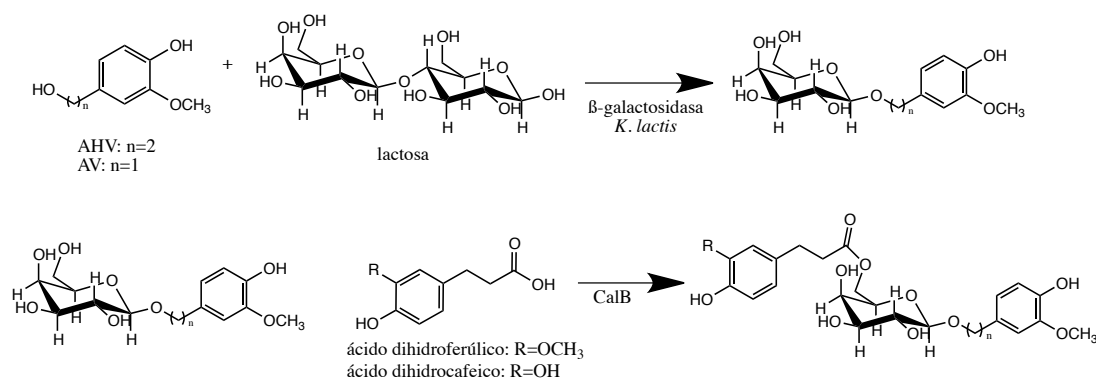


Figura 9.- Estrategia de síntesis enzimática para PPGs en dos etapas. Estrategia utilizada por López-Munguía A. *et al.* en 2011 para la síntesis de PPGs con núcleo de galactosa.

2.5 Síntesis enzimática de glicósidos

Una alternativa a la síntesis de glicósidos es el empleo de enzimas glicosilantes como glicosidasas, glicosintasas y glicosiltransferasas, las cuales presentan ventajas como selectividad (regio-, quimio- y enantioselectividad) y especificidad frente a métodos químicos sin la generación de desechos tóxicos (Mackenzie L. *et al.*, 1998). La glicosilación de moléculas ha resultado de gran interés para

las industrias farmacéutica y alimenticia, ya que estas moléculas presentan propiedades surfactantes y emulsificantes con potencial aplicación en la elaboración de detergentes y cosméticos. Entre las principales ventajas químicas a la glicosilación de moléculas se encuentra el aumento en su solubilidad al agua y una reducción en su reactividad (de Roode M. *et al.*, 2003). La glicosilación suele ser una herramienta en la protección de sustancias lábiles como fármacos y fragancias sensibles a pH ácidos o a la oxidación (van Rantwijk F. *et al.*, 1999), además suele disminuir su volatilidad y mejorar propiedades como reconocimiento, estabilidad y solubilidad (Meulenbeld G. & Hartmans S., 2000; van Rantwijk F. *et al.*, 1999).

Las glucosidasas son enzimas abundantes, estables y accesibles. En la actualidad se ha descrito alrededor de 2500 enzimas (Daines *et al.*, 2004), las cuales han sido utilizadas ampliamente en la síntesis de glicósidos debido a su baja especificidad en el uso de aceptores de glicosilo (Zeche D. & Withers S., 2000; de Roode M. *et al.*, 2003), pero presentan una selectividad absoluta a la estereoquímica en el centro anomérico y presentan un alto grado de quimioselectividad por diferentes grupos hidroxilo, mostrando preferencia sobre los hidroxilos primarios (van Rantwijk F. *et al.*, 1999).

La glicosilación con glicosidasas puede seguir dos rutas, una controlada cinéticamente denominada transglicosilación y otra controlada termodinámicamente denominada hidrólisis inversa (Figura 10) que consiste en la condensación de un monosacárido con un alcohol y la consecuente liberación de agua. Debido a que la actividad hidrolítica predomina en este tipo de enzimas, en la presencia de agua suelen mostrar bajos rendimientos en la síntesis de glicósidos. Este rendimiento en la síntesis suele aumentarse mediante un control termodinámico en el equilibrio de la reacción, esto se logra reduciendo la actividad del agua (a_w), desplazando el equilibrio en el sentido de la condensación. La forma más común para lograr disminuir la actividad del agua es mediante el incremento en la concentración de los sustratos o la presencia de solventes miscibles con el agua que no comprometan la estabilidad de la enzima (Franssen M. *et al.*, 2005). Las glicosidasas presentan como ventajas el uso de sustratos de bajo costo, condiciones de reacción poco agresivas y comparativa termoestabilidad respecto a las glicosiltransferasas (Fernandez-Mayoralas A., 1997).

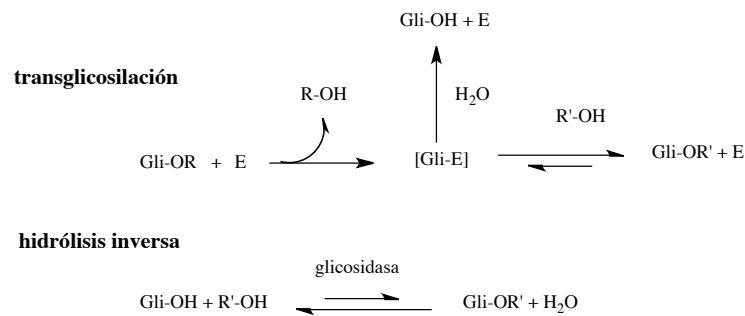


Figura 10.- Mecanismos de glucosilación presentes en glicosidasas. E=enzima, R'-OH=aglicona, Gly-OH y Gly-OR=donador de glucosilo, Gly-E=complejo enzima glucosilo, Gly-OR'=glucosido (imagen tomada de Roode M *et al.*, 2003).

Las glucosiltransferasas (GTFs) son otro tipo de enzimas utilizadas en la síntesis de glicósidos. De manera natural los glicósidos son sintetizados por una gran variedad de glucosiltransferasas (GTFs), las cuales glucosilan selectivamente usando un azúcar activado. Esta transferencia de residuo glucosilo puede ocurrir a diferentes moléculas como otro carbohidrato, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y moléculas orgánicas, entre otros. Las GTFs son enzimas altamente específicas en los sustratos que emplean *in-vivo*, y se han clasificado en dos principales grupos, las de tipo Leloir y las de tipo no-Leloir. Las glucosiltransferasas Leloir son muy específicas y sus conversiones suelen ser muy altas, aunque en concentraciones bajas del orden micromolar. Sin embargo, su empleo se ve limitado debido al alto costo que representa el uso de azúcares activados como sustratos donadores, principalmente azúcares nucleotídicos como nucleósidos mono- o difosfatados (CMP, UDP, GDP, TDP) (Daines A. *et al.*, 2004). En efecto, estas enzimas tienen como desventajas una baja estabilidad, disponibilidad, uso de azúcares activados y un efecto inhibitor por parte de los nucleótidos fosfato liberados (Shaikh F. y Withers S., 2008; Seibel J. *et al.*, 2006). Por otro lado las glucosiltransferasas del tipo no-Leloir pueden usar sacarosa u oligosacáridos derivados de almidón como sustrato no activado para la transferencia de glucosilo (Weijers C. *et al.*, 2008). Estas enzimas utilizan la energía de la unión glucosídica de la sacarosa (5.0-5.5 kcal/mol) para la generación de un nuevo enlace durante la transferencia. Una característica importante de estas enzimas es su actividad hidrolítica, debido a que pueden transferir el residuo glucosilo a una molécula de agua que actúa como aceptor (Plou F. *et al.*, 2007).

En este trabajo nos enfocamos al uso de dos enzimas glucosilantes de tipo glicosidasa: la Ciclodextrin glucanotransferasa de *Thermoanaerobacter* sp. (CGTasa) y la β -glucosidasa de

Thermotoga maritima. Ambas enzimas de naturaleza extremófila han sido ampliamente descritas por sus características de alta transferencia de residuos glucosilo en configuración α y β (Miranda-Molina A. *et al.*, 2010).

Las CGTasas son glicosidasas utilizadas en la síntesis de diferentes tipos de glicósidos, éstas se han descrito en la glucosilación de moléculas como el L-ácido ascórbico (Aga H. *et al.*, 1991), el glicerol (Nakano H. *et al.*, 2003), el *myo*-inositol (Sato M. *et al.*, 1992; Watanabe Y. *et al.*, 1993), el D-sorbitol, el lactitol, el xilitol, el pentaeritritol y el maltitol (Park D. *et al.*, 1998). La glucosilación de inositoles se ha llevado de manera satisfactoria utilizando la CGTasa de *Thermoanaerobacter sp.* (Miranda-Molina A. *et al.*, 2010). La reacción de transglucosilación de la CGTasa opera mediante un mecanismo de ping-pong bi bi (Nakamura A. *et al.*, 1994a), el cual establece que la transglucosilación ocurre después de que al extremo reductor de la amilosa escindida (donador) ha sido liberado de la enzima (Nakamura A. *et al.*, 1994b). Las CGTasas catalizan de forma reversible transglucosilaciones $\alpha(1-4)$ inter- e intramoleculares, presentando cuatro actividades: ciclización, acoplamiento, desproporción e hidrólisis (Figura 11) (Jamuna R. *et al.*, 1993; Nakamura A. *et al.*, 1993).

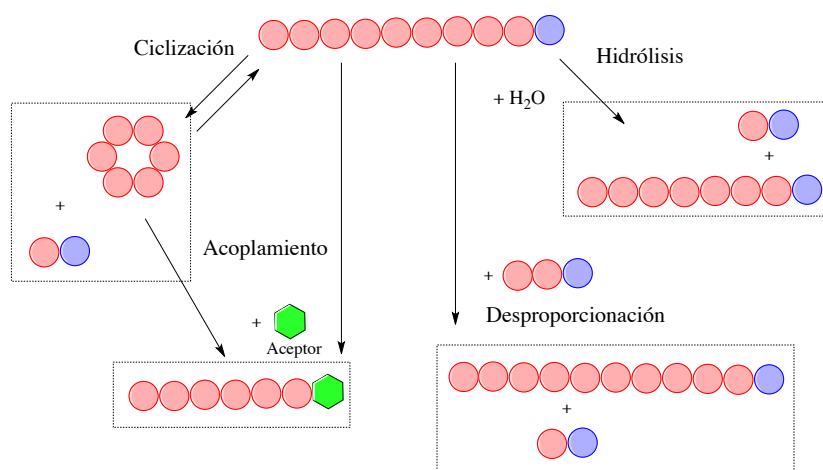


Figura 11.- Mecanismos de actividad presentes en CGTasas. Hexágono verde: aceptor; círculo rojo: residuos de glucosa; círculo azul: extremo reductor de glucosa (Modificada de Nakano H., 2003).

Por su parte, la β -glucosidasa de *T. maritima* es una enzima que presenta propiedades termofílicas (temperatura óptima alrededor de 95 °C) que hacen interesante su uso en síntesis, presenta una

alta especificidad hacia la hidrólisis de β -glucósidos, β -galactósidos y β -fucósidos, y el pH óptimo de actividad es alrededor de 6.1 (Gabelsberger, J. *et al.*, 1993). Se ha demostrado que la β -glucosidasa de *T. maritima* es capaz de llevar a cabo la glicosilación de alcoholes primarios de cadena lateral mediante transglicosilación (Goyal F. *et al.*, 2001). También se ha utilizado en la glicosilación de *myo*-inositales (Miranda-Molina A. *et al.*, 2010).

2.6 Esterificación enzimática catalizada por lipasas

La esterificación enzimática de alcoholes primarios, secundarios, polioles y azúcares es uno de los terrenos más explorados en los procedimientos de biocatálisis. Enzimas como lipasas, esterasas y proteasas obtenidas de plantas y microorganismos han sido utilizadas en la esterificación/transesterificación regioselectiva de azúcares e hidrólisis de azúcares peráclados en diferentes disolventes. Las lipasas son uno de los grupos más estudiados en la formación de ésteres debido a que cuentan con un amplio número en moléculas que funcionan como sustratos, así como su reconocimiento de diferentes aceptores del grupo acilo. Estas enzimas, conocidas como triacilglicerolacilhidrolasas, acilglicerolasas o acil hidrolasas presentan alta estabilidad en presencia de medios de reacción hidrofóbicos y alta especificidad regio- quimio- y enantioselectivas. Las lipasas se han incorporado de manera exitosa a diferentes procesos de síntesis química a nivel industrial (Krishna S. & Karant N., 2002).

La producción de ésteres puede ocurrir mediante la condensación a partir de un ácido carboxílico con una moléculas con grupo(s) hidroxilo, o mediante transesterificación (alcoholisis, acidólisis e interesterificación), en ambas rutas de síntesis de esteres el agua juega un papel importante ya que provoca hidrólisis en los productos sintetizados, por lo que se prefieren medio de reacción con baja actividad de agua (a_w), o medios no acuosos. Para estos medios de reacción se utilizan enzimas capaces de retener su actividad catalítica en disolventes orgánicos a bajas concentraciones de agua. Existen también otro tipo de medios de reacción que hacen uso de líquidos iónicos, los cuales han tomado atención debido a que se les considera "solventes verdes" (Kobayashi T., 2011).

La esterificación de polioles o carbohidratos es un proceso recientemente explorado por las lipasas, y de los cuales se han encontrado resultados interesantes. Entre los polioles esterificados de manera eficiente con lipasas se encuentran el glicerol, la glucosa, el xilitol y el sorbitol, entre

otros (Kobayashi T., 2011). Pero también han sido empleados disacáridos como sacarosa, lactosa o maltosa (Oosterom M. *et al.*, 2000). El principal interés en su síntesis radica en sus potenciales propiedades emulsificantes, sin embargo una de las principales limitantes es la baja solubilidad de los carbohidratos en medios orgánicos (Kobayashi T., 2011).

Entre las enzimas utilizadas para este fin podemos mencionar a la lipasa de *Mucor miehei* la cual ha sido utilizada para la producción de mezclas de ésteres de oleatos de azúcares empleando ácido oleico y fructosa como aceptor obteniéndose rendimientos de 83% en 2-metil-2-butanol (Khaled N. *et al.*, 1991); y la lipasa pancreática porcina ha sido usada en la producción del 1-O-acetilfructósido en di-isopropil eter obteniendo rendimientos altos (70%) (Sharma A. & Chattopadhyay S., 1993).

La lipasa B de *Candida antarctica* (CalB) es una enzima con propiedades interesantes, ya que presenta una alta estabilidad ante un gran diversidad de disolventes orgánicos, permitiendo modular su afinidad por el sustrato, selectividad y estereoespecificidad (Griebenow K. & Klivanov A., 1996). La CalB ha sido utilizada para llevar a cabo la síntesis regioselectiva de ésteres de fenilpropanoides de cadena saturada en disolventes orgánicos (Cassani J. *et al.*, 2007). Por otro lado, se ha informado que el diseño de un medio de reacción específico (ingeniería de solventes) es una herramienta útil para mejorar el rendimiento y selectividad de reacciones enzimáticas utilizando lipasas como catalizadores.

La síntesis de ésteres a partir de sus constituyentes ácidos y alcoholes puede llevarse a cabo bajo condiciones anhidras y disolventes no acuosos (Zaks A. & Klivanov A., 1984; Klivanov A., 2000). La CalB ha sido usada en la síntesis de 6-O-monoésteres de glucosa con rendimientos de hasta el 89% (Ganske F. & Bornscheuer U., 2005), mientras que en el caso de disacáridos como maltosa y sacarosa se ha demostrado que su rendimientos es de hasta un 27% (Pedersen N. *et al.*, 2002), mientras que la esterificación de carbohidratos modificados como el 1-β-D-arabinofuranosilcitosina presenta rendimientos altos, de hasta un 99% (Xiao-Feng L. *et al.*, 2006). Otra caso con altas conversiones ha sido la producción del 1-O-monobutirilsacarosa a partir de sacarosa y triclorobutanoato (Patil D. *et al.*, 1991).

2.7 Ensayos para la evaluación de la capacidad antioxidante

Cuando se generan nuevas moléculas que se sabe presentan actividad antioxidante, es necesario elegir procedimientos que nos permitan comparar la actividad antioxidante de las moléculas generadas, con otras ya descritas, las cuales además cuenten con un respaldo conocido. Para evaluar la capacidad antioxidante de una sustancia existe una amplia gama de métodos que permiten cuantificar esta propiedad. Una buena estrategia para estudiar la capacidad antioxidante de una molécula consiste en realizar ensayos *in-vitro* en un primer acercamiento, para después realizar un análisis más descriptivo en un modelo *in-vivo*. Uno de los radicales más empleados para este fin es el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (Figura 12), el cual resulta ser analíticamente sencillo (Sharma O. & Bhat T., 2009). De hecho, este tipo de ensayo permite obtener una aproximación sobre la actividad antioxidante de una sustancia, pero hace necesaria la evaluación con otro tipo de especies reactivas. Es importante señalar que si bien por su sencillez el ensayo del DPPH resulta uno de los métodos más usados en la literatura, presenta como principal desventaja el uso de un radical de naturaleza artificial.

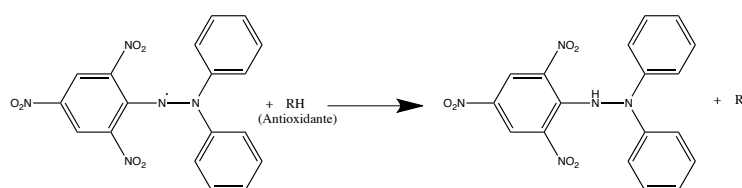


Figura 12.- Reacción de atrapamiento del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.

Los ensayos Capacidad de Absorción de Radicales Oxígeno (ORAC) y Capacidad Antioxidante en Equivalentes de Trolox (TEAC) son otro tipo de ensayos, los cuales son empleados generalmente en el análisis de antioxidantes de tipo alimenticio, estos tienen en común el uso de Trolox como molécula de referencia. El Trolox es un análogo de la vitamina E, del cual se ha descrito una poderosa actividad como atrapador de radicales libres, la cual es aceptada como referencia de la actividad antioxidante (Oehlke K. *et al.*, 2011). El ensayo de ORAC consiste en la generación de un radical peroxilo de tipo artificial a partir del 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorado (AAPH), este radical peroxilo reacciona con la fluoresceína, abatiendo su actividad fluorescente (Figura 13). En este ensayo se evalúa la actividad protectora de moléculas antioxidantes sobre fluoresceína y se compara con la actividad protectora obtenida de Trolox.

Este ensayo es muy usado en la evaluación de mezclas de compuestos obtenidos de jugos y extractos, permitiendo describir una actividad como equivalentes de otro antioxidante ya conocido (Zulueta A. *et al.*, 2009).

Existen otro tipo de ensayos que exploran la función antioxidante en especies reactivas de origen fisiológico. En este campo se han descrito procedimientos para evaluar casi todas las especies reactivas (radicalarias y no radicalarias) presentes en la célula, así como para analizar esta actividad a nivel *in-vivo* e *in-vitro*. El estudio sobre este tipo de especies ha resultando ser de gran utilidad para conocer el papel de los antioxidantes sobre el estrés oxidativo y su relación de protección frente a algunas patologías.

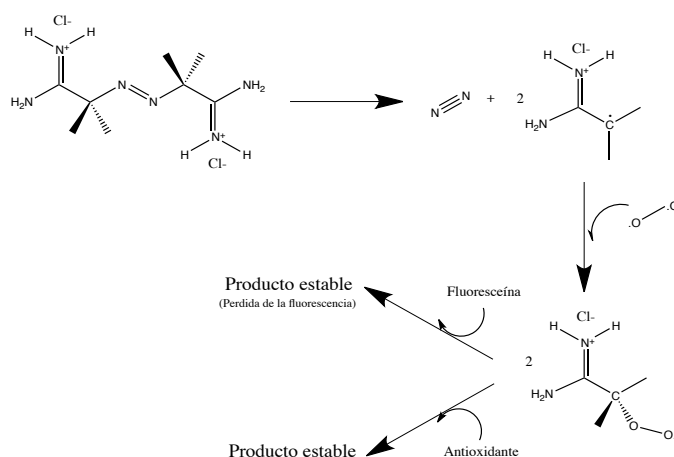


Figura 13.- Reacción de generación de radical peroxilo y oxidación de fluoresceína en ensayo ORAC.

Una de las especies de mayor interés fisiológico es el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). Su interés se centra en su alta reactividad y a un sistema de contención ausente, haciendo de este radical una molécula de interés en su estudio. Por otro lado, existe además el interés en desarrollar moléculas que logren estabilizar esta reactividad. Uno de los principales ensayos usados para evaluar la función antioxidante del radical hidroxilo consiste en medir la generación de 2-hidroxitereftalato a partir de la reacción de hidroxilación del ácido tereftálico (Figura 14) (Qu X. *et al.*, 2000). La generación de este radical se lleva a cabo mediante la reacción de Fenton (Figura 2-A), utilizando como agente reductor al ácido ascórbico, el cual funciona como regenerador del Fe^{2+} . El 2-hidroxitereftalato es una molécula fluorescente, y su generación puede ser monitoreada durante

la reacción, permitiendo evaluar la actividad antioxidante sobre una especie radicalaria de origen fisiológico.

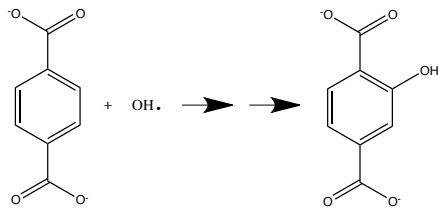


Figura 14.- Reacción de generación del 2-hidroxitereftalato.

3. Justificación

Los glicósidos de fenilpropanoides (PPGs) son moléculas con gran potencial para la industria farmacéutica debido su amplio espectro de actividades farmacológicas. Estas moléculas se caracterizan por estar formadas de compuestos tipo fenólicos, unidas a un centro de azúcar. Uno de los carbohidatos más representativos en este tipo de compuestos es la glucosa, la cual además se encuentra en la mayoría de los compuestos descritos en una configuración en β . Generar nuevas moléculas con estructuras de tipo PPGs, las cuales presenten configuraciones α y β en su núcleo de azúcar permitirá estudiar los efectos de los carbohidratos y su configuración sobre la actividad antioxidante de moléculas con arreglo tipo PPGs. Es importante señalar que la baja disponibilidad de PPGs en fuentes naturales ha incrementado el interés por el desarrollo de metodologías novedosas que permitan su obtención a una mayor escala. Los procedimientos enzimáticos además de ofrecer atractivas ventajas tecnológicas en el diseño de moléculas, se perfilan como potenciales herramientas para el desarrollo de procesos sustentables. Para este proyecto, el desarrollo de una metodología de síntesis enzimática en dos pasos ofrece una novedosa alternativa a la síntesis de PPGs, los cuales tienen una configuración α y β sobre su carbohidrato, lo cual permite estudiar los efectos de su configuración sobre la actividad antioxidante.

4. Hipótesis

Mediante una metodología de síntesis enzimática en dos etapas es posible sintetizar moléculas con estructura tipo PPGs que presenten actividad antioxidante. Esta metodología debe permitir la síntesis de PPG's en configuraciones α y β , y así poder analizar sus efectos sobre la actividad antioxidante.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

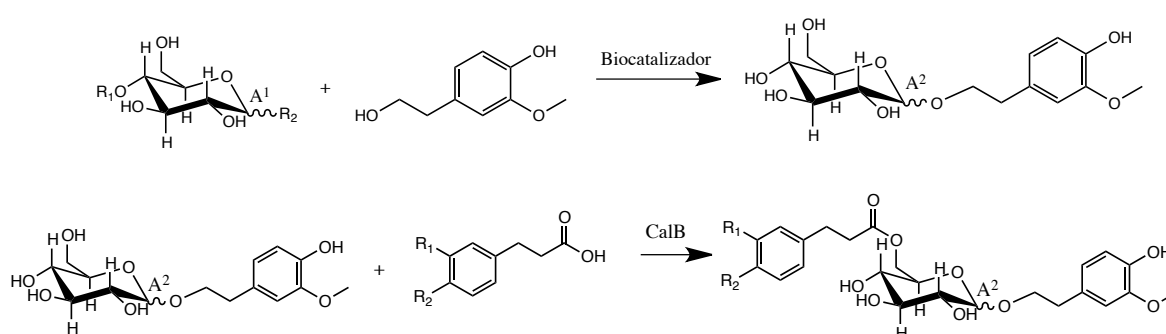
Desarrollar una metodología de síntesis enzimática para PPGs en dos etapas y con diferente configuración anomérica, de manera que se puedan asociar las características estructurales de los productos sobre la actividad antioxidante.

5.1.1 Objetivos específicos

- Establecer condiciones de reacción y purificación de glucósidos en orientaciones α y β , utilizando como biocatalizador a las enzimas CGTasa de *Thermonaerobacter sp.* y β -glucosidasa de *T. maritima*.
- Establecer condiciones de reacción y purificación de PPGs, utilizando como biocatalizador la enzima lipasa B de *C. antarctica*.
- Realizar estudios de actividad antioxidante utilizando el radical DPPH sobre las moléculas generadas.
- Realizar un análisis sobre la estructura de los compuestos generados para relacionar ésta con su actividad antioxidante.

6. Estrategia experimental

Para la síntesis de PPGs de este proyecto se utilizó una estrategia en dos etapas, las cuales consistieron en: glucosilación como primera etapa y esterificación como segunda etapa. En la glucosilación se emplearon las enzimas β -glucosidasa de *T. marítima* y CGTasa de *Thermoanaerobacter sp.* con la finalidad de construir glucósidos en las orientaciones α y β respectivamente. Como compuesto fenólico modelo se empleó el alcohol homovainillínico, una molécula con actividad antioxidante considerablemente alta. Para una posterior etapa se utilizó como enzima acilante la lipasa B de *C. antarctica*, y se utilizaron como moléculas de estudio los ácidos dihidroferúlico y dihidrocafeico, los cuales se han descrito como buenos antioxidantes.



Moléculas

Etapa 1	Glu- α -AHV	A^1 y $A^2=\alpha$; Biocat= CGTasa (<i>Thermoanaerobacter sp.</i>) y glucoamilasa (<i>A. niger</i>); R_1 y $R_2=5$ Glucosas cíclicas (β -ciclodextrina)
	Glu- β -AHV	A^1 y $A^2=\beta$; Biocat= β -glucosidasa (<i>T. marítima</i>); $R_1=H$, $R_2=Glu$
-----Etapa 2-----	PPG- α -DHC	$A^2=\alpha$; R_1 y $R_2=OH$
	PPG- α -DHF	$A^2=\alpha$; $R_1=OCH_3$ y $R_2=OH$
	PPG- β -DHC	$A^2=\beta$; R_1 y $R_2=OH$
	PPG- β -DHF	$A^2=\beta$; $R_1=OCH_3$ y $R_2=OH$

Para evaluar los efectos en la actividad antioxidante utilizaremos al radical difenilpicrilhidrazilo (DPPH), un radical de origen artificial muy usado en el estudio de la actividad atrapadora de

radicales libres. Utilizando este radical analizaremos la actividad antioxidante de las moléculas generadas (EC_{50}), así como la velocidad de se atrapamiento de este radical por los antioxidantes.

7. Materiales y métodos

7.1 Reactivos utilizados

El alcohol homovainillínico (AHV), ácido ferúlico (AF), ácido cafeico (AC), 2-nitrofenil- β -D-glucopiranosido y 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) fueron comprados de Sigma-Aldrich® (México). Las Enzimas Toruzyme 3.0 L (ciclodextrina glucano transferasa de *Thermoanaerobacter* sp.) y Novozym 435 (Lipasa B de *C. antarctica*) fueron generosamente proporcionadas por Novozymes® México, la enzimas Enzeco Glucoamylase Powder AN (glucoamilasa de *Aspergillus niger*) fue comprada en Enzymes Development Corporation®.

7.2 Expresión y purificación de β -glucosidasa de *T. maritima*

La cepa transformada de *E. coli* C-43 fue construida por Escudero García en 2011. El gen de la enzima β -glucosidasa fue adquirido a partir de DNA cromosomal de *T. maritima*, el cual fue proporcionado por el grupo del Dr. Enrique Morett IBT-UNAM. Su clonación se realizó en el plásmido pET-22b(+). Para su inducción se inocularon 50 mL de medio LB-ampicilina (100 μ g/mL) con células transformadas con el plásmido que contiene el gen de la β -glucosidasa de *T. maritima*. El preinóculo se incubó por 16 horas a 27°C y 250 rpm. Se inoculó 1 L de medio YT2x (triptona 16 g/L, ex. de levadura 10 g/L y NaCl g/L) con ampicilina (200 μ g/mL) con 25 mL de preinóculo, y se incubó a 37°C hasta llegar a densidad óptica entre 0,5-0,6 UA a 600 nm. Se adicionó el inductor isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración 0,2 mM, y se la incubó por 6 horas a 30°C. Se cosecharon las células a 4000 x g durante 20 min, se lavaron 2 veces con amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7, las células se almacenaron a -18 °C.

Para la purificación de la enzima se adicionó amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7 en una relación de 5 mL/L de cultivo cosechado, se adicionó lisozima a una concentración de 1 mg/mL y se realizaron 3 ciclos de congelación-descongelación. La muestra se sonicó durante 1 minuto con lapsos de 15 seg de sonicación y 30 seg de descanso. Se centrifugó la muestra a 10 000 x g

durante 30 min. a 4°C, se recuperó el sobrenadante. Dicho sobrenadante se calentó a 70°C durante 5 min. y se centrifugó a 6 000 xg durante 30 min. a 4°C. La muestra se diluyó con Amortiguador A (20 mM de NaH₂PO₄; 0,5 M de NaCl a pH 7) en relación 1:3 y se recirculó dentro de una columna de afinidad a histidinas durante 1 hora en baño de hielo. La proteína ligada a la columna se eluyó con un gradiente de Amortiguador B (20 mM de NaH₂PO₄; 0,5 M de NaCl y 0,5 M de imidazol a pH 7) utilizando el equipo de FPLC ÄKTA prime, el cual consistió en la recolección de muestras a un flujo de 1 ml/min, el gradiente utilizado consistió en incrementos de 0.5 ml/min del Amortiguador B. La fracción que contenía la proteína fue dializada y concentrada usando un filtro molecular de 10 kDa, posteriormente la muestra se almacenó a 4 °C.

7.2.1 Ensayo de actividad de β-glucosidasa de *T. maritima*

Para medir la actividad de β-glucosidasa, se tomaron 445 μL de amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7 y se adicionaron 50 μL de 2-nitrofenil-β-D-glucopiranosido a una concentración 10 M. Se mezclaron 5 μL de la muestra de enzima con un contenido de proteína entre 10-50 mg/ml con la solución preparada y se incubaron a 70°C con agitación a 750 rpm hasta la aparición de color amarillo. La reacción se detuvo adicionando 500 μL de Na₂CO₃ 1 M. Se midieron las absorbancias a 405nm. Para calcular la actividad de la muestra se utilizó la siguiente relación:

$$\frac{D.O._{405nm} * 0,5 * dil}{4,5 * t * 0,005} = [U/ mL]$$

D.O. = Absorbancia a 405 nm

t = tiempo de reacción

dil = dilución utilizada

7.3 Síntesis del α-glucósido de alcohol homovainillínico

La reacción de síntesis del α-glucósido 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil-α-D-glucopiranosido (Glu-α-AHV) se llevó a cabo utilizando una concentración 1 M de alcohol homovainillínico (aceptor) y 10 % p/v de almidón (donador de glucosilo), utilizando como medio de reacción amortiguador de Na₂HPO₄ 50 mM pH 6.0, se adicionó CGTasa de *Thermoanaerobacter sp.* a una concentración

de 20 U/mL. Las reacciones se incubaron a 50°C con una agitación de 750 rpm. Para detener la reacción se colocó en un baño de agua a ebullición durante 10 min.

Posteriormente se realizó una digestión adicionado glucoamilasa de *A. niger* en una concentración de 258 U/ml. La reacción se incubó durante 48 horas a 50°C. Para finalizar la reacción se colocaron las muestras durante 10 min en baño a ebullición. Las muestras se almacenaron a -18°C hasta su purificación.

7.4 Síntesis del β -glucósido de alcohol homovainillínico

La reacción de síntesis del β -glucósido 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil- β -D-glucopiranosido se llevó a cabo utilizando una concentración de 0.8 M de alcohol homovainillínico (aceptor) y 0.8 M de celobiosa (donador de glucosilo), utilizando como medio de reacción amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7. Se adicionaron 5 U/mL de β -glucosidasa de *T. maritima*, y se incubaron a 70°C con una agitación de 750 rpm. La reacción se detuvo colocando la muestra en un baño de agua a ebullición durante 10 min. Las muestras se almacenaron a -18°C hasta su purificación.

Espectro RMN de Glu- β -AHV. ^1H 400 Mhz, δ (ppm): 6.855 (H2); 6.855 (J= 7.6, H6); 6,666 (J=8, H5); 4.301 (J= 8, H1'); 4.056 (J= 7.2, J=9.6, H5'); 3.726 (J= 9,6 Hz, J=14.8, H6'); 3.664 (J=5.2, J= 11.6, H4'); 3.485 (J= 7.6, J= 14, H3'); 3,326 (multiplete, H2'); 3.190 (J=7.6, H8); 2.486 (J= 6.8, H7). ^{13}C 100 Mhz, δ (ppm): 149.992 (C1), 146.095 (C3), 131.775 (C4), 122.568 (C6), 116.242 (C5), 113.997 (C2), 104.486 (C1'); 78.092 (C3'); 78.274 (C5'); 75.286 (C8); 72.116 (C2'); 71.843 (C4'), 62.954 (C6'); 56.583 (OCH₃); 56.583 (C7).

7.5 Purificación de glucósidos por cromatografía flash

En la purificación de los glucósidos se utilizó el equipo de cromatografía flash Reveleris de GRACE®. Para la preparación de la muestra se tomaron los extractos crudos de las reacciones (fase acuosa) y se les realizaron 2 extracciones con CHCl₃ para retirar el exceso de aceptor. Posteriormente se le realizan extracciones con 2-metil-2-butanol (2M2B) para retirar el producto. La fase orgánica de 2M2B fue concentrada en rotaevaporador, y colocada en silica (0.04-0.063 nm de poro) en una relación 1:30. Se evaporó el disolvente a sequedad y la sílica seca se colocó

en equipo de purificación flash. Para su purificación en equipo de cromatografía flash se utilizó una columna Amino GRACE® 12 g de 40 µm de tamaño de partícula como fase estacionaria, y como fase móvil se utilizó acetato de etilo:metanol. Las condiciones de corrida consideran una velocidad de flujo de 20 ml/min., detectores de UV a 220 y 280 nm, y como condiciones de elución un gradiente acetato de etilo:metanol 100:0 durante 3 min., gradiente de 100:0 a 90:10 durante 1 min., 90:10 durante 5 min., gradiente 90:10 a 50:50 durante 5 min. y 50:50 durante 5 min. Se recolectaron las fracciones que contenían al producto, se evaporó el disolvente y se analizaron las muestras por HPLC.

Para la purificación de los α -glucósidos se utilizó una columna C18 GRACE® 12 g de 40 µm de tamaño de partícula, se utilizó una velocidad de flujo de 20 ml/min., detectores de UV a 220 y 280 nm, para su elución se utilizó un sistema agua:metanol como fase móvil. Como condiciones de corrida se utilizó un gradiente usando inicialmente 100% de agua, con incrementos del 5,7% de metanol/min hasta completar un 40% de metanol. Posteriormente una corrida en isocrático durante 5 min. Se recolectaron las fracciones, se evaporó el disolvente y se analizaron los productos por HPLC.

7.6 Síntesis de ácidos dihidroferúlico y dihidrocafeico

En la síntesis del ácido dihidroferúlico se preparó una solución metanólica 0.513 M de ácido ferúlico con catalizador de Pd/C a una concentración de 3% en peso del ácido, se le suministró H₂ a 60 psi durante una hora. Al término de la reacción se retiró el catalizador por filtración y la purificación del compuesto se realizó mediante cristalización en metanol.

Para la síntesis del ácido dihidrocafeico se preparó una solución 0.555 M de ácido cafeico en una mezcla metanol:acetona (1:1) y catalizador de Pd/C a una concentración de 3% en peso del ácido, se le suministró H₂ a 60 psi por 1 hora. Al término de la reacción se retiró el catalizador por filtración, la purificación del producto se realizó mediante cristalización en metil-*tert*-butil éter:n-hexano (1:1).

7.7 Síntesis de PPGs empleando lipasa B de *C. antarctica* (CalB).

La síntesis de PPGs se llevó a cabo utilizando los glucósidos de alcohol homovainillico a una concentración 70 mM y dos equivalentes de los ácidos dihidroferúlico o dihidrocafeico (140 mM). Se adicionó CalB como catalizador a una concentración de 50 mg/ml y tamiz molecular a 100 mg/ml utilizando como medio de reacción 2-metil-2-propanol:acetonitrilo (90:10). Las muestras se incubaron a 60°C durante 120 horas. Al término de la reacción la muestra se centrifugó a 5 000 x g durante 5 min, se tomó el sobrenadante y se conservó a -18 °C hasta su purificación.

Espectro RMN del PPG- β -DHF. ^1H 400 Mhz, δ (ppm): H6'': J=8, δ =6.832; H6: J=8, δ =6.823; H2'': J=1.6, δ =6.727; H2: J=1.6, δ =6.711; H5'': J=10.4, δ =6.678; H5: J=9.6, δ =6.663; H6': δ =4.495, J=4.2, J=12; H8: δ =4.349, J=5.6; H1': J=7.6; δ =4.239; -OCH₃: δ =3.858; H8'': δ =3.728, J=7.2; -OCH₃: δ =3.486; H3': δ =3.500, J=5.6; H5': δ =3.380, multiplete; H2': δ =3.300, J=6.9, J=7.3; H4': δ =3.190, J=7.2, J=7.8; H7: δ =2.865, J=7.2; C7'': δ =2.669, J=8). ^{13}C 100 Mhz, δ (ppm): C6'': δ =121.433; C6: δ =120.833; C5'': δ =114.474; C5: δ =114.359; C2'': δ =111.474; C2: δ =111.035; C1': δ =102.891; C3': δ =75.737; C5': δ =74.023; C2': δ =73.555; C8'': δ =71.123; C4': δ =69.629; C6': δ =63.083; C8: δ =60.373; -OCH₃: δ =55.906 y δ =50.838 C7'': δ =36.045; C7 δ =30.597.

7.7.1 Purificación de PPGs

La purificación de PPGs se realizó mediante cromatografía flash utilizando el equipo Reveleris de GRACE®. Para la preparación de la muestra se tomaron los extractos crudos de las reacciones y se adsorbieron en sílica (0.04-0.063 nm de poro) en una relación 1:30. Para su purificación equipo de cromatografía flash se utilizó una columna Amino GRACE® 12 g de 40 μm de tamaño de partícula como fase estacionaria, y como fase móvil cloroformo : metanol utilizando como condiciones de corrida una velocidad de flujo de 20 ml/min, detectores de UV a 220 y 280 nm, y como condiciones de elución 85:15 por 16 min., un gradiente de 85:15 a 0:100 por 0.5 min y 0:100 durante 5 min. Se colectaron las fracciones que contenían al producto, se les evaporó el disolvente y se analizaron por HPLC.

7.8 Cuantificación de productos de glucosilación y esterificación

La cuantificación de los productos se realizó mediante cromatografía de alta resolución (HPLC) usando el equipo Waters 717 plus Autosampler usando un detector Waters 996 Photodiode Array Detector (Waters, USA). Para la cuantificación de los glucósidos de alcohol vainillínico y alcohol homovainillínico se utilizó la columna Prevail Carbohydrate ES 5u L: 250x4.6 mm (Alltech, USA) (aminada), usando como fase móvil acetonitrilo:agua 75:25, a un flujo de 1 ml/min y una temperatura de 30°C. Para su cuantificación se utilizó una curva estándar con una cantidad conocida de glucósido, el producto producido se calculó mediante las altura relativas en el detector usando una curva estándar.

La cuantificación de los productos de esterificación se realizó con la columna Waters Spherisorb ODS-2 (SUPELCO INC., USA) utilizando como fase móvil agua:metanol:ácido trifluoroacético 60:40:0.2, a un flujo de 1 ml/min con una temperatura de 45°C. Para su cuantificación se utilizó una curva estándar con una cantidad conocida de PPG, el producto producido se calculó mediante las altura relativas en el detector usando una curva estándar.

7.9 Análisis estructural de compuestos sintetizados

El análisis estructural de los compuestos se realizó mediante estudios de RMN de ^1H y ^{13}C en una y dos dimensiones. Estos se realizaron en el Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM). Se utilizaron los equipos Varian de 400 y 200 MHz. Se utilizaron los disolventes CD_3OD y CDCl_3 en sus análisis, empleando como referencia tetrametilsilano. Para los análisis en dos dimensiones se utilizaron los métodos de gCOSY, HMBC, HETCOR, TOCSY y HSQC.

7.10 Ensayo de actividad atrapadora de radicales libres usando el 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH)

El ensayo de actividad atrapadora se realizó mediante la preparación de una mezcla de reacción 1:60 entre la muestra y una solución metanólica de 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) 100 mM. Las reacciones se incubaron durante 60 min en obscuridad a temperatura ambiente; pasado el

tiempo las muestras se leyeron a 517nm en espectrofotómetro de UV-Vis. La actividad atrapadora del antioxidante se determina utilizando la siguiente expresión:

$$\frac{\text{Abs Bco} - \text{Abs Mtra}}{\text{Abs Bco}} * 100 = \% \text{ de atrapamiento}$$

Para el cálculo del EC₅₀ se realizó una curva de concentración contra porcentaje de atrapamiento. El valor se interpoló de la línea de tendencia del gráfico. El blanco del ensayo consiste en adicionar agua en lugar de muestra a la mezcla de reacción.

7.11 Análisis de conformeros estructurales.

Los conformeros analizados se obtuvieron en el programa Marvin Sketch (ChemAxon, Hungría). Para su generación se construyeron las moléculas en 2D, y posteriormente fueron convertidas a 3D. En la generación de los conformeros se utilizó la herramienta que presenta el programa, y se utilizaron los siguientes parámetros: como campo de fuerza se utilizó el modelo MMFF94, como unidades de energía mostrada kcal/mol, con límites de optimización estrictos, y se le pidió calcular 20 conformeros utilizando un tiempo de límite de adquisición de 10,000 segundos.

8. Resultados y discusión

8.1 Obtención de proteínas para procedimientos enzimáticos

La primera etapa del trabajo consistió en estandarizar la actividad catalítica de las enzimas a utilizar en las etapas de síntesis. Si bien las enzimas CGTasa de *Thermoanaerobacter sp* (Toruzime 3.0 L, Novozymes, México), la glucoamilasa de *A. niger* (EDC, México) y la Lipasa B de *C. antarctica* (Novozyme 345, Novozymes, México) se obtienen de manera comercial y con una actividad declarada del proveedor, en nuestro caso medimos su actividad a manera de referencia inicial. En el caso de la enzima β -glucosidasa de *T. maritima*, esta enzima se produjo y se purificó a partir de una cepa construida en el grupo de Tecnología Enzimática del Instituto de Biotecnología-UNAM.

8.1.1 Purificación de β -glucosidasa de *T. maritima*

El gen que codifica a la enzima β -glucosidasa se clonó en el plásmido pET-22b(+), el cual contiene una región con 7 histidinas en el extremo carboxilo, las cuales permiten su purificación por afinidad. En su purificación se empleó un ciclo de calentamiento a 90°C durante 5 min, lo cual permitió eliminar el mayor número de proteínas no termófilas antes de su paso por la columna de afinidad. El gel de SDS-PAGE muestra los niveles de la enzima en las distintas etapas (Figura 15-A). En esta figura se observa que el peso molecular de la enzima es de 55.3 kDa, un tamaño cercano al descrito (47 kDa) para esta enzima (Gabelsberger J. *et al.*, 1993). Esta variación en el peso molecular puede deberse a las seis histidinas incorporadas por el plásmido utilizado, las cuales fueron útiles para su purificación por cromatografía de afinidad utilizando columnas cargadas con níquel. En su purificación, la cromatografía de afinidad a níquel presentó un buen resultado, pudiéndose observar una proteína con una considerable pureza (carril P de la figura 15-A). Por otro lado, los ensayos de actividad presentados en la tabla de la figura 15 revelan que la β -glucosidasa conserva una fracción importante de su actividad después del calentamiento, actividad que se mantiene durante las etapas de purificación (Figura 15-B). Es importante mencionar que existen metodologías ya descritas para la purificación de esta enzima utilizando

cromatografía de intercambio aniónico y filtración en gel (Xue Y. *et al.*, 2009; Gabelsberger J. *et al.*, 1993), sin embargo, estas estrategias logran obtener rendimientos de alrededor del 12%, mientras que la estrategia descrita en este trabajo permite rendimientos de alrededor del 63%. Así entonces, se logró purificar la enzima β -glucosidasa de *T. maritima* empleando una estrategia de precipitación por temperatura y cromatografía de afinidad a níquel.

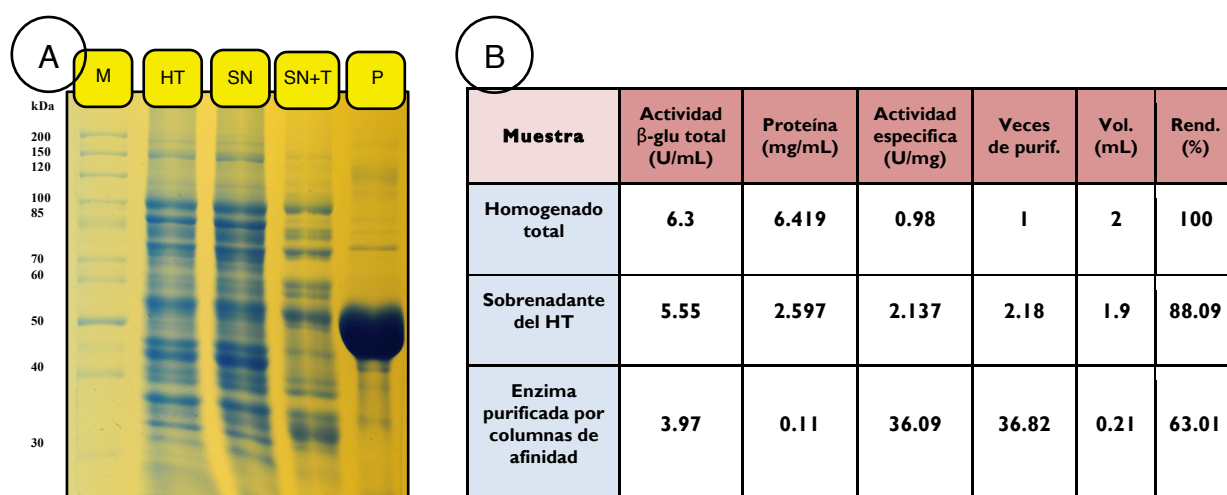


Figura 15.- Resultados de purificación de β -glucosidasa de *T. maritima* A: SDS-PAGE y B: Actividad de β -glucosidasa de fracciones durante purificación. Cada fracción contiene 50 μ g de proteína. M: marcadores de peso molecular, HT: homogenado total, SN: sobrenadante, SN+T: sobrenadante sometido a calentamiento, P: fracción con proteína purificada. La actividad de β -glucosidasa fue llevada a cabo mediante el ensayo colorimétrico utilizando el 2-nitrofenil- β -D-glucopiranosido.

8.2 Síntesis del α -glucósido del alcohol homovainillínico [2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil- α -D-glucopiranosido]

La estrategia experimental para la síntesis de análogos de PPG's, consistió en una primera etapa de glicosilación con el fenol tipo C6-C3 alcohol homovainillínico (AHV). Se eligió iniciar con la etapa de glicosilación dado que esta reacción se lleva a cabo en un medio de reacción acuoso en donde los donadores de glicosilo (β -ciclodextrina y almidón) y la aglicona (AHV) son solubles, y en donde las enzimas glicosilantes presentan sus actividades catalíticas óptimas. Una vez preparados, estos compuestos glicosilados se deberán enfrentar a una etapa de esterificación en medios no acuosos. En dichos medios la naturaleza hidrofóbica del glucósido, dada por la presencia del grupo fenilo, deberá facilitar su solubilidad.

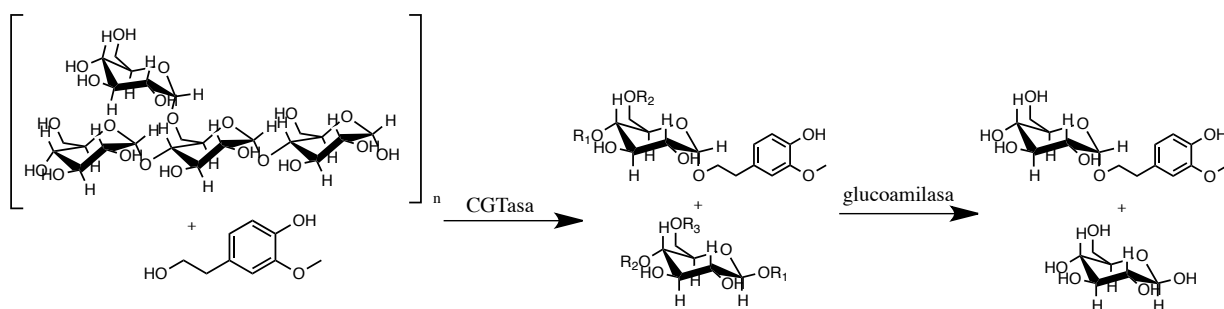


Figura 16.- Reacciones y enzimas involucradas en la síntesis del α -glucósido. R_1 , R_2 y R_3 = Glucosas.

Así entonces, para la síntesis de α -D-glucósido 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil- α -D-glucopiranosido (Glu- α -AHV) utilizando CGTasa partimos de las condiciones descritas por Miranda Molina *et al.* en 2010, la cual fue desarrolladas para la síntesis de glucósidos de inosítoles. La estrategia contempla dos etapas enzimáticas, en la primera etapa se utilizó alcohol homovainillínico (1 M) y almidón (10 % p/v), empleando como biocatalizador la enzima CGTasa de *Thermoanaerobacter sp.* a una concentración de 20 U/ml durante 24 horas de reacción. Terminado el tiempo de reacción se analizaron los productos a fin de establecer los rendimientos del proceso. La segunda etapa comprendió una reacción con la glucoamilasa de *A. niger* (Figura 16) a fin de eliminar los compuestos poliglucosilados y en consecuencia mejorar el rendimiento del producto monoglucosilado. En este procedimiento utilizamos la glucoamilasa de *A. niger* a una concentración de 258 U/ml durante 48 horas. Esta enzima presenta una actividad tipo exoglucanasa (Stoffer B. *et al.*, 1993), lo cual permite la generación de productos monoglucosilados. El monitoreo de cada etapa enzimática se realizó mediante análisis por TLC. En dichas placas, se observa al final de la primera etapa enzimática productos de glucosilación de gran tamaño. Estos mismos fueron hidrolizados en la etapa con la glucoamilasa hasta obtener un producto monoglucosilado. En la figura 17 se presentan los resultados obtenidos en la etapa con la glucoamilasa, sobre el cual se obtuvo un rendimiento aproximadamente del 8%. Al explorar la posibilidad de utilizar β -ciclodextrina como sustrato donador de glucosilo se observaron bajos rendimientos (<1%) en la glucosilación, aunque se obtuvo por este procedimiento un sólo producto de reacción. El producto obtenido fue identificado cualitativa y cuantitativamente en ambas reacciones, donde presentó un R_f similar al del 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil- β -D-

galactopiranosido (Gal- β -AHV) sintetizado previamente en nuestro grupo de investigación (López-Munguía *et al.*, 2011).

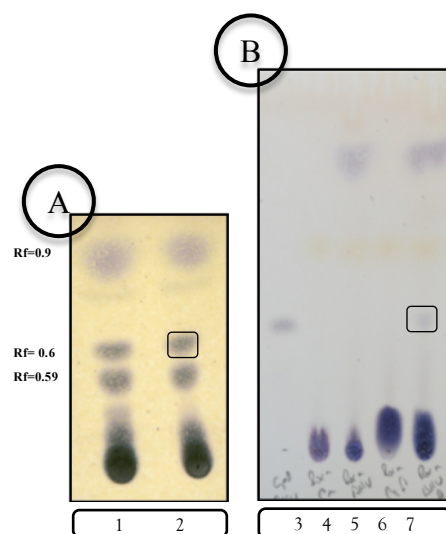


Figura 17.- TLC de reacciones para síntesis del 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil- α -D-glucopiranosido. A: Reacciones de síntesis utilizando almidón como donador de glucosilo; B: Reacciones con β -ciclodextrina. Los carriles de las placas son: 1 y 5: reacciones con CGTasa y aceptor, 2 y 7: reacciones de digestión con glucoamilasa, 3: Gal- β -AHV, 4: reacción con CGTasa sin aceptor, 6: reacción del carril 4 con glucoamilasa. \square producto de glucosilación esperado.

El uso de la enzima CGTasa para la síntesis del 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil- α -D-glucopiranosido resultó exitoso. Sin embargo, en su síntesis fue necesario llevar a cabo la hidrólisis de productos de un mayor grado de glucosilación generados por la primer enzima, los cuales fueron degradados utilizando la enzima glucoamilasa de *A. niger*. Por otra parte, el empleo de un donador de glucosilo como el almidón presentó una mejora en la concentración de producto en comparación de un sustrato como la β -ciclodextrina.

8.2.1 Purificación del α -glucósido del alcohol homovainillínico

La purificación del α -glucósido del alcohol homovainillínico (Glu- α -AHV) se logró mediante desarrollo de una metodología de purificación en un equipo de cromatografía flash. Para la preparación de las muestras se realizó una extracción previa del exceso de aceptor (alcohol homovainillínico) con cloroformo, adicionalmente se realizaron 2 extracciones con 2-metil-2-

butanol (2M2B). Las fracciones recolectadas fueron colocadas en sílica flash en una relación 1:30 para su purificación en el equipo de cromatografía flash.

La estrategia de purificación en el equipo de cromatografía flash consistió en la aplicación de dos etapas. En la primera de ellas se utilizó como fase estacionaria una columna de sílica aminada, y como fase móvil acetato de etilo:metanol en gradiente, partiendo de una condición con únicamente acetato de etilo, y mezclando con metanol hasta llegar a una relación 50:50. El uso de esta columna tuvo como principal objetivo eluir en las primeras fracciones a los compuestos no polares (AHV) y el retener de manera efectiva los compuestos polares (producto glicosilado y donador de glicosilo). De hecho, al tratarse de una columna basada en sustituyentes polares debería retener a estos últimos de manera preferencial. Una vez aplicado el gradiente de elución, se observa en las primeras fracciones eluidas (4-5) la presencia de AHV residual, confirmando su baja retención en la columna debido a su naturaleza hidrofóbica (Figura 18). Posteriormente, se observa en fracciones avanzadas del gradiente (11-14) la presencia de los productos glicosilados y de los azúcares residuales (14-16). Cabe mencionar que la presencia de los azúcares se detectó por TLC, dado que estos compuestos no absorben en el espectro UV. Es importante subrayar el cambio drástico de polaridad que se observa al incorporar un sustituyente glucosilo sobre la molécula del AHV. En efecto, la retención del Glu- α -AHV en la columna aminada corresponde al comportamiento de un azúcar eluido en una columna de sílica aminada, por lo que la presencia de la glucosa en el compuesto incrementa significativamente su polaridad. Como se ha informado en la literatura, este incremento en la polaridad influye de manera directa en las propiedades farmacocinéticas de las moléculas, en este caso, modificando su solubilidad, su absorción y su estabilidad fisiológica (Meulenbeld y Hartmans, 2000; van Rantwijk *et al*, 1999).

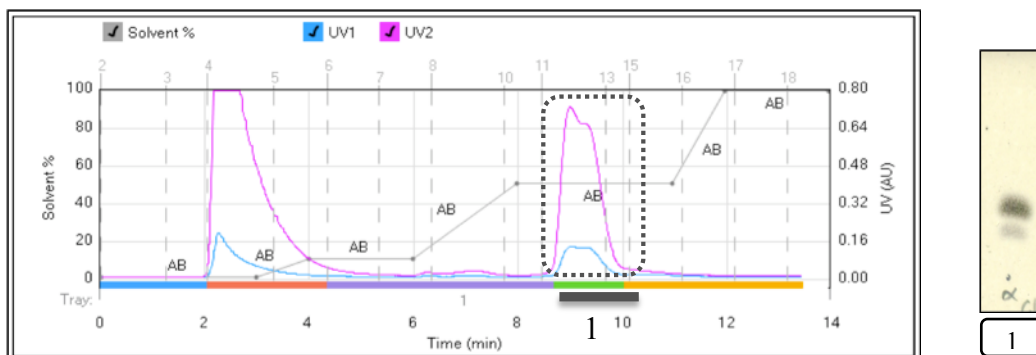


Figura 18.- Cromatograma de purificación de productos de α -glucosilación. El cromatograma fue obtenido en el equipo Reveleris de cromatografía flash utilizando una columna amino utilizando como fase móvil acetato de etilo:metanol. La línea punteada corresponde al producto.

En términos de la pureza del producto, se observa que las fracciones asignadas al producto (11-14) presentan al menos dos compuestos no separados. Por lo tanto, a partir de esta mezcla aislada, se procedió a su separación mediante el uso de una columna de fase reversa, utilizando como fase móvil agua:metanol en gradiente partiendo de agua, mezclando con metanol hasta llegar a una relación de 55:45. En la figura 19 se presenta el perfil de purificación obtenido con esta estrategia. Si bien se observa que la separación de los dos compuestos no es completa, al analizar por TLC las fracciones correspondientes al inicio (6-7) y al final (8) de la purificación, se observa que estas contienen fracciones con productos puros. Se observa también que el segundo pico presenta un R_f similar al del compuesto galactosilado previamente preparado en el laboratorio y utilizado como standard de referencia (López-Munguía A. *et al.*, 2011). Bajo estas observaciones y con los análisis estructurales presentados en secciones posteriores se confirmó que este pico corresponde al producto Glu- α -AHV. Mediante los análisis realizados al pico uno de la separación con la columna fase reversa, proponemos que este compuesto es un producto de degradación y por lo tanto lo descartamos para su estudio. El análisis por HPLC realizado al compuesto recuperado en el pico 2 y comparado con el Gal- β -AHV utilizado como standard confirmó la pureza del producto.

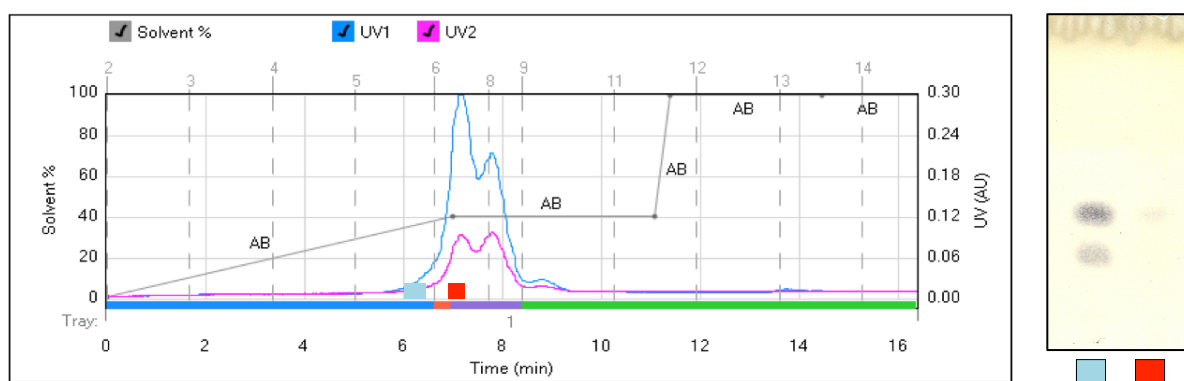


Figura 19.- Cromatograma de purificación del 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil- α -D-glucopiranosido por fase reversa. El cromatograma fue obtenido en el equipo Reveleris de cromatografía flash utilizando una columna C-18 utilizando como fase móvil agua:metanol. Los recuadros de color en el cromatograma corresponden a los puntos de la TLC.

8.3 Síntesis del β -glucósido de alcohol homovainillínico 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil- β -D-glucopiranosido

Para llevar a cabo la síntesis del intermediario β -glucosidado de alcohol homovainillínico requerido en la síntesis del correspondiente PPG con una configuración anomérica en β , se utilizó alcohol homovainillínico como aceptor (0.8 M) y celobiosa como donador de glucosilo (0.8 M), utilizandose como biocatalizador la enzima β -glucosidasa de *T. maritima* purificada (5 U/ml) durante 24 horas de reacción (Figura 20). La mezcla de reacción se analizó por TLC (Figura 21), en donde se observa que el producto obtenido presenta un R_f similar al del Gal- β -AHV utilizado como referencia, así como al R_f del α -glucósido sintetizado previamente.

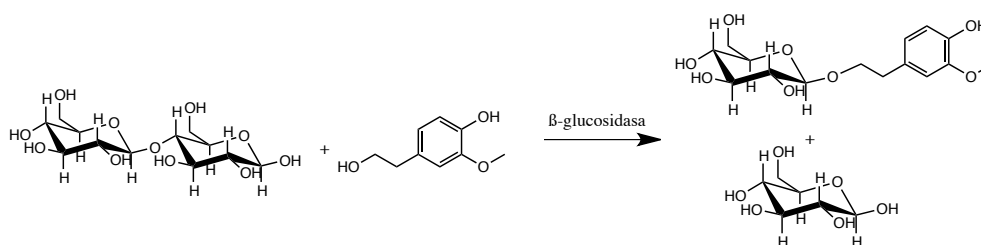


Figura 20.- Reacción catalizada por la enzima β -glucosidasa para la síntesis del β -glucósido.

En la síntesis del Glu- β -AHV se evaluaron dos diferentes donadores de glucosilo: la D-glucosa (0.8 M) y la celobiosa (0.8 M). El uso de cada uno de estos donadores permitió estudiar la reacción de glucosilación a través de dos mecanismos diferentes: la hidrólisis inversa y la transglucosidación respectivamente.

En estas reacciones la conversión de AHV obtenida por transglucosidación fue del 10%, mientras que para la hidrólisis inversa la conversión fué de un 4%. Estos resultados revelan que la enzima β -glucosidasa presenta mejores conversiones para un mecanismo de transglucosilación. En efecto, esta enzima puede llevar a cabo la síntesis de glucósidos por un mecanismo de hidrólisis inversa pero aparentemente con una menor conversión. En este trabajo no se realizaron estrategias para mejorar los porcentajes de conversión, debido a que el propósito del trabajo consistió primordialmente en el desarrollo de una metodología de síntesis de variantes estructurales de PPG's para su evaluación como antioxidantes. Aunque se ha visto que otro tipo de glicosidasas, como la β -galactosidasa de *K. lactis* son capaces de mostrar conversiones de hasta un 40% (Lopez Munguía *et al.*, 2011); en el caso de las reacciones aquí presentadas las conversiones obtenidas

fueron adecuadas para la obtención de las cantidades necesarias de producto útiles en etapas posteriores del proyecto.

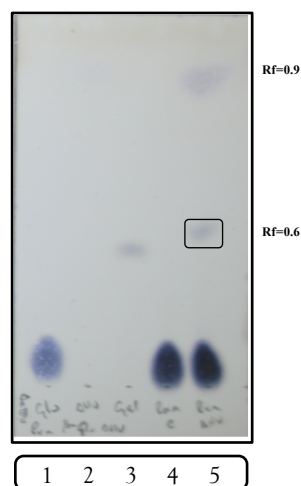


Figura 21.- TLC de la reacción de síntesis de 2-(4-hidroxí-3-metoxifenil)etil- β -D-glucopiranosido. Las enzima utilizada para este ensayo fue la β -glucosidasa de *T. maritima*. Los carriles contienen 1: D-(+)-glucosa, 2: alcohol homovainillínico 3: Gal- β -AHV, 4: reacción sin aceptor, 5: reacción con aceptor. \square producto de glucosilación.

8.3.1 Purificación del β -glucósido de alcohol homovainillínico

La purificación del β -glucósido se logró empleando una metodología similar a la utilizada en la purificación del α -glucósido de alcohol homovainillínico. Esta estrategia consistió en el empleo de un sistema de cromatografía flash. Debido a la presencia de un solo producto de reacción, sólo fue necesario el empleo de la primera etapa de purificación con una columna de sílica aminada (Figura 22), utilizando como fase móvil acetato de etilo:metanol en gradiente, partiendo de una condición con únicamente acetato de etilo, y mezclando con metanol hasta llegar a una relación 50:50. El perfil de purificación obtenido fue similar al del Glu- α -AHV, en donde el primero de los componentes en eluir de la columna fue el AHV (fracciones 4-7), posteriormente el producto glucosilado (fracciones 13-15) junto al donador de glucosilo en exceso (fracciones 17-18). Como puede observarse, el producto no se mezcla con algún otro componente.

Las características polares del Glu- β -AHV fueron similares a las observadas en el Glu- α -AHV, donde la presencia de glucosa disminuyó significativamente la hidrofobicidad del AHV. Por otro lado, no existieron diferencias en los tiempos de retención, ni en los R_f de ambos glucósidos originados por su configuración, los cuales se compararon contra el Gal- β -AHV sintetizado por nuestro grupo.

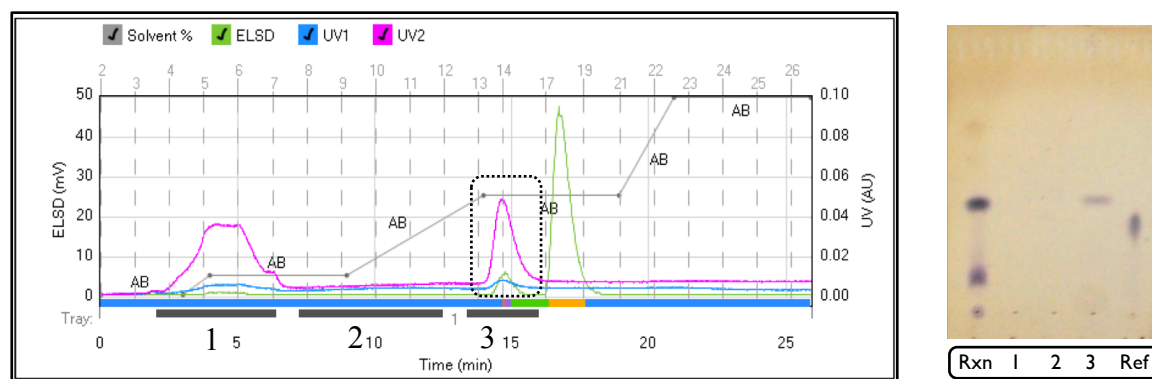


Figura 22.- Cromatograma de purificación del 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil- β -D-glucopiranosido y placa de fracciones colectadas. El cromatograma fue obtenido en el equipo Reveleris de cromatografía flash utilizando una columna amino utilizando como fase móvil acetato de etilo:metanol. La línea punteada corresponde al producto esperado. Rxn: crudo de reacción; Ref: glucósido de referencia 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil- β -D-galactopiranosido.

8.4 Análisis estructural de glucósidos

El análisis estructural de los glucósidos generados se realizó mediante estudios de RMN y espectroscopía de masas. Para la determinación de la estructura se obtuvieron espectros de RMN de ^{13}C y ^1H , en los que se utilizó CD_3OD como disolvente. Los desplazamientos químicos se presentan en ppm, y se utilizó como referencia tetrametilsilano. La confirmación de su masa se determinó por experimentos de espectroscopía de masas de iones FAB^+ (Figuras 40 y 41).

En la Figura 23 se presenta el espectro 400 Mhz de ^1H del Glu- β -AHV, en los cuales se observan las señales correspondientes a la aglicona, y al glúcido presente. A campo bajo se observan las señales correspondientes a los protones del tipo aromático, las cuales se observan entre 6.5 y 7 ppm. Las señales de los protones base de oxígeno del azúcar se presentan entre 3 y 4.5 ppm. En la región de los protones base de oxígeno se identificó la señal del carbono anomérico, la cual fue asignada a partir de su desplazamiento químico y acoplamiento de sus señales ($\delta=4,301$, $J_{1,2}=8$).

Debido al desplazamiento químico de este protón, es posible determinar que la glucosilación se presentó sobre la cadena alifática del compuesto. Esto confirma que la glucosilación del alcohol homovainillínico se presentó sobre el hidroxilo de cadena alifática, lo cual demuestra, como se ha descrito en otros trabajos, que los hidroxilo primarios presentan un mejor carácter nucleofílico (Mena-Arizmendi *et al.*, 2011).

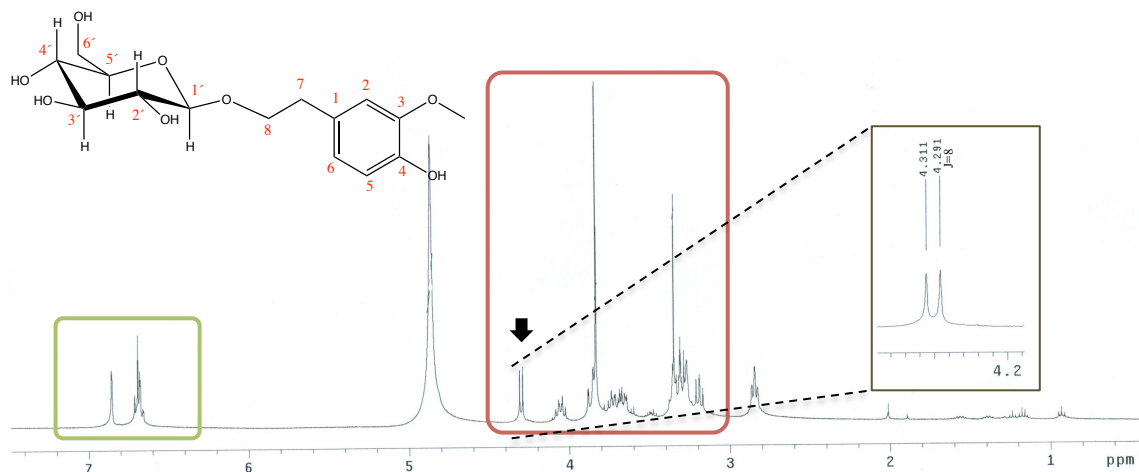


Figura 23.- Espectro de RMN de ^1H del 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil- β -D-glucopiranosido. Espectro de ^1H obtenido sobre CD_3OD a 400 Mhz utilizando como referencia tetrametilsilano. El recuadro verde muestra las señales de protones aromáticos en la molécula, y el recuadro rojo los de base de oxígeno. La flecha indica cual es el carbono anomérico del compuesto y el recuadro muestra una ampliación de este.

Las señales a campo alto en el espectro (Figura 23) corresponden a los protones de la cadena alifática del compuesto (**H8**: $\delta=3.190$, $J=7.6$; **H7**: $\delta=2.486$, $J=6.8$), y los de campo bajo corresponde a los del sistema aromático (**H2**: $\delta=6.855$; **H6**: $\delta=6.855$, $J=7.6$; **H5**: $\delta=6.666$, $J=8$). Los protones del sistema de base de oxígeno fueron asignados a partir de los acoplamiento de sus señales (**H5'**: $\delta=4.056$, $J=7.2$, $J=9.6$; **H6'**: $\delta=3.726$, $J=9.6$ Hz, $J=14.8$; **H4'**: $\delta=3.664$, $J=5.2$, $J=11.6$; **H3'**: $\delta=3.485$, $J=7.6$, $J=14$; **H2'**: $\delta=3.326$, multiplete), así como las señales descritas en los glucósidos previamente descritos por nuestro grupo.

El espectro de ^{13}C del β -glucósido fue obtenido a 100 Mhz, y en él se presentan las señales obtenidas por las moléculas, donde su número y tipo de desplazamiento confirma la naturaleza glucosídica del compuesto. La señal del carbono anomérico muestra un desplazamiento de 104.486 ppm, el cual presenta valores similares a los reportados por otro tipo de glicósidos de AHV (López-Munguía *et al.*, 2011). Se identifican en este espectro señales de los carbonos del

sistema aromático a campo bajo y de los carbonos del azúcar a campo alto (C3': $\delta=78.092$; C5': $\delta=78.274$; C2': $\delta=72.116$; C4': $\delta=71.843$; C6': $\delta=62.954$) respecto al carbono anomérico. Las señales a campo alto corresponden al grupo metoxilo ($\delta=56.583$) y al C7 ($\delta=56.583$) del AHV.

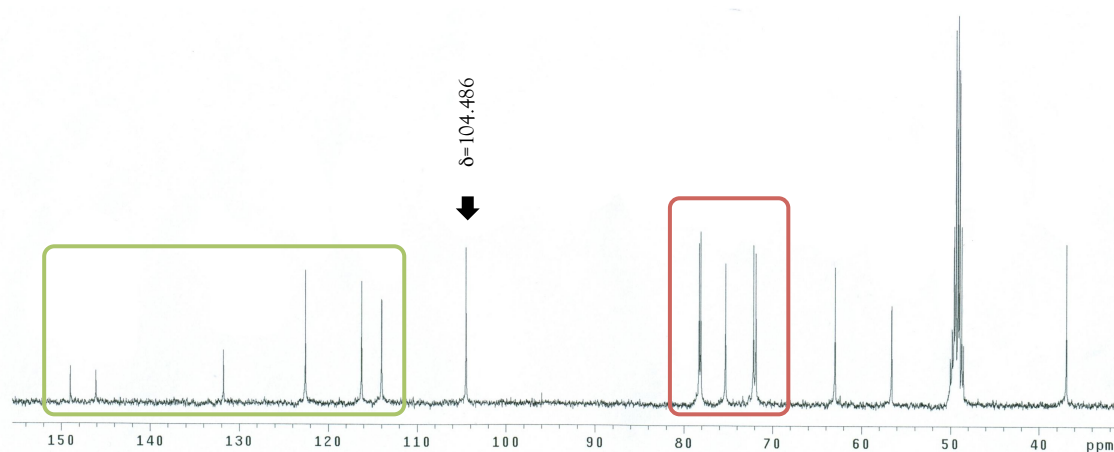


Figura 24.- Espectros de RMN ^{13}C del 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil- β -D-glucopiranosido. Espectro de ^{13}C obtenido sobre CD_3OD a 100 Mhz utilizando como referencia tetrametilsilano. El recuadro verde muestra las señales de los carbonos aromáticos de la molécula, y el recuadro rojo los del azúcar. La flecha indica cual es el carbono anomérico del compuesto, así como su desplazamiento químico.

Los resultados obtenidos en los espectros confirman la presencia de un compuesto formado por glucosa y alcohol homovainillínico, el cual se une mediante un enlace glucosídico por el extremo alifático del alcohol (Figura 24). Este análisis estructural revela que la selectividad de la enzima β -glucosidasa de *T. maritima*, ocurre hacia el hidroxilo alifático del alcohol homovainillínico. Esta selectividad por parte de la enzima presenta una ventaja funcional, ya que esta no glucosila sobre el hidroxilo fenólico del alcohol homovaninllínico, el cual está relacionado con la actividad antioxidante del compuesto. La confirmación de la masa del β -glucósido se confirmó por espectroscopía de masas, donde su masa experimental fue de 331.141 g/mol, con fórmula mínima $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{O}_8$ (Figura 40).

El espectro de ^1H del α -glucósido obtenido a 200 Mhz (Figura 25) presenta un perfil de señales muy similar al producto con orientación en β . Sin embargo, la señal que corresponde al carbono anomérico muestra el desplazamiento químico y el acoplamiento esperado para esta orientación ($\delta=3.857$, $J= 4.8$). Además el espectro de masas para este compuesto confirma el peso molecular esperado (Figura 41), donde su masa experimental fue de 331.141 g/mol, con fórmula mínima

C₁₅H₂₃O₈. La asignación total no fue obtenida debido a la baja resolución del espectro, por lo que su elucidación estructural está pendiente.

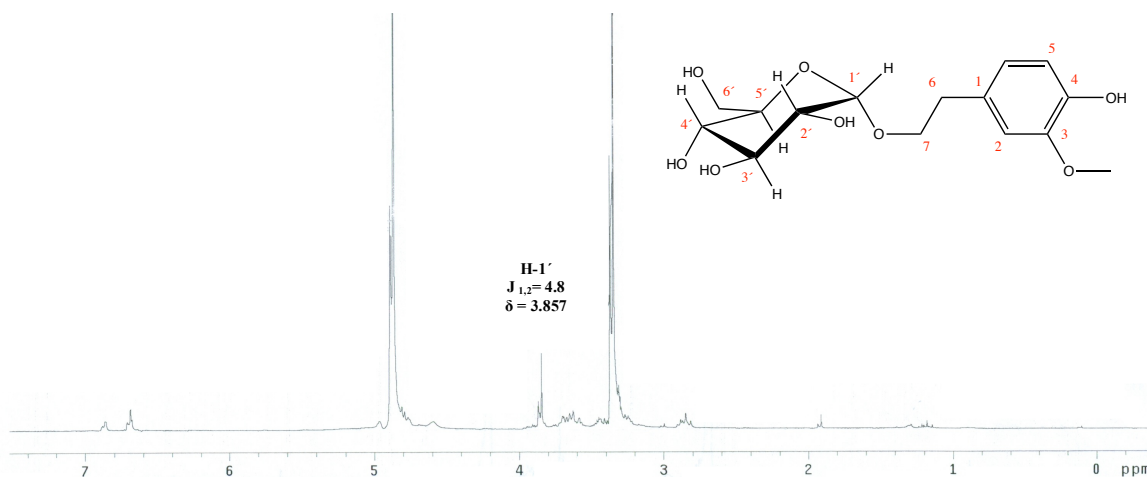


Figura 25. Espectros de RMN de ¹H del 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil-α-D-glucopiranosido. Espectro de ¹H obtenido sobre CD₃OD a 200 Mhz utilizando como referencia tetrametilsilano.

8.5 Síntesis de PPGs

Para la síntesis total de PPGs, se utilizaron condiciones similares a las descritas por Lopez-Munguía *et al.* en 2011, las cuales fueron empleadas en la obtención de PPGs de galactosa (Figura 9). Estas se basan en la esterificación de los glucósidos sintetizados en las etapas previas utilizando los ácidos fenilpropanoides. Para nuestros PPGs utilizamos fenilpropanoides hidrogenados: ácido dihidroferúlico y dihidrocafeico, los cuales se sintetizaron a partir de la hidrogenación catalizada con Pd-C e H₂, a partir de los ácidos ferúlico y cafeico (metodología descrita en materiales y métodos). Se sintetizaron PPGs de ácidos saturados debido a que estos presentan altas conversiones en reacciones de esterificación (Cassani *et al.*, 2007), además de no modificar sus propiedades antioxidantes en comparación con los correspondientes insaturados (López-Munguía *et al.*, 2011).

Como condiciones de reacción se utilizó una concentración de 140 mM para los ácidos fenilpropanoides (ácidos dihidroferúlico y dihidrocafeico) y de 70 mM en los aceptores (Glu-α-AHV Glu-β-AHV) para favorecer una alta conversión con respecto al aceptor (Figura 26). Como

biocatalizador se utilizó la lipasa B de *C. antarctica* (CalB) a una concentración de 50 mg/ml, utilizando como medio de reacción 2-metil-2-butanol:acetonitrilo (90:10), un medio de reacción en el cual la lipasa presenta buenas condiciones para llevar a cabo la esterificación de moléculas, minimizando la reacción de hidrólisis del producto. Durante la reacción de esterificación se genera agua como producto de reacción, por lo que fue necesario añadir tamiz molecular (100 mg/ml) para atrapar el agua generada durante el avance de la reacción. Las reacciones se incubaron a 65°C, y fueron monitoreadas mediante TLC empleando la fase móvil utilizada en la identificación de glucósidos. El producto de reacción fue identificado en placa a partir de las 6 horas. Sin embargo, las reacciones fueron incubadas durante 5 días ya que mayores conversiones se observaron a un mayor tiempo de reacción.

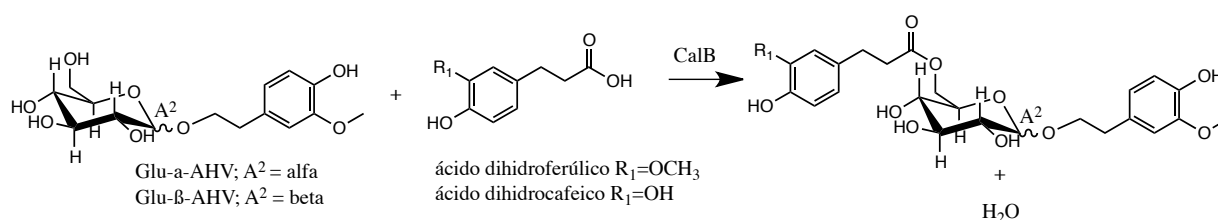


Figura 26.- síntesis de PPGs mediante reacciones la esterificación catalizada por CalB. En los reactantes se muestran los sustratos utilizados para la síntesis de los cuatro PPGs sintetizados en este trabajo.

Los productos obtenidos después de 5 días de reacción se presentan en la figura 27, los cuales fueron identificados como: PPG-β-DHF (R_f=0.63), identificado como producto de la reacción entre el Glu-β-AHV y el ácido dihidroferúlico (Figura 27-A); PPG-β-DHC (R_f=0.55), identificado como producto de la reacción entre el Glu-β-AHV y el ácido dihidrocafeico (Figura 27-B); PPG-α-DHF (R_f=0.63), identificado como producto de la reacción entre el Glu-α-AHV y el ácido dihidroferúlico (Figura 27-C); PPG-α-DHC (R_f=0.54), identificado como producto de la reacción entre el Glu-α-AHV y el ácido dihidrocafeico (Figura 27-D). Es importante destacar que para cada reacción se obtuvo sólo un producto, y que los PPGs sintetizados a partir de ácidos similares, presentaron un R_f similar. El valor de R_f nos confirma que la presencia de glucosa permite mantener la polaridad de molécula, una propiedad que no se modifica de manera significativa cuando se adiciona otro grupo hidrofóbico al glucósido. Los PPGs sintetizados con ácido dihidroferúlico presentaron una mayor hidrofobicidad que los sintetizados de ácido

dihidrocafeico. Este cambio en la hidrofobicidad de los productos se debe a la presencia del grupo metoxilo en el ácido dihidroferúlico.

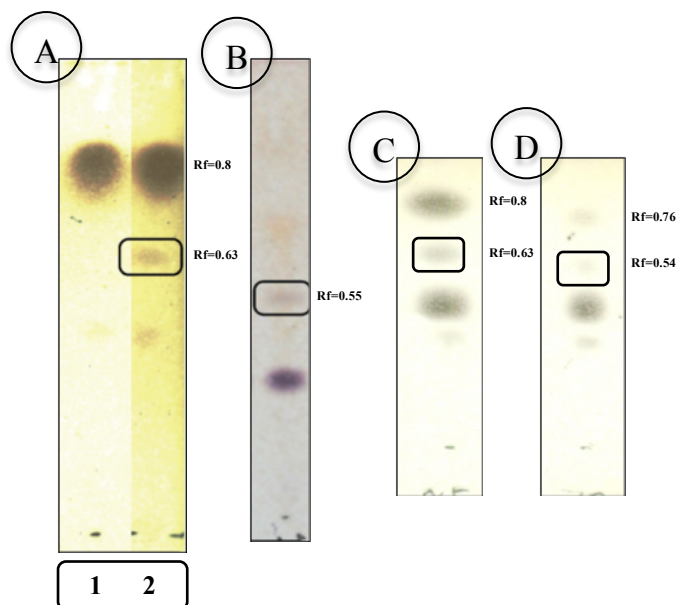


Figura 27.- Placas de TLC de reacciones de esterificación entre glucósidos y ácidos fenil propanoides utilizando CalB como biocatalizador. A: Síntesis del PPG- β -DHF, el carril 1 muestra el t_0 y el carril 2 el t_r . B: Síntesis del PPG- β -DHC. C: Síntesis del PPG- α -DHF. D: Síntesis del PPG- α -DHC. \square Producto de esterificación.

En un análisis por HPLC de los productos obtenidos, se observó que éstos presentan tiempos de retención distintos según el ácido presente (datos nos mostrados), donde los PPGs que contienen ácido dihidroferúlico son más hidrofóbicos que los que contienen dihidrocafeico. El R_f de los productos, así como el tiempo de retención de los productos fue muy similar al del PPG (4-hidroxi-3-metoxifenil)metil-6-O-dihidrocafeil- β -D-galactopiranosido sintetizado y descrito por nuestro laboratorio (Lopez-Munguía *et al.*, 2010).

La estrategia utilizada en este proyecto para la síntesis de PPGs, la cual consiste en la esterificación de glicósidos de alcoholes fenólicos con fenilpropanoides resultó ser una estrategia exitosa en la construcción de PPGs con núcleo de glucosa, y distinta configuración anomérica. Así, los procedimientos enzimáticos revelan que un diseño experimental apropiado permite la generación de moléculas que además de sintetizar moléculas no descritas anteriormente, permiten obtener una variación estructural que puede ser estudiada.

A partir del peso de los productos purificados, así como del aceptor (reactivo limitante) utilizado en las reacciones se calcularon las conversiones para cada uno de los productos obtenidos, las cuales se presentan en la tabla 2, donde se muestra que los valores obtenidos se encuentran entre el 22,7-40 %.

Tabla 2.- PPGs sintetizados y conversiones obtenidas a partir de la esterificación de glucósidos con CalB.

Producto	Clave	Conversión (%)
2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil-6-O-dihidrocafeil- β -D-glucopiranosido	PPG- β -DHC	40
2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil-6-O-dihidroferuloil- β -D-glucopiranosido	PPG- β -DHF	22,7
2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil-6-O-dihidrocafeil- α -D-glucopiranosido	PPG- α -DHC	24,9
2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil-6-O-dihidroferuloil- α -D-glucopiranosido	PPG- α -DHF	34,9

8.5.1 Purificación de PPGs

Para el aislamiento de los productos de esterificación (PPGs), se desarrolló un método de purificación por cromatografía flash utilizando el equipo Reveleris (GRACE ®). En este proceso la muestra fue previamente adsorbida en sílica utilizando una relación 1:30 con respecto a la mezcla de reacción. Se utilizó en la purificación de los productos una columna de sílica aminada, empleando como fase móvil cloroformo:metanol (85:15) en condiciones isocráticas. El propósito de utilizar una columna aminada fue utilizar una fase estacionaria de alta polaridad con alta afinidad para el producto de esterificación y el glucósido, y una menor afinidad para el donador de acilo. El perfil de purificación observado fue similar para los PPG's obtenidos con donadores de acilo común.

La figura 28 muestra el cromatograma de purificación del PPG- β -DHF, en el cual se observa que uno de los primeros productos en eluir es el exceso de ácido dihidroferúlico (fracción 4), posteriormente en fracciones avanzadas eluye el producto de esterificación (fracciones 8-9) y finalmente el exceso de Glu- β -AHV utilizado como aceptor de la reacción (fracciones 10-17). En efecto, estos resultados revelan que la hidrofobicidad del producto PPG- β -DHF es mayor a la del glucósido Glu- β -AHV correspondiente. En los casos en los que la separación no fue total se

aplicó un segundo ciclo de purificación, lo cual permitió aislar el producto con una alta pureza (comprobada por HPLC).

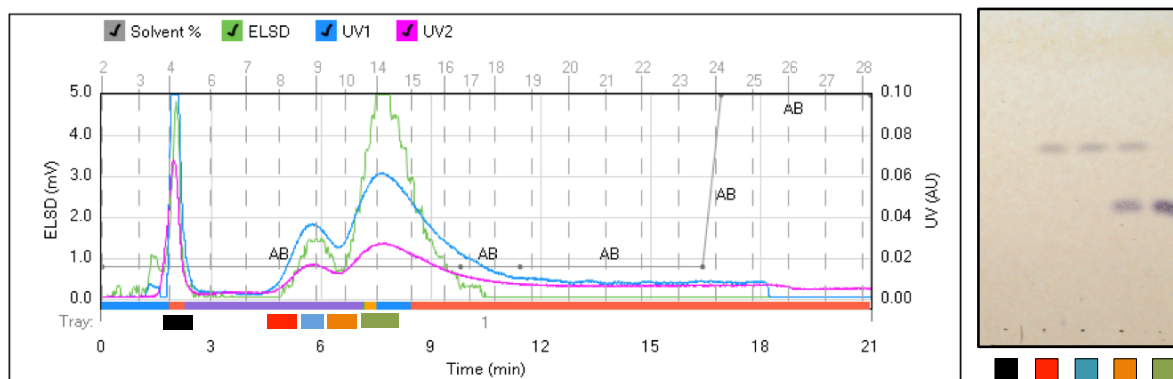


Figura 28.- Cromatograma de purificación del 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil-6-O-dihidroferuloil- β -D-glucopiranosido. El cromatograma fue obtenido utilizando como fase estacionaria una columna aminada de 12 g y como fase móvil cloroformo:metanol, la placa de TLC fue obtenida utilizando como fase móvil acetato de etilo:metanol:agua (23:4:3), los spots analizados corresponden a las fracciones obtenidas durante la purificación.

8.5.1.1 Análisis estructural de PPGs

En análisis estructural de los PPGs sintetizados no ha sido completado para todos los compuestos generados. Sin embargo, se cuenta con espectros de masas para algunos de ellos, los cuales fueron de utilidad en la confirmación de su masa. Se realizó un estudio detallado de RMN de ^1H y ^{13}C para el PPG- β -DHF, así como estudios complementarios de 2-D homonucleares como gCOSY, y experimentos heteronucleares como HMBC y HSQC.

La asignación estructural se realizó a partir de espectros generados en 2-D y 1-D. La Figura 29 se presenta el experimento de gHSQC obtenido para el compuesto PPG- β -DHF, donde se observan las señales correspondientes para el carbono anomérico (H: $\delta=4.239$ y C: $\delta=102.891$). Las señales encontradas a campo bajo del carbono anomérico corresponden a los sistemas aromáticos presentes en la molécula (C6'': $\delta=121.433$; C6: $\delta=120.833$; C5'': $\delta=114.474$; C5: $\delta=114.359$; C2'': $\delta=111.474$; C2: $\delta=111.035$) (H6'': J=8, $\delta=6.832$; H6: J=8, $\delta=6.823$; H2'': J=1.6, $\delta=6.727$; H2: J=1.6, $\delta=6.711$; H5'': J=10.4, $\delta=6.678$; H5: J=9.6, $\delta=6.663$), mientras que a campo alto del carbono anomérico se presentan señales del sistema alifático de la molécula (C7'': $\delta=36.045$; C7: $\delta=30.597$) (H7: $\delta=2.865$, J=7.2; C7'': $\delta=2.669$, J=8).

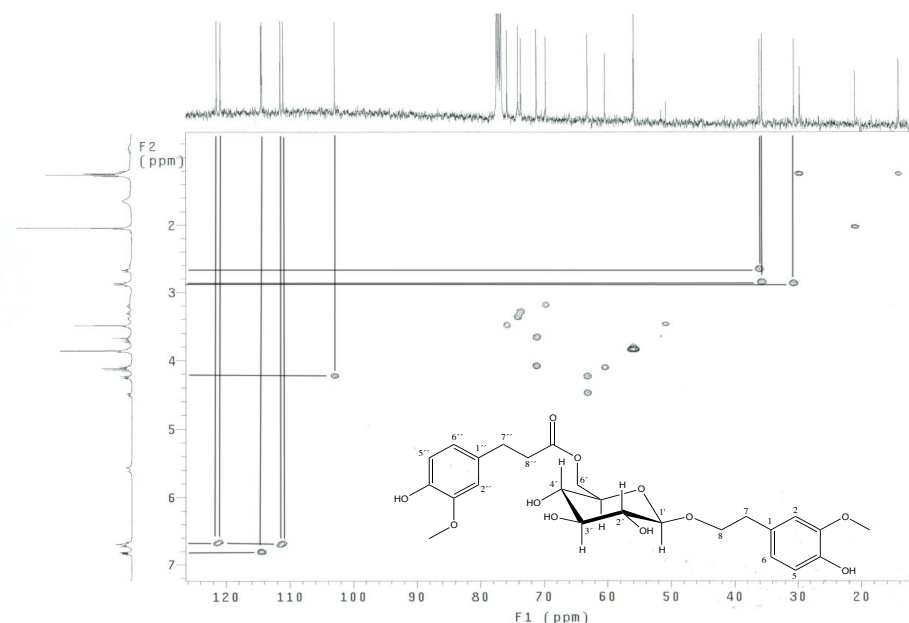


Figura 29. Espectro gHSQC del PPG AHV-β-DHF. Con línea se indica la asignación de las señales marcadas en la molécula.

Para la designación de H en el carbohidrato se utilizó el experimento gCOSY (Figura 30), sobre el cual fue de utilidad el desplazamiento del carbono anomérico, y a partir de éste se obtuvo la correlación de los ^1H del sistema base de oxígeno. En la figura 31 se presenta una ampliación de la región no asignada en la figura 24. Las señales identificadas en esta figura revelan los H y C del carbohidrato, así como de algunos grupos alifáticos de la molécula y los grupos $-\text{OCH}_3$ ($\text{C}3'$: $\delta=75.737$; $\text{C}5'$: $\delta=74.023$; $\text{C}2'$: $\delta=73.555$; $\text{C}8''$: $\delta=71.123$; $\text{C}4'$: $\delta=69.629$; $\text{C}6'$: $\delta=63.083$; $\text{C}8$: $\delta=60.373$; $-\text{OCH}_3$: $\delta=55.906$ y $\delta=50.838$) ($\text{H}6'$: $\delta=4.495$, $J=4.2$, $J=12$; $\text{H}8$: $\delta=4.349$, $J=5.6$; $-\text{OCH}_3$: $\delta=3.858$; $\text{H}8''$: $\delta=3.728$, $J=7.2$; $-\text{OCH}_3$: $\delta=3.486$; $\text{H}3'$: $\delta=3.500$, $J=5.6$; $\text{H}5'$: $\delta=3.380$, multiplete; $\text{H}2'$: $\delta=3.300$, $J=6.9$, $J=7.3$; $\text{H}4'$: $\delta=3.190$, $J=7.2$, $J=7.8$). Por otra parte, el análisis de masas FAB⁺ confirmó el peso molecular del PPG-β-DHF de 509.189 g/mol con una fórmula mínima de $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{O}_{11}$ (Figura 42). El perfil de masas encontrado para el PPG-α-DHF (Figura 43) fue similar al del PPG-β-DHC, con una masa de 509.199 g/mol con una fórmula mínima de $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{O}_{11}$ por lo que sugerimos que la naturaleza del PPG es estructuralmente similar, aunque es necesario hacer los análisis de RMN correspondientes para confirmar esta afirmación.

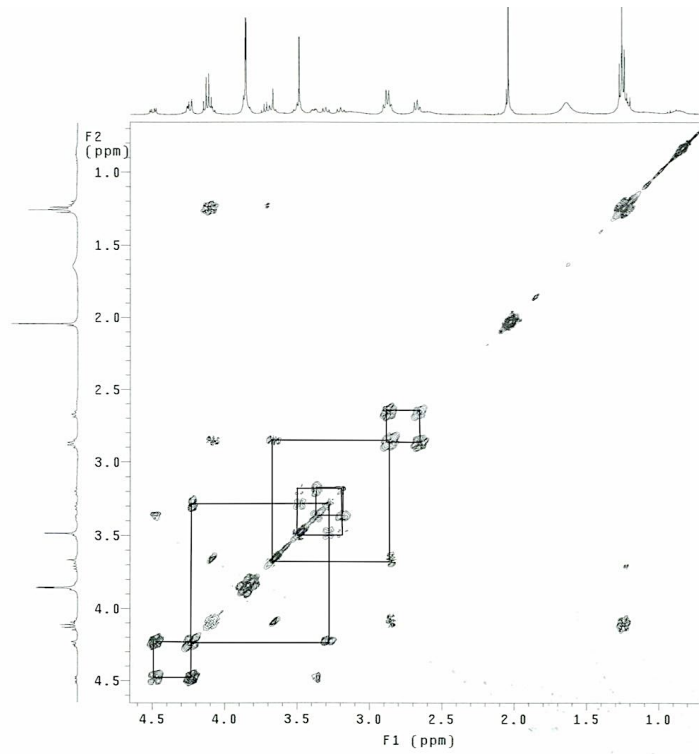


Figura 30. Espectro gCOSY del PPG AHV- β -DHF.

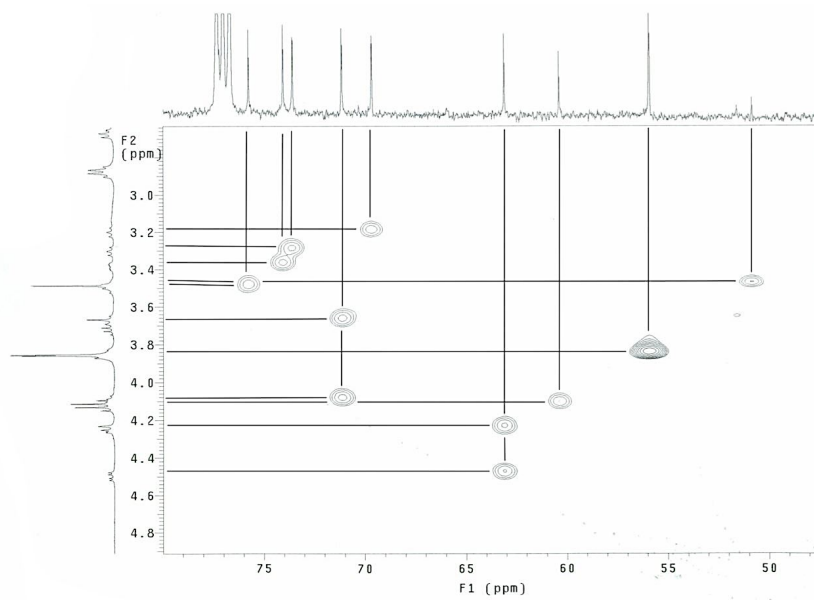


Figura 31. Espectro gHSQC del PPG AHV- β -DHF.

8.6 Actividad antioxidante de glucósidos de alcohol homovainillínico y PPGs sobre el radical DPPH

Para la evaluación de la capacidad antioxidante de las moléculas sintetizadas se empleó al radical artificial 1,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Dicho radical ha sido ampliamente utilizado en el estudio de la actividad atrapadora de radicales en moléculas de composición diversa, permitiendo así comparar la actividad de los compuestos generados en este estudio con la de otros previamente descritos. La determinación de la capacidad antioxidante mediante este radical consiste en exponer distintas concentraciones del agente antioxidante a una concentración radical DPPH constante (100 μ M), la cual ha sido establecida como parámetro de esta metodología, y sobre la cual es importante hacer referencia cuando se reportan propiedades como el valor de la concentración media efectiva (EC_{50}). El ensayo de actividad antioxidante de este radical se basa en la estabilización de radical por acción del antioxidante, lo cual es medido experimentalmente como la desaparición del color violeta del radical utilizando un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 517 nm.

Para la determinación de la capacidad antioxidante de nuestros compuestos se realizaron diluciones de los distintos compuestos y se sometieron a la acción del radical. En la determinación del tiempo final de la reacción fue necesario llevar a cabo el monitoreo de las reacciones, por lo que se llevaron a cabo cinéticas de atrapamiento. El tiempo final de las reacciones fue identificado como el tiempo al cual ya no existen cambios en la absorbancia del radical de la muestra con respecto a nuestro blanco, el cual contiene agua. En las muestras se observaron tiempos finales de segundos como fue el caso del ácido dihidrocafeico y el control positivo de ácido ascórbico, así como tiempos más prolongados como el caso del alcohol homovainillínico que tuvo un tiempo final de 90 min.

Posterior a la identificación del tiempo final de las reacciones, se obtuvieron los porcentajes de atrapamiento a partir de la ecuación descrita en el apartado de materiales y métodos. El porcentaje de atrapamiento es usado para el cálculo del EC_{50} de los antioxidantes. Los resultados para las moléculas evaluadas en nuestro trabajo se presentan en la figura 32. En ésta, los valores de atrapamiento revelan que las líneas marcadas que se encuentran desplazadas hacia el lado izquierdo son los mejores antioxidantes, mientras que las que se encuentran desplazadas hacia el lado derecho los peores antioxidantes.

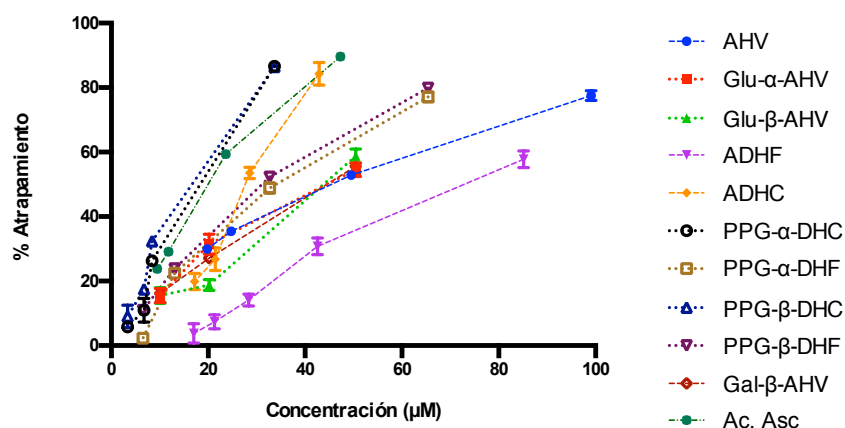


Figura 32.- Curva de atrapamiento del radical DPPH vs concentración.

A partir de los valores del porcentaje de atrapamiento se determinaron de los valores de EC_{50} , los cuales fueron obtenidos a partir del ajuste lineal utilizando los puntos medidos experimentalmente, utilizando el programa de análisis estadístico Prism 6 de Graph Pad®. La desviación descrita fue calculada por el software a partir de los valores y las desviaciones obtenidas experimentalmente. Es importante señalar que los valores de EC_{50} representan la concentración media efectiva para cada antioxidante evaluado con 100 mM del radical DPPH, y que este valor es entendido como la concentración a la cual es posible abatir el 50% del radical utilizado.

En la Figura 33 se presenta una tabla con los valores de EC_{50} obtenidos para las moléculas sintetizadas, así como para los intermediarios utilizados en su síntesis. En esta podemos observar como los PPGs PPG- α -DHC ($13.61 \pm 2.08 \mu\text{M}$) y PPG- β -DHC ($11.73 \pm 0.29 \mu\text{M}$) presentan las mejores actividades antioxidantes de todas las moléculas evaluadas. Este resultado es consistente con el resultado reportado por nuestro grupo (López-Munguía A. *et al.*, 2011), donde los PPGs que contenían ácido cafeico o un derivado similar presentaron las más altas actividades antioxidantes. Por otra parte, la glucosa, el alcohol homovainillínico (AHV) y el ácido dihidroferúlico (ADHF) presentaron las actividades más bajas. El valor de EC_{50} de la glucosa ($>92.5 \times 10^3 \mu\text{M}$) no pudo ser determinada con exactitud. Sin embargo, en las concentraciones evaluadas se pudo determinar una baja actividad antioxidante. Es importante mencionar que en estudios recientes se ha demostrado la función de diferentes carbohidratos como antioxidantes (Hernández-Marín E. *et al.*, 2012). Para el caso del AHV ($56.1 \pm 2.2 \mu\text{M}$) y ADHF ($59.28 \pm 0.28 \mu\text{M}$) la baja actividad antioxidante presentada se debe principalmente a la naturaleza del grupo

antioxidante, la cual es similar en ambas ya que su grupo aromático presenta un arreglo tipo *o*-metoxifenol.

La mejor actividad antioxidante fue observada en el compuesto PPG- β -DHC ($11.73 \pm 0.29 \mu\text{M}$), la cual es aproximadamente el doble de la actividad del ácido ascórbico ($22.60 \pm 0.39 \mu\text{M}$), uno de los antioxidantes más utilizados en la industria alimentaria. Este resultado nos revela que es posible generar estructuras con actividades antioxidantes similares o mejores a la que presentan moléculas previamente descritas. En efecto, se sugiere que estructuralmente existe un efecto aditivo en la actividad antioxidante en la estructura de los PPGs, lo cual permite que se presente una actividad antioxidante tan alta (bajo en EC_{50}).

Además es importante señalar que los glucósidos Glu- α -AHV ($49.64 \pm 1.79 \mu\text{M}$) y Glu- β -AHV ($44.03 \pm 0.472 \mu\text{M}$) mostraron una mejor actividad antioxidante que sus precursores, lo que sugiere una contribución estructural importante por parte del carbohidrato, el cual por sí mismo presentó una actividad casi imperceptible. También se observó una contribución específica en la actividad antioxidante por parte de la estereoquímica del enlace glucosídico, en donde observamos que las configuraciones en β presentan las actividades antioxidantes más altas con valores de EC_{50} más bajos. Cuando se evaluó la actividad antioxidante del 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)metil- β -D-galactopiranosido (Gal- β -AHV) ($44.47 \pm 0.94 \mu\text{M}$) obtenido en trabajos previos, se observó que la actividad de este compuesto con configuración β se situó en valores similares a los obtenidos con el Glu- β -AHV ($44.03 \pm 0.472 \mu\text{M}$) en este trabajo. El efecto positivo en la actividad antioxidante de los compuestos en configuración en β se mantiene presente en otros azúcares, como fue el caso de la galactosa. Este comportamiento es menos perceptible en moléculas como los PPGs, posiblemente debido a su alta capacidad antioxidante.

En resumen, es posible observar que los valores de EC_{50} del glucósido en β presenta una mejor actividad que el glucósido en posición α , resultados que resultan coherentes con los observados previamente para el anómero β del galactósido utilizado como referencia. Este efecto estructural se mantiene sobre los PPGs, aunque los efectos originados por la conformación son menos perceptibles, los anómeros β se mantienen como los más efectivos antioxidantes.

Muestra	EC ₅₀ (μM)
Glucosa	>92.5 x10 ³
AHV	56.1 ± 2.2
Glu-α-AHV	49.64 ± 1.79
Glu-β-AHV	44.03 ± 0.472
ADHF	59.28 ± 0.28
ADHC	29.04 ± 0.87
PPG-α-DHC	13.61 ± 2.08
PPG-α-DHF	32.61 ± 1.12
PPG-β-DHC	11.73 ± 0.29
PPG-β-DHF	30.99 ± 0.44
Gal-β-AHV	44.47 ± 0.94
Ac. ascórbico	22.60 ± 0.39

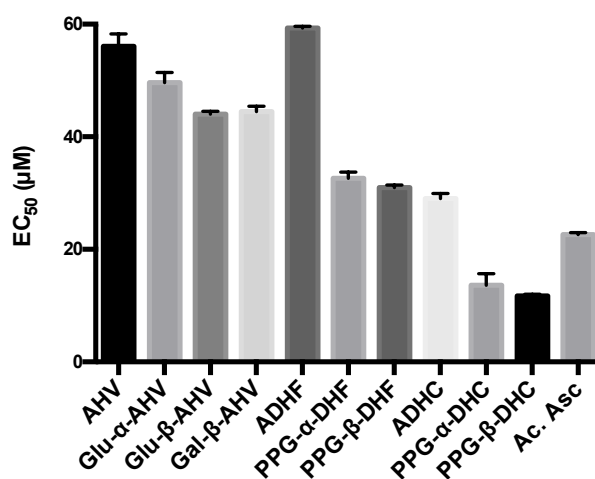


Figura 33.- Valores de EC₅₀ obtenidos para el atrapamiento de radical DPPH. Los valores representan la concentración de antioxidante calculada para disminuir el 50% del radical DPPH a una concentración de 100 mM.

Una observación adicional sobre la actividad antioxidante de los PPGs, es que en éstos se obtuvo un comportamiento similar al observado en los glucósidos. En el gráfico de la figura 33 se pueden observar las modificaciones en el valor del EC₅₀ en función de las transformaciones de los sustratos. Los PPGs presentaron mejores actividades antioxidantes que los precursores (glucosa, AHV, ADHF y ADHC) utilizados en su síntesis, lo cual muestra un efecto aditivo por parte de los componentes de la estructura hacia la actividad antioxidante. Se observa además que los PPGs de ácido dihidrocafeico (PPG-α-DHC y PPG-β-DHC) tuvieron las actividades antioxidantes más altas (bajos valores de EC₅₀), mientras que los PPGs de ácido dihidroferúlico presentaron actividades relativamente más bajas (valores de EC₅₀ más altos). Dicho comportamiento resultó similar al observado en los PPGs sintetizados por nuestro grupo, en donde el sustituyente glicosilo fue un residuo de galactosa. Este comportamiento sugiere que la diferencia en la actividad antioxidante de los PPGs está relacionada con las características propias de los ácidos fenilpropanoides incorporados en la molécula, así, la presencia de un grupo hidroxilo extra en arreglo tipo catecol (*o*-hidroxifenol) presente en el ácido dihidrocafeico le confiere una mejor actividad antioxidante que el correspondiente ácido ferúlico en donde el sustituyente es un grupo -O-metoxi.

Los valores de EC_{50} de los PPGs sintetizados (11.73 a 32.61 μM) presentan valores muy similares al de PPGs aislados de especies vegetales (Tabla 3). Algunos informes como el de Abdel-Mageed *et al.* en 2012, analizaron PPGs con grupos fenólicos tipo catecol, los cuales obtuvieron valores de EC_{50} de 18.61 a 31.9 μM . Los descritos por Suo M. *et al.* en 2013, también conformados por compuestos fenólicos con arreglo catecol tuvieron valores de 4.84 a 17.09 μM . Hamerski L. *et al.* en 2005 describieron un compuesto formado por grupos similares al de nuestras moléculas, el cual obtuvo un valor de 31.59 μM . Los descritos por nuestro grupo (López-Munguía *et al.*, 2011), los cuales son estructuralmente similares a los de este trabajo, con excepción del carbohidrato que contienen, presentaron valores de EC_{50} de 16 a 26.03 μM . Lo cual muestra que los PPGs sintetizados en este proyecto presentan valores muy similares al de otros PPGs previamente descritos.

Por otro lado, se encontró que las mejores actividades antioxidantes las presentaron los PPGs constituidos por ácido dihidrocafeico PPG- β -DHC (11.73 \pm 0.29 μM) PPG- α -DHC (13.61 \pm 2.08 μM), los cuales incluso tuvieron una mejor actividad que el ácido ascórbico (22.60 \pm 0.39 μM). Con base en los resultados obtenidos en este trabajo y a partir de diferentes informes de la literatura, es claro que el arreglo bifenólico que presentan este tipo de compuestos les confiere una mejor actividad antioxidante. Sin embargo, al observar el incremento en la actividad antioxidante que presentaron los glicósidos Glu- β -AHV y Gal- β -AHV con respecto a Glu- α -AHV, así como la actividad de las agliconas, con respecto a los PPG's y los glucósidos, sugiere fuertemente que la presencia de un componente azúcar confiere un efecto potenciador de la actividad antioxidante.

Tabla 3.- Actividad antioxidante sobre DPPH de algunos PPGs descritos previamente.

Nombre	Moléculas presentes	EC ₅₀ (μM)	Rep.	Nombre	Moléculas presentes	EC ₅₀ (μM)	Rep.
(4-hidroxi-3-metoxifenil)metil-6-O-dihidroferuloil-β-D-galactopiranosido	AV, Gal (β), ADHF (6)	23.03 ± 1.06	López Munguía <i>et al.</i> , 2011	1'-O-β(3, 4-dihidroxifenil)etil-4'-O-cafeil-α-L-ramnopiranoil-(l-3')-D-glucopiranosido	HT, Glu (β), Rha, ADHC (4)	17.09 ± 0.44	Suo M <i>et al.</i> , 2013
(4-hidroxi-3-metoxifenil)metil-6-O-dihidrocafeil-β-D-galactopiranosido	AV, Gal (β), ADHC (6)	17.09 ± 0.21		1'-O-β(3, 4-dihidroxifenil)etil-4'-O-cafeil-α-L-fucopiranosil-(l-3')-D-glucopiranosido	HT, Glu (β), Fuc, ADHC (4)	7.34 ± 0.14	
2(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil-6-O-dihidroferuloil-β-D-galactopiranosido	AHV, Gal (β), ADHF (6)	18.59 ± 0.67		1'-O-β(3, 4-dihidroxifenil)etil-6'-O-cafeil-α-L-ramnopiranosil-(l-3')-D-glucopiranosido	HT, Glu (β), Rha, ADHC (6)	8.43 ± 0.29	
2(4-hidroxi-3-metoxifenil)etil-6-O-dihidrocafeil-β-D-galactopiranosido	AHV, Gal (β), ADHC (6)	16.0 ± 0.86		1'-O-β(3, 4-dihidroxifenil)etil-6'-O-cafeil-α-L-ramnopiranosil-(l-3')-D-galactopiranosido	HT, Gal (β), Rha, ADHC (6)	4.84 ± 0.29	
Verbascósido	HT, Glu (β), Rha, AC (4)	18.61	Abdel-Mageed W. <i>et al.</i> , 2012	1,6-Di-O-cafeil-β-D-glucopiranosida	AC (1,6), Glu (β)	31.79	Hamerski L <i>et al.</i> , 2005
Verpectósido B	HT, Glu (β), Rha, Glu AC (4)	20.70					
Tocomolósido	HT, Glu (β), Rha, Api AC (4)	29.43					
Isoverbascósido	HT, Glu (β), Rha, AC (6)	26.02					
Luteosido B	HT, Glu (β), Rha, AC (6)	31.9					

Nota: Las actividades de la tabla fueron normalizadas utilizando la referencia de ácido ascórbico.

8.6.1 Efecto de la velocidad de atrapamiento del radical DPPH por α y β compuestos.

Como se presenta en la sección anterior, los valores de EC₅₀ obtenidos para las moléculas Glu-α-AHV, Glu-β-AHV y Gal-β-AHV revelan que los glicósidos en conformación β poseen una mejor actividad antioxidante. Con la finalidad de observar cuales son los factores que influyen en esta actividad antioxidante, se planteó explorar la velocidad con la que cada compuesto actúa sobre la velocidad de atrapamiento del radical DPPH. Para llevar a cabo la obtención de las velocidades, se realizaron mediciones de la concentración del radical a intervalos cortos de tiempo (30 seg.) y a diferentes concentraciones de antioxidante. La hipótesis en estos estudios fue confirmar las

diferencias observadas en la actividad antioxidante (EC_{50}) desde un enfoque cinético, lo cual reforzará las diferencias en la actividad antioxidante de glicósidos α y β .

En este sentido, se realizaron cinéticas de atrapamiento del radical DPPH a tiempos cortos, con la intención de monitorear los cambios del radical producto de la concentración. Para llevar a cabo las cinéticas se utilizaron los glicósidos Glu- α -AHV, Glu- β -AHV y Gal- β -AHV, los PPGs PPG- α -DHF y PPG- β -DHF, así como los compuestos fenólicos AHV y el ADHF. Es importante mencionar que no todas las moléculas sintetizadas fueron analizadas, debido a que la actividad atrapadora de algunas de ellas fue tan rápida, que resultó imposible determinar los parámetros a obtener en estos experimentos.

A partir de las absorbancias obtenidos a los distintos tiempos, se calcularon las concentraciones correspondientes del radical DPPH, los cuales fueron utilizados para obtener un gráfico sobre el cual se obtuvo el valor de velocidad inicial, obtenido como el valor de la pendiente en un ajuste lineal de los puntos medidos experimentalmente (Figura 44). Los valores de velocidad inicial obtenidos para cada concentración se presentan en la Figura 34. En este gráfico se observa que en los PPGs una pequeña variación de su concentración (PPG- α -DHF y PPG- β -DHF) muestra cambios dramáticos en la velocidad, mientras que en el AHV y el ADHF se necesitan mayores cambios en la concentración para mostrar una variación similar en su velocidad inicial. Estos resultados nos demuestran que la relación de concentración con respecto a la velocidad presentan un buen ajuste lineal, lo cual se traduce en un comportamiento cinético de orden 1. Este resultado es interesante debido a que la reacción llevada a cabo depende de la concentración de antioxidante y del radical DPPH. Sin embargo, este resultado puede deberse a que la concentración de radical utilizado no cambió en los experimentos (100 mM), y también a que la concentración del radical (mM) utilizado es 1 000 mayor a la del antioxidante (μ M). Existen además diferencias entre los compuestos sintetizados y los intermediarios utilizados en su síntesis, donde observamos cómo las moléculas sintetizadas presentaron un mayor incremento en su velocidad en relación con su concentración, lo cual revela los efectos aditivos observados en la actividad antioxidante, mostrando que la glucosilación mejora también la velocidad de atrapamiento.

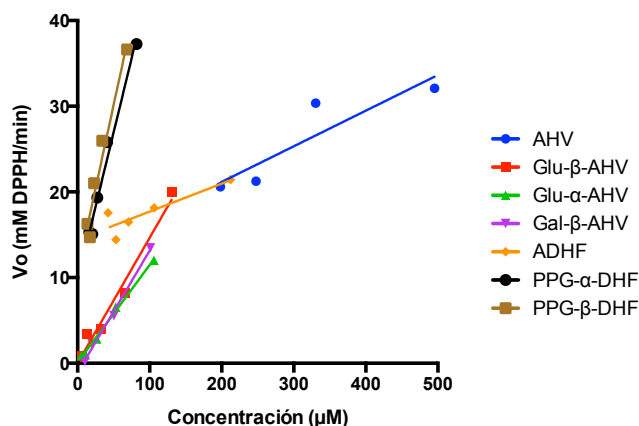


Figura 34.- Gráfico de velocidad inicial de atrapamiento a distintas concentraciones de los compuestos sintetizados.

Al observar que los resultados de la figura 34 mostraron una tendencia, se realizó el correspondiente ajuste utilizando el programa de análisis estadístico Prism 6 de Graph Pad®. Se alimentaron los datos obtenidos y se generó la ecuación correspondiente. El valor de la pendiente, producto del ajuste, muestra el valor de la constante aparente. La desviación fue calculada a partir de los resultados experimentales. Su valor nos es de utilidad, ya que nos permite comparar la rapidez relativa que tiene cada una de las moléculas evaluadas hacia el atrapamiento del radical DPPH.

En la figura 35 se presentan los valores de las constantes aparentes obtenidas. En esta se muestra como los compuestos Glu- α -AHV (113.8 ± 4.53 mol DPPH/min mol Aox) y Glu- β -AHV (146.2 ± 13.32 mol DPPH/min mol Aox) presentan diferencias sobre esta constante calculada, donde β muestra un mayor valor, lo cual se traduce en una mayor velocidad de atrapamiento. Por otro lado se observa que la presencia de glucosa mejora la velocidad atrapamiento del AHV (15.87 ± 9.30 mol DPPH/min mol Aox) en ambos glucósidos, un resultado similar al observado sobre la capacidad antioxidante. Al analizar la velocidad de Gal- β -AHV (142.3 ± 7.58) se observó un valor similar al de Glu- β -AHV (146.2 ± 13.32 mol DPPH/min mol Aox), lo que muestra que configuraciones de azúcar similares, presentan velocidades similares. En conclusión, se vuelve a observar que la configuración en β presenta mejores características, en este caso en el valor de la constante, que revela la velocidad relativa de atrapamiento. Este resultado sugiere que los efectos observados en la actividad antioxidante, también se presentan al evaluar la velocidad de atrapamiento, en donde la configuración en β favorece la actividad antioxidante.

Constante de primer orden	
Molécula	k_{vel} (mol DPPH/min mol Aox)
AHV	15.87 ± 9.30
Glu- α -AHV	113.8 ± 4.53
Glu- β -AHV	146.2 ± 13.32
Gal- β -AHV	142.3 ± 7.58
ADHF	32.62 ± 10.42
PPG- α -DHF	346.5 ± 29.41
PPG- β -DHF	388 ± 47.47

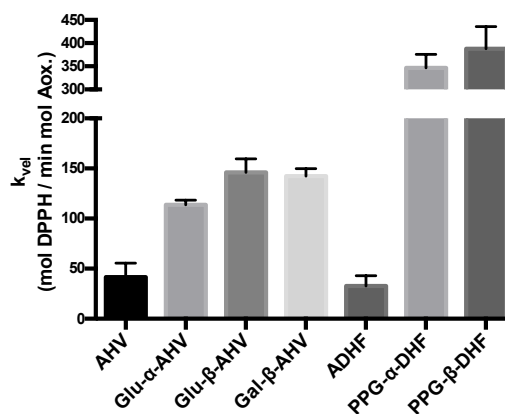


Figura 35.- Constantes de velocidad de atrapamiento del radical DPPH. La constante de velocidad aparente obtenida sobre 100 mM del radical DPPH.

Por otra parte, en los PPGs: PPG- α -DHF (346.5 ± 29.41 mol DPPH/min mol Aox) y PPG- β -DHF (388 ± 47.47 mol DPPH/min mol Aox), no se observa una diferencia clara entre las velocidades obtenidas. Sin embargo, cuando estos son comparados con sus precursores, el ADHF (32.62 ± 10.42 mol DPPH/min mol Aox) y AHV (15.87 ± 9.30 mol DPPH/min mol Aox) se puede identificar en estos una diferencia, la cual se sugiere ocurre por un efecto sinérgico entre los compuestos fenólicos (López-Munguía *et al.*, 2011).

Los resultados observados en la velocidad revelan que fue posible observar en el caso de los glucósidos un aumento en la velocidad originada por la sola presencia del carbohidrato. Un efecto similar al observado en el valor del EC₅₀. Además se encontró una mejora con respecto al tipo de conformación del enlace glucosídico, donde al igual que los valores obtenidos de EC₅₀, la conformación en β resultó mejor en velocidad que la conformación en α . Un comportamiento similar fue observado para el Gal- β -AHV. En los PPGs no se observaron efectos sobre la configuración, un resultado similar al observado sobre el valor de EC₅₀. Es importante hacer notar que los valores de velocidad observados en los glucósidos mejoraron hasta 3 veces los valores de velocidad observados en su forma de aglicona: alcohol homovainillínico.

Estos perfiles de velocidad revelan que la síntesis de moléculas antioxidantes puede desarrollarse bajo dos criterios. Uno de éstos es la actividad total, la cual se puede medir como actividad total de las moléculas antioxidantes. La otra es a partir de la velocidad que muestren los antioxidantes. Así, utilizando ambas herramientas se podría tener una mejor descripción de la actividad

antioxidante de una molécula modificada o nueva. En nuestro caso, los carbohidratos además de funcionar como una molécula de unión entre compuestos antioxidantes, permitió modular la capacidad antioxidante de las moléculas generadas. Estas dos características podrían ser de gran utilidad en el diseño de moléculas antioxidantes, así como la evaluación de antioxidantes *in vivo*.

Por último, es importante mencionar que la aproximación realizada en este estudio fue de gran utilidad para incorporar mayor información respecto a la actividad antioxidante de estas moléculas. Sin embargo, un estudio cinético más profundo podría ser de utilidad si se desea conocer la estequiometría y el mecanismo de reacción que presentan este tipo de compuestos hacia el radical DPPH.

8.7 Análisis de conformeros estructurales de glucósidos

En secciones anteriores de este trabajo se estableció el efecto de la configuración anomérica de las diferentes moléculas sintetizadas sobre sus propiedades antioxidantes. Una de las observaciones más importantes fue el hecho de que los anómeros β (los sintetizados y los descritos en la literatura) resultaban mejores moléculas antioxidantes. Con la finalidad de analizar las diferencias moleculares entre los anómeros α y β que pudieran dar lugar a diferencias en su perfil como antioxidantes, decidimos examinar los compuestos sintetizados a nivel estructural. Las moléculas elegidas para el análisis fueron: los glucósidos Glu- α -AHV, Glu- β -AHV y el galactósido Gal- β -AHV, ya que en estos compuestos se observaron las diferencias más claras en su actividad antioxidante y en su velocidad de atrapamiento del radical DPPH.

El análisis inició con la construcción de las moléculas utilizando el programa Marvin Sketch[®] y generando 20 conformeros estructurales con la energía asociada a cada estructura (los parámetros utilizados se describen en Materiales y Métodos). Para llevar a cabo estas construcciones, el programa utiliza el campo de fuerza MMFF94 (Halgren, T. A. 1996) considerando la geometría de la molécula, la longitud de sus enlaces, sus ángulos e interacciones de tipo enlace de hidrógeno.

Al superponer el conjunto de conformeros obtenidos, se observó en éstos un amplio rango de movilidad por parte del glúcido con respecto al anillo fenólico. Esta movilidad fue analizada en todos los conformeros mediante el cálculo del ángulo dihedral correspondiente a los átomos 1, 7,

8 y el O que forma el enlace glicosídico en las moléculas, al considerar que los enlaces formados entre estos átomos son los que permiten un mayor grado de libertad de giro dentro de la estructura (átomos en rojo en Figura 36). Como información adicional en el análisis, se consideró para cada conformero la variación de la distancia entre el hidrógeno presente en el -OH del C-6 de la glucosa y el oxígeno fenólico del AHV (átomos en verde en la Figura 36), al que llamamos distancia relativa intergrupar (DRI).

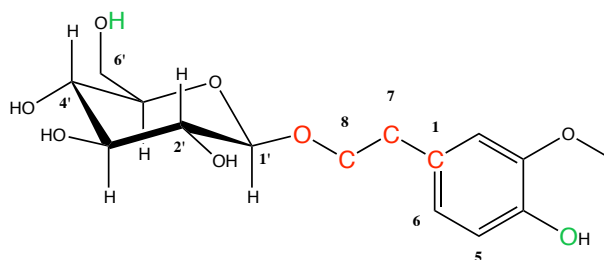


Figura 36.- Átomos considerados en análisis estructural de los conformeros. En el Glu-β-AHV los átomos en color rojo fueron utilizados en la obtención del ángulo dihedral, y los átomos en verde como referencia de la distancia entre el glúcido y el anillo fenólico. DRI: distancia relativa intergrupar.

De manera gráfica la superposición de los conformeros nos permitió observar la movilidad de la estructura e identificar posiciones particulares en los conformeros generados. En efecto, con ayuda de esta superposición se pudo visualizar que para los diferentes conformeros generados existían diferencias claras en la DRI. Así mismo, se estableció la influencia que tiene la variación del ángulo dihedral sobre la DRI. Al observar la superposición de los conformeros del Glu-α-AHV observamos que a pesar de que presentan una amplia movilidad en la estructura no se ve una variación significativa en la DRI, es decir, no hay un acercamiento aparente entre el -OH del C-6 de la glucosa y el oxígeno fenólico (Figura 37-A). Al analizar este comportamiento mediante la relación del ángulo dihedral con la distancia que presentan los átomos externos en la molécula, observamos que en los conformeros generados no existe una tendencia entre ambos valores, manteniéndose una DRI en el rango de 6-11 Å (Figura 37-B). En esencia, estos resultados sugieren que a pesar de la amplia movilidad que muestran los anómeros α, el acercamiento aparentemente entre los grupos no se ve alterado.

Por el contrario, al observar la superposición de los conformeros del Glu-β-AHV observamos que un número significativo de las estructuras mostraban un acercamiento entre el glúcido y el anillo fenólico, el cual se puede apreciar como una estructura cerrada en la superposición de los

conformeros (Figura 38-A). Estas observaciones sugieren que el glicósido con configuración en β presenta características geométricas que le permiten cerrar la estructura, es decir acercar el hidrógeno del -OH en el carbono 6 de la glucosa hacia al oxígeno fenólico. Al analizar el efecto de la variación del ángulo dihedral sobre la DRI de los conformeros observamos que a medida que se incrementa el ángulo dihedral la DRI aumenta, alcanzando valores alrededor de 11.0 Å y después disminuye hasta alcanzar su valor mínimo (3.91 Å). Este comportamiento sugiere que el acercamiento entre el hidrógeno del -OH en el carbono 6 de la glucosa hacia al oxígeno fenólico podría darse por ambos lados de la molécula.

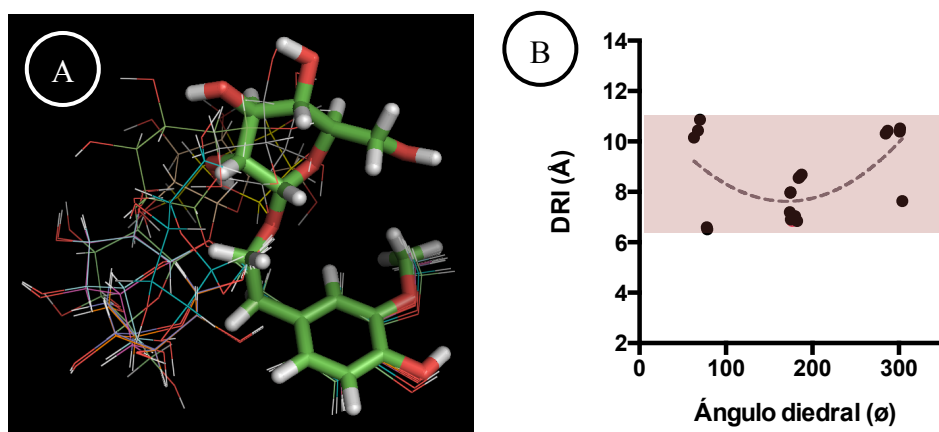


Figura 37.- Conformeros de Glu- α -AHV y gráfico de su relación DRI - ángulo dihedral. En A se muestra el empalme de 10 de los conformeros obtenidos, donde el conformero mostrado en líneas más gruesas es el que presentó la menor DRI. En B se muestra el gráfico de la distancia vs el ángulo dihedral de los 20 conformeros. DRI: distancia relativa intergrupar. La línea punteada muestra el ajuste a una función cuadrática de los puntos.

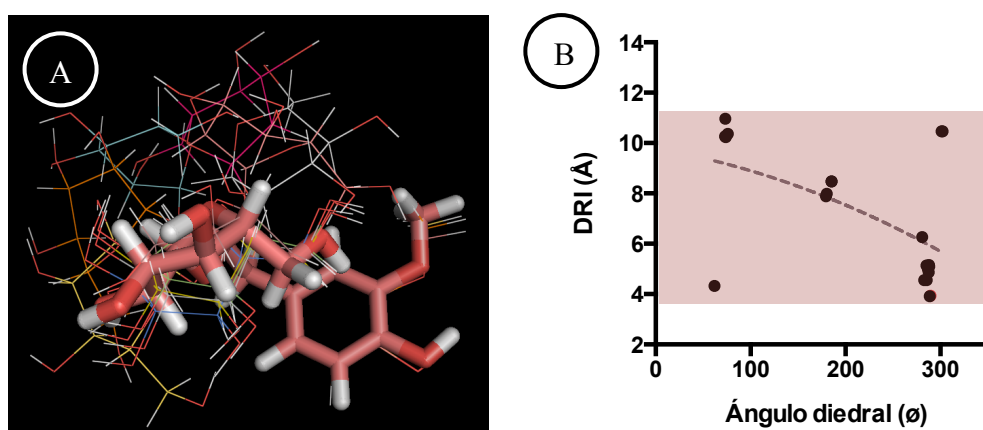


Figura 38.- Conformeros de Glu- β -AHV y gráfico de su relación DRI - ángulo dihedral. En A se muestra el empalme de 10 de los conformeros obtenidos, donde el conformero mostrado en líneas más gruesas es el que presentó la menor distancia. En B se muestra el gráfico de la distancia vs el ángulo dihedral de los 20 conformeros. DRI: distancia relativa intergrupar. La línea punteada muestra el ajuste a una función cuadrática de los puntos.

Al analizar los conforméromos de Gal- β -AHV, una molécula que fué sintetizada en trabajos anteriores, se observa que una buena parte de las estructuras también adoptan una conformación cerrada. Es decir, son estructuras que también sugieren un acercamiento del hidrógeno del -OH en el carbono 6 de la glucosa hacia al oxígeno fenólico (Figura 39-A). De la misma manera, analizando el efecto de la variación del ángulo dihedral y su relación con la DRI observamos que, a medida que aumenta el ángulo dihedral, el valor de la DRI aumenta hasta un punto máximo de 12.11 Å, a partir del cual la DRI disminuye hasta alcanzar un valor mínimo de 3.93 Å (Figura 39-B). Es importante mencionar que este comportamiento es muy similar entre los glicósidos Glu- β -AHV y Gal- β -AHV. Pero además subrayar, que ambos glicosidos en β mostraron una capacidad de atrapamiento del radical DPPH superior a los valores observados para los anómeros en α . En efecto, este análisis sugiere que un acercamiento entre el azúcar y su aglicona podría tener un efecto positivo sobre la capacidad antioxidante de este tipo de moléculas.

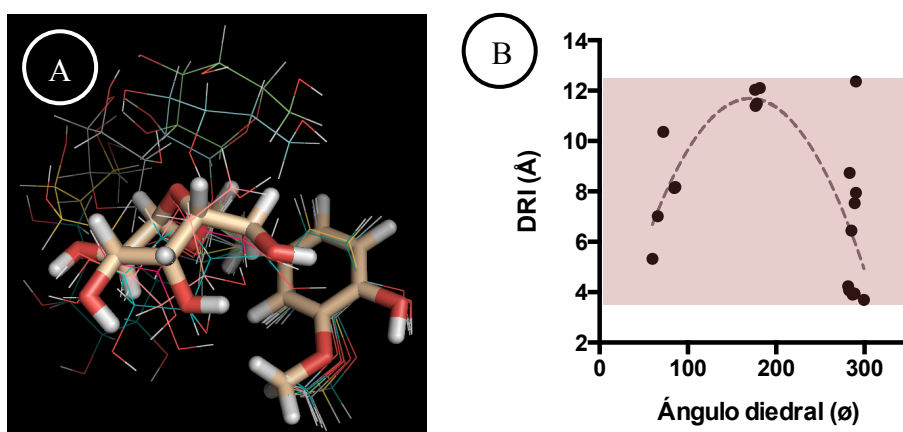


Figura 39.- Conforméromos de Gal- β -AHV y gráfico de su relación DRI - ángulo dihedral. En A se muestra el empalme de 10 de los conforméromos obtenidos, donde el conformero mostrado en líneas más gruesas es el que presentó la menor distancia. En B se muestra el gráfico de la distancia vs el ángulo dihedral de los 20 conforméromos. La línea punteada muestra el ajuste a una función cuadrática de los puntos.

En resumen, los resultados observados en el análisis de los conforméromos nos permitieron observar que la configuración en β de los glicósidos de AHV presentan características geométricas que le permiten adoptar una estructura cerrada, comportamiento que el α -glicósido evaluado no presentó. Este resultado nos permite sugerir que una de las consecuencias de la configuración del

azúcar a nivel estructural se halla sobre la forma que pueden tomar los confórmeros, lo cual podría estar relacionado con las diferencias observadas en la actividad antioxidante.

Se ha propuesto que interacciones de tipo no covalentes como el puente de hidrógeno sobre hidroxilos fenólicos muestran una contribución importante sobre la actividad antioxidante, las cuales con capaces de disminuir la energía de disociación en hidrógenos de hidroxilos fenólicos (Amorati R. & Valgimigli L., 2012). Pensamos que un efecto similar podría estar presente en los β -glicósidos, lo cual estaría generando una mejor actividad antioxidante.

La reactividad de los carbohidratos ha sido muy estudiada en la síntesis química de glicósidos en donde generalmente se obtienen las dos configuraciones posibles α/β . Basado en esta posibilidad muchos trabajos han estado dirigidos al establecimiento del llamado efecto anomérico. Este efecto que se presenta como resultado de la interacción entre el carbono anomérico y el oxígeno heterocíclico genera propiedades particulares para los diferentes anómeros. Por ejemplo, se ha observado de manera general que los glicósidos en configuración α son energéticamente más estables que los correspondientes en configuración en β (Cumpspey I., 2012). Así entonces, si la reactividad y/o estabilidad de los anómeros α/β esta determinada por el efecto anomérico es de esperarse que sus propiedades en tanto que moléculas activas se vean afectadas de igual manera (i. e. toxicidad, actividad biológica, biodisponibilidad, etc.).

9. Conclusiones

- Utilizando un metodología de síntesis en dos etapas es posible sintetizar glucósido y PPGs con orientación α y β .
- Existe un efecto en la actividad antioxidante originada por la configuración del carbono anómero, donde los β -glucósido de AHV presenta una mejor actividad antioxidante.
- Los PPGs PPG- α -DHC y PPG- β -DHC tuvieron una mejor actividad antioxidante que el ácido ascórbico.
- Existe una contribución del azúcar en la velocidad de atrapamiento del radical DPPH, que los hace aproximadamente 3 veces más rápidos que sus intermediarios de síntesis.
- Existe un efecto positivo en los β -glucósidos sobre la velocidad de atrapamiento del radical DPPH.
- El análisis de conformeros relevó que la movilidad de β -glucósidos es mucho mayor que en el α -glucósido, y que esta movilidad podría ser la responsable de las diferencias en la actividad antioxidante de los glucósidos, así como en su velocidad de atrapamiento de DPPH.

10. Perspectivas

- Analizar los efectos en actividad antioxidante y velocidad sobre otro tipo de ensayos de actividad antioxidante.
- Estudiar a nivel fisiológico la actividad antioxidante de las moléculas generadas, estudiando los efectos de su configuración.
- Evaluar los efectos de la actividad antioxidante utilizando otro tipo de azúcares.
- Evaluar los efectos de la glicosilación sobre la actividad antioxidante, utilizando otro tipo de moléculas antioxidantes como modelo de estudio.
- Sintetizar moléculas diglucosiladas, así como sus correspondientes PPGs, y estudiar los efectos de la actividad antioxidante.

II. Bibliografía

- Abdel-Mageed W., Backheet E., Khalifa A., Ibraheim Z. & Ross S. Antiparasitic antioxidant phenylpropanoids and iridoid glycosides from *Tecoma mollis*. *Fitoterapia*. 2012, 83: 500–7.
- Aga H.; Yoneyama, M.; Sakai, S. & Yamamoto, I. Synthesis of 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid by cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus*. *Agric. Biol. Chem.* 1991, 55 (7), 1751-1756.
- Amorati, R. & Valgimigli, L. Modulation of the antioxidant activity of phenols by non-covalent interactions. *Organic & Biomolecular Chemistry* 2012, 10, 4147-4158.
- Boeckler G. A.; Gershenzon J. & Sybille B. Unsicker phenolic glycosides of the salicaceae and their role as anti-herbivore defenses. *Phytochemistry*, 2011, 72(13), 1497-1509.
- Cassani J.; Luna H.; Navarro A. & Castillo E. Comparative esterification of phenylpropanoids versus hydrophenylpropanoids acids catalyzed by lipase in organic solvent media. *Electron. J. Biotechnol.* 2007. Vol. 10: 508-513.
- Chen X., Wu G. & Huang, Z. Structural analysis and antioxidant activities of polysaccharides from cultured *Cordyceps militaris*. *International journal of biological macromolecules*. 2013, 58, 18–22.
- Cumpstey I. On a so-called “kinetic anomeric effect” in chemical glycosylation. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2012. 10, 2503-2508.
- Daines A.; Maltman B. & Flitsch S. Synthesis and modifications of carbohydrates, using biotransformations. *Curr Opin Chem Biol.* 2004. 8(2), 106-13.
- Fernandez-Mayoralas, A. Synthesis and modification of carbohydrates using glycosidases and lipases. *Top. Curr. Chem.* 1997. 186, 1-20.
- Fischer E. Ueber die glucoside der alkohole. 1983. Vol.26 No.3: 2400-2412.
- Franssen M.C.R.; Alessandrini L.; & Terraneo G. Biocatalytic production of flavors and fragrances. *Pure and Applied Chemistry*. 2005. Vol. 77: 273-279.
- Funes L.; Laporta O.; Cerdán-Calero M. & Micol, V. Effects of verbascoside, a phenylpropanoid glycoside from *lemon verbena*, on phospholipid model membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2010, 163, 190-199.
- Gabelsberger J.; Liebl W. & Schleifer K. Purification and properties of recombinant β -glucosidase of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1993, No. 40: 44-52.
- Gao J., Igarashi K. & Nukina M. Three new phenylethanoid glycosides from *Caryopteris incana* and their antioxidative activity. *Chemical & pharmaceutical bulletin*. 2000. 48, 1075–8.
- Ganske, F. & Bornscheuer, U.T. Lipase-catalyzed glucose fatty acid ester synthesis in ionic liquids. *Org. Lett.* 2005. 7, 3097-3098.
- Goyal K.; Selvakumar P. & Hayashi K. Characterization of a thermoestable β -glucosidase (BglB) from *Thermotoga maritima* showing transglycosylation activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2001. 15, 45-53.
- Gribenow K. & Klibanov A.M. On protein denaturation in aqueous-organic mixtures but not in pure organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* 1996. 118, 11695-11700.
- Heilmann J.; Salis I.; Karmizibekmez H.; Schühly W.; Harput S. & Sticher O. Radical scavenger activity of phenylethanoids glycosides in FMLP stimulated human polymorphonuclear leukocytes: structure-activity relationships. *Planta Medica*. 2000. 66, 746.
- Hernández-Marin E. & Martínez A. Carbohydrates and their free radical scavenging capability: a theoretical study. *The Journal of Physical Chemistry B* 2012. 116, 9668–9675.
- Jamuna R.; Saswathi N.; Sheela R. & Ramakrishna V. Synthesis of cyclodextrin glucosyltransferase by *Bacillus cereus* for the production of cyclodextrin. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1993, 43, 163-176.

- Li X.-D., Kang S.-T., Li G.-Y., Li X. & Wang J.-H.** Synthesis of some phenylpropanoid glycosides (PPGs) and their acetylcholinesterase/xanthine oxidase inhibitory activities. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2010. 16, 3580–96.
- Lee R., Winston G., & Lemaire D.** Antioxidants and total oxyradical scavenging capacity during grass shrimp, palaemonetes pugio, embryogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology. C. Toxicology Pharmacology*. 2004. 139 (4), 281.
- Jia X.; Dong L.; Yang Y.; Yuan S.; Zhang Z. & Yuan M.** Preliminary structural characterization and antioxidant activities of polysaccharides extracted from hawk tea (*Litsea coreana var. lanuginosa*). *Carbohydrate polymers* 2013, 95, 195–9.
- Kawada T.; Asano R.; Hayashida S. & Sakuno, T.** Total synthesis of the phenylpropanoid glycoside, Acteoside. *Org. Chem.*, 1999, 64 (25), 9268-9271.
- Khaled N.; Montet D.; Pina M. & Graille J.** Fructose oleate synthesis in a fixed bed catalyst bed reactor. *Biotechnol. Lett.* 1991. Vol. 13, 167-172.
- Klivanov, A.M.** Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*. 2000, 409: 241-246.
- Kobayashi, T.** Lipase-catalyzed synthesis of sugar esters in non-aqueous media. *Biothechnol. Lett.* 2011. Vol. 33, No. 10: 1911-9.
- Krishna S.H. & Karant N.G.** Lipases and Lipase-catalyzed esterification reactions in non aqueous media. *Catal. Rev.* 2002. Vol. 44, 499-591.
- Kurkin, V. A.** Phenylpropanoids from medicinal plants: distribution, classification, structural analysis and biological activity chemistry of natural compounds. *Chemistry of Natural Compounds*. 2003. 39(2), 123-153.
- Kyriakopoulou I.; Magiatis P.; Skaltsounis A.L.; Aligiannis N. & Harvala, C.** Samioside, a new phenyletanoid glycosides with free-radical scavenging and antimicrobial activities from *Phlomis samia*. *Journal of Natural Products*. 2001. 64(8), 1095-7.
- Lampe, J.W.** Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Am J Clin Nutr.* 1999. 70, 475S- 490S.
- Lee J.; Koo N. & Min D.B.** Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2004. 3, 21-33.
- Li J.; Ge R.C.; Zheng R.L.; Liu Z.M. & Jia Z.J.** Antioxidative and chelating activities of phenylpropanoid glycosides from *Pedicularis stiata*. *Acta Pharmacol. Sin.* 1997. 77-88.
- López-Munguía A.; Hernandez Romero Y.; Pedraza Chaverri J.; Miranda Molina A.; Regla I.; Martinez A. & Castillo E.** Phenylpropanoid glycosides analogues: enzymatic sintesis, antioxidante activity and theoretical study of their free radical scavenger mechanism. *PlosOne*. 2011. 6(6), 1-9.
- Mackenzie L.; Wang Q.; Warren R & Withers S.** Glycosynthases: mutant glycosidases for oligosaccharide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 1998. 120(22), 5583-5584.
- Maestro-Duran R. & Borja-Padilla R.** Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. *Rev. del Con. Sup. de Inv. Cien. de España*. 1993. 44(2), 101-106.
- Manach C.; Scalbert A.; Monrand C.; Remesy C. & Jimenez L.** Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004. 79, 727-747
- Martinez-Valverde I., Periago M., & Ros G.** Nutritional meaning of the phenolic compounds from the diet. *Archivos Latinoamericanos De Nutrición*. 2000. 50(1), 5.
- Mena-Arizmendi A.; Alderete J.; Águila S.; Marty A.; Miranda-Molina A.; López-Munguía A. & Castillo E.** Enzymatic fructosylation of aromatic and aliphatic alcohols by *Bacillus subtilis* levansucrase: Reactivity of acceptors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzimatic*. 2011. 70, 41-48.
- Meulenbeld G.H. & Hartmans S.** Transglycosilation by *streptococcus mutans* GS-5 glucosyltransferase-D: acceptor specificity and engineering of reaction conditions. *Biotechnology and Bioengineering*. 2000. 70, 363-369.
- Michael A.** On the synthesis of helicin and phenolglucosides. *American Chemical Journal*. 1879. 1, 305-312.
- Miranda-Molina A.; López-Munguía A.; San Román M.; Escalante J.; Leyva M.; Puebla A.; Castillo E. & Álvarez, L.** Stereoselective enzymatic synthesis of monoglucosyl-myoinositols with in vivo anti-inflammatory activity.

Tetrahedron: Asymmetry. 2010. 21, 43-50.

Moon J.K. & Shibamoto T. Antioxidant assay for plant and food components. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 2009. 57, 1655-1666.

Mydock L.K. & Demchenko A.V. Mechanism of chemical O-glycosilation: from early studies to recent discoveries. *Organ. and Biomolec. Chem.* 2010. 8, 497-510.

Nakamura A.; Haga K. & Yamane, K. Three histidine residues in the active center of cyclodextrin glucano transferase from alkalophilic *Bacillus sp.* 1011. Effects of the replacement on pH dependence and transition-state stabilization. *Biochemistry*. 1993. 32, 6624-6631.

Nakamura A.; Haga K. & Yamane K. Transglycosilation reaction of cyclodextrin glucano transferase is operated by a ping-pong mechanism. *FEBS lett.* 1994a. 337, 66-70.

Nakamura A., Haga K. & Yamane K. Four aromatic residues in the active center of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus sp.* 1011: effects of replacements on substrate binding and cyclization characteristics. *Biochemistry*. 1994b. 33, 9929-9936.

Nakano H.; Kiso T.; Okamoto K.; Tomita T.; Manan M. B. & Kitahata S. Synthesis of glycosil glicerol by cyclodextrin glucanotransferases. *J. Biosci. Bioeng.* 2003. 95, 583-588.

Nenadis N.; Boyle S.; Bakalbassis E.G. & Tsimidou M. An experimental approach to structure-activity relationship of caffeic and dihydrocaffeic acids and related monophenols. *Journal of American Oil Chemistry Society*. 2003. 80, 451-458.

Oehlke K., Heins A., Stöckmann H., Sönnichsen F. & Schwarz K. New insights into the antioxidant activity of Trolox in o/w emulsions. *Food Chemistry*. 2011. 124, 781-787.

Oosterom M.W., Rantwijk F. Van & Sheldon R.A. Regioselective acylation of disaccharides in tert-butyl alcohol catalyzed by *Candida antarctica* lipase. *Biotechnology and Bioengineering*. 2000. 49, 328-333.

Pan X.; Niu G. & Liu H. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chemical Engineering and processing: Process intensification*. 2003. 42(2), 129-133.

Park D. C.; Kim T. K. & Lee Y.H. Characteristics of transglucosilation reaction of cyclodextrin glucanotransferase in the heterogeneous enzyme reaction system using extrusion starch as a glucosil donor. *Enzyme Microb. Technol.* 1998. 22, 217-222.

Patil D.R.; Rethwisch D.G. & Dordick J.S. Enzymatic synthesis of sucrose containing linear polyester in nearly anhydrous organic media. *Biotechnol. Bioeng.* 1991. 37, 639-646.

Pedersen N.R.; Halling P.J.; Pedersen L.H.; Wimmer R.; Matthiesen R. & Veltman O.R. Efficient transesterification of sucrose catalyzed by the metalloprotease thermolysin in dimethylsulfoxide. *FEBS Lett.* 2002. 519, 181-184.

Plou F. J.; Gómez de Segura A. & Ballesteros A. Application of glycosidases and transglycosidases in the synthesis of oligosaccharides. *Indus. Enz (Ed. Polaina J, MacCabe A. P.)*, Springer, Valencia, Spain. 2007. 141-157.

Prior R., Wu X., & Schaich K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290.

Qu X., Kirschenbaum L. & Borish E. Hydroxyterephthalate as a fluorescent probe for hydroxyl radicals: application to hair melanin. *Photochemistry and photobiology*. 2000. 71, 307-13.

van Rantwijk F.; Oosterom M.W.V. & Sheldon R.A. Glycosidase-catalysed synthesis of alkyl glycosides. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*. 1999. 6, 511-532.

Rice-Evans C.A.; Miller N.J. & Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 1997. 2, 152-159.

Robards K.; Prenzler P.; Tucker G.; Swatsitang P. & Glover W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*. 1999. 66(4), 401.

de Roode B. M., Franssen M. C. R., vander Padt A. & Boom R. M. Perspectives for the Industrial Enzymatic Production of Glycosides. *Biotechnology Progress*. 2003 19, 1391-1402.

- de Roode B. M.** The integrated enzymatic production and downstream processing of glucosides. Tesis de doctorado. Universidad de Wageningen. 2001.
- Saibal Kumar Das K.; Anantha Reddy K. & Mukkantib.** Total synthesis of phenylpropanoid glycosides, Grayanoside A and Syringalide B, through a common intermediate. *Discovery Chemistry, Discovery Research*. 2007. 342: 2309-2315.
- San-Qi Zhang, A; Zhong-Jun Li, A; An-Bang Wang, A; Meng-Shen Cai; & Rui Feng B.** Total synthesis of the phenylpropanoid glycoside grayanoside a 1. *Carbohydrate Research*. 1997. 299, 281-285.
- San-Qi Zhang; Zhong-Jun Li A.; An-Bang Wang; Meng-Shen Caia & Rui Fengb.** Synthesis of a phenylpropanoid glycoside Osmanthuside b61. *Carbohydrate Research*. 1998. 308, 281-285.
- Sato, M.; Nakamura, K.; Nagano, H.; Yagi, Y.; Koizumi, K.** Synthesis of Glucosyl-inositol Using a CGTase, Isolation and Characterization of the Positional Isomers, and Assimilation Profiles for Intestinal Bacteria 1992.
- Seibel J.; Baine R.; Moraru R.; Behringer C. & Buchholz K.** A new pathway for the synthesis of oligosaccharides by the use of non-Leloir glycosyltransferases. *Biocatal. and Biotransf.* 2006. 24, 157-165.
- Sharma A. & Chattopadhyay S.** Lipase catalysed of acetylation of carbohydrates. *Biotechnol. Lett.* 1993. 15, 1145-1146.
- Shaikh F. A. & Withers S. G.** Teaching old enzymes new tricks: engineering and evolution of glycosidases and glycosyl transferases for improved glycoside synthesis. *Biochem. and Cell Biol.* 2008. 86, 169-177.
- Sharma O. P. & Bhat T. K.** DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*. 2009. 113, 1202-1205.
- Shi Y.M.; Wang W.; Kang J.H.; Shi Y.P.; Jia Z.J.; Wang Y.; Su B.N.; Yao S.D.; Lin N.Y. & Zheng R.L.** Reaction of hidroxyl radical with phenylpropanoid glycosides ad its derivatives by pulse radiolysis. *Sci in China*. 1999. 42, 420-426.
- Shi Y.; Wang W.; Huang C.; Jia Z.; Yao S. & Zheng R.** Fast repair of oxidative DNA damage by phenylpropanoid glycosides and their analogues. *Mutagenesis*. 2007. 23, 19-26.
- Siquet C., Paiva-Martins F., Lima J., Reis S. & Borges F.** Antioxidant profile of dihydroxy- and trihydroxyphenolic acids—a structure-activity relationship study. *Free radical research*. 2006. 40, 433-42.
- Stoffer B.; Frandsen T.; Busk P.; Schneider P.; Svendsen I. & Svensson B.** Production, purification and characterization of the catalytic domain of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *The Biochemical journal*. 1993. 292, 197-202.
- Stoyanova S., Geuns J., Hideg É. & Ende W. V. D.** The food additives inulin and stevioside counteract oxidative stress. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2011. 62(3), 207-214.
- Tvaroska I. & Bleha T.** Anomeric and exo-anomeric effects in carbohydrates chemistry. *Advan. in Carbohy. Chem. and Biochem.* 1989. 47, 45-123.
- Vogt T.** Phenylpropanoid Biosynthesis, *Molecular Plant*. 2009. 3(1) 2-20.
- Wang P.; Zheng R.; Gao J.; Jia Z.; Wang W.; Yao S.; Zhang J. & Lin N.** Reaction of hidroxyl radical with phenylpropanoid glycosides from pedicularis species: a pulse radiolysis study. *Sci. China C Life Sci*. 1996. 39(2), 154-158.
- Watanabe Y.; Nakamoto C.; Ozaki S. & Sato M.** Absolute configuration of 4- α -d-glucopyranosyl-myio-inositol, enzymatic transglycosylation product. *J. Carb. Chem*. 1993. 12(6), 685-692.
- Weijers C.A.; Franssen M.C. & Visser G.M.** Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides. *Biotech. Adv.* 2008. 26, 436-456.
- Wu Q.; Tan Z.; Liu H.; Gao L.; Wu S.; Luo J.; Zhang W.; Zhao T.; Yu J. & Xu X.** Chemical characterization of *Auricularia auricula* polysaccharides and its pharmacological effect on heart antioxidant enzyme activities and left ventricular function in aged mice. *International journal of biological macromolecules*. 2010. 46, 284-288.
- Xiao-Feng Li; Wen-Yong Lou; Thomas J. Smith; Min-Hua Zong; Hong Wu & Ju-Fang Wang.** Efficient regioselective acylation of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine catalyzed by lipase in ionic liquid containing system. *Green Chem*. 2006. 8, 538-544.

- Xiong Q.; Kadota S.; Tani, T. & Namba, T.** Antioxidative effects of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 1996. **19**, 1580-1585.
- Xiong Q.; Hase K.; Tezuka Y.; Tani T.; Namba T. & Kadota S.** Hepatoprotective activity of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*. *Planta medica*. 1998. **64**, 120-125.
- Xue Y., Yu J. & Song X.** Hydrolysis of soy isoflavone glycosides by recombinant beta-glucosidase from hyperthermophile *Thermotoga maritima*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 2009. **36**, 1401-1408.
- Zaks A. & Klivanov A.M.** Enzymatic catalysis in organic media at 100 °C. *Science*. 1984. **224**, 1249-1251.
- Zechel D. L. & Withers S. G.** Glycosidase mechanisms: anatomy of a finely tuned catalyst acc. *Chem. Res.*, 2000, **33**(1), 11-18.
- Zhao S.; Tuan P.; Li X.; Kim Y.; Kim H.; Park C.; Yang J.; Li C. & Park S.** Identification of phenylpropanoid biosynthetic genes and phenylpropanoid accumulation by transcriptome analysis of *Lycium chinense*. *BMC genomics* 2012, **14**, 802.
- Zulueta A.; Esteve M.; Frígola A.** ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chem.* 2009. **114**(1), 310-316.

12. Anexos

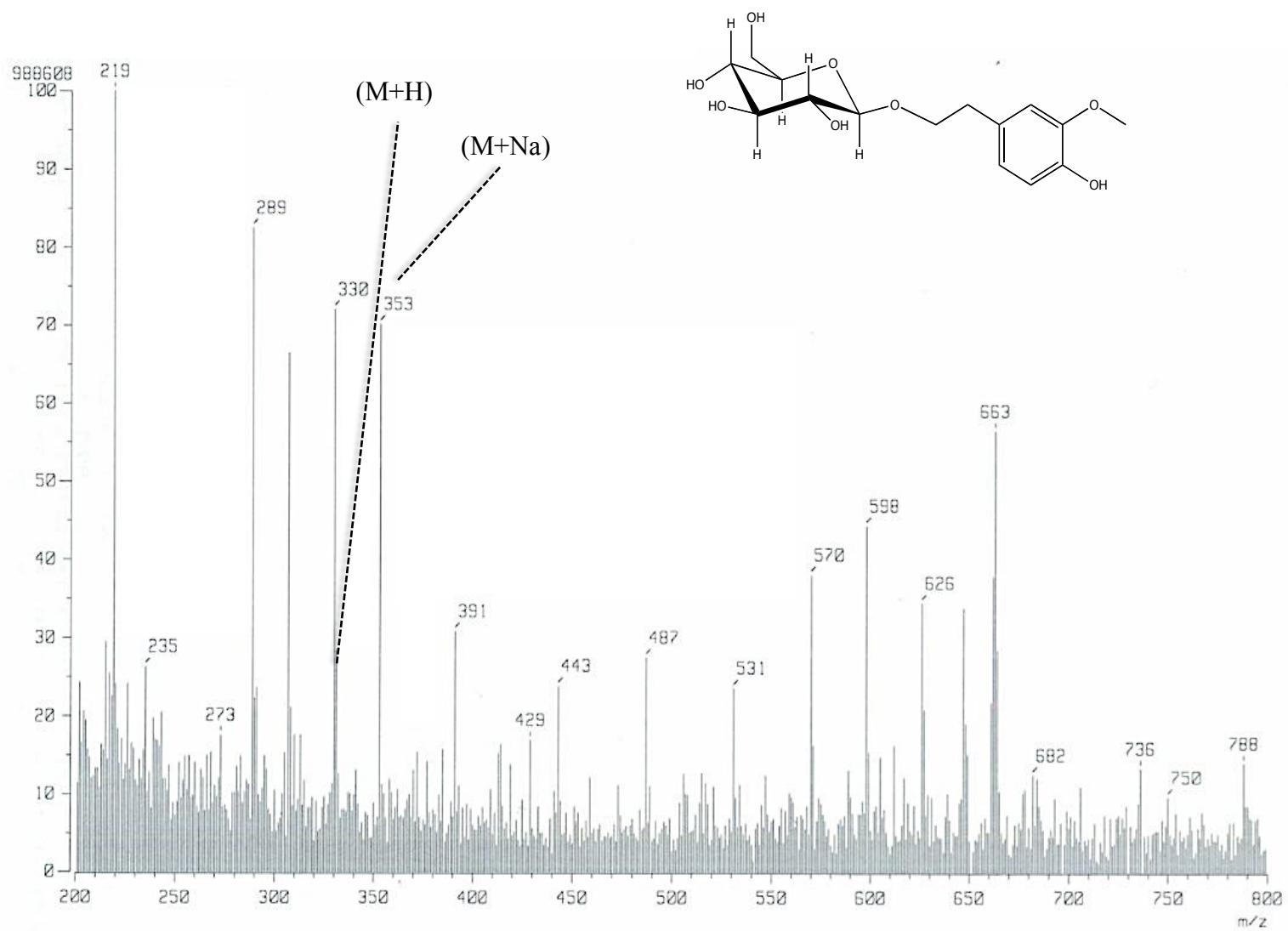


Figura 40.- Espectro de masas FAB (+) para el Glu-β-AHV.

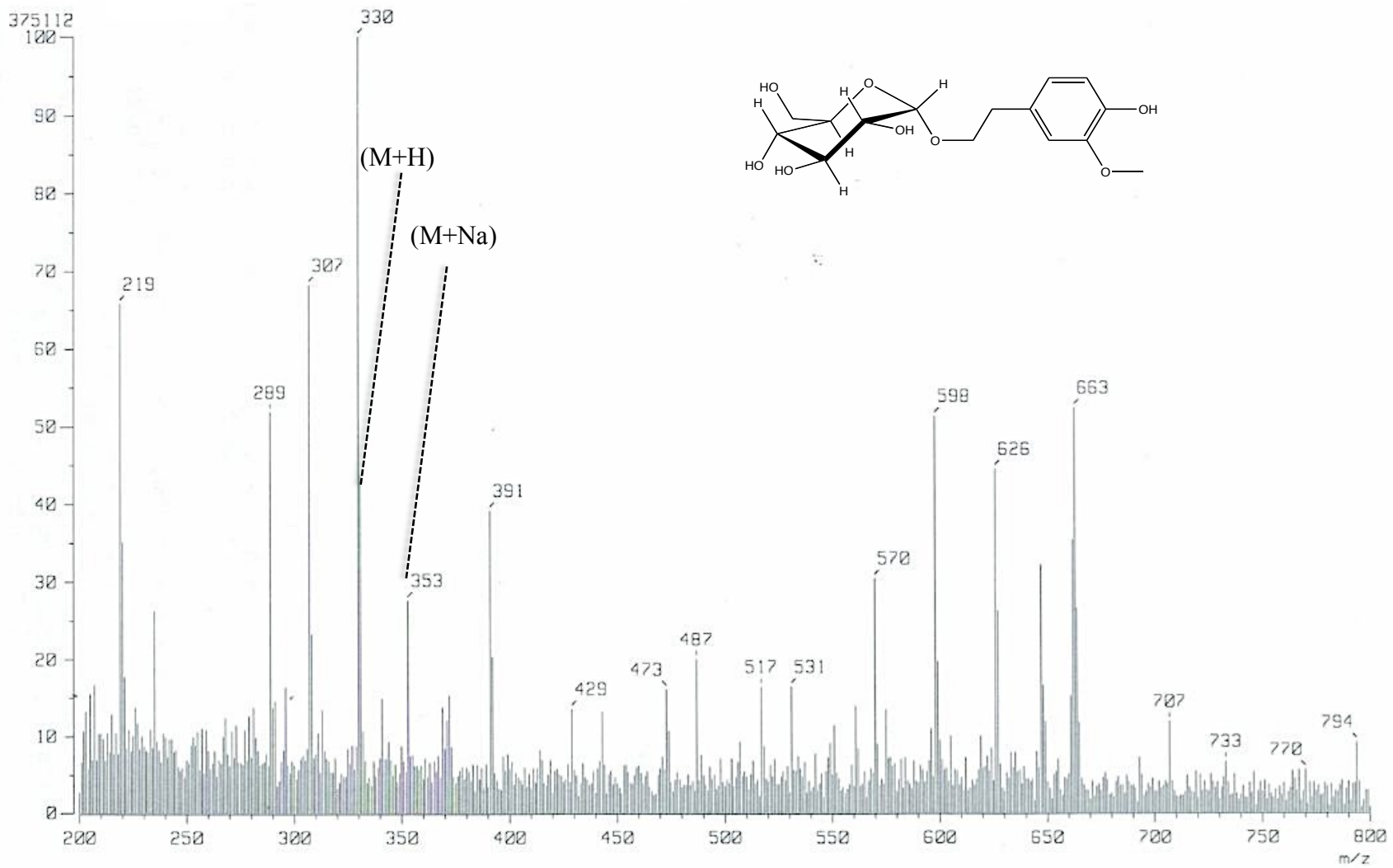


Figura 41.- Espectro de masas FAB (+) para el Glu- α -AHV.

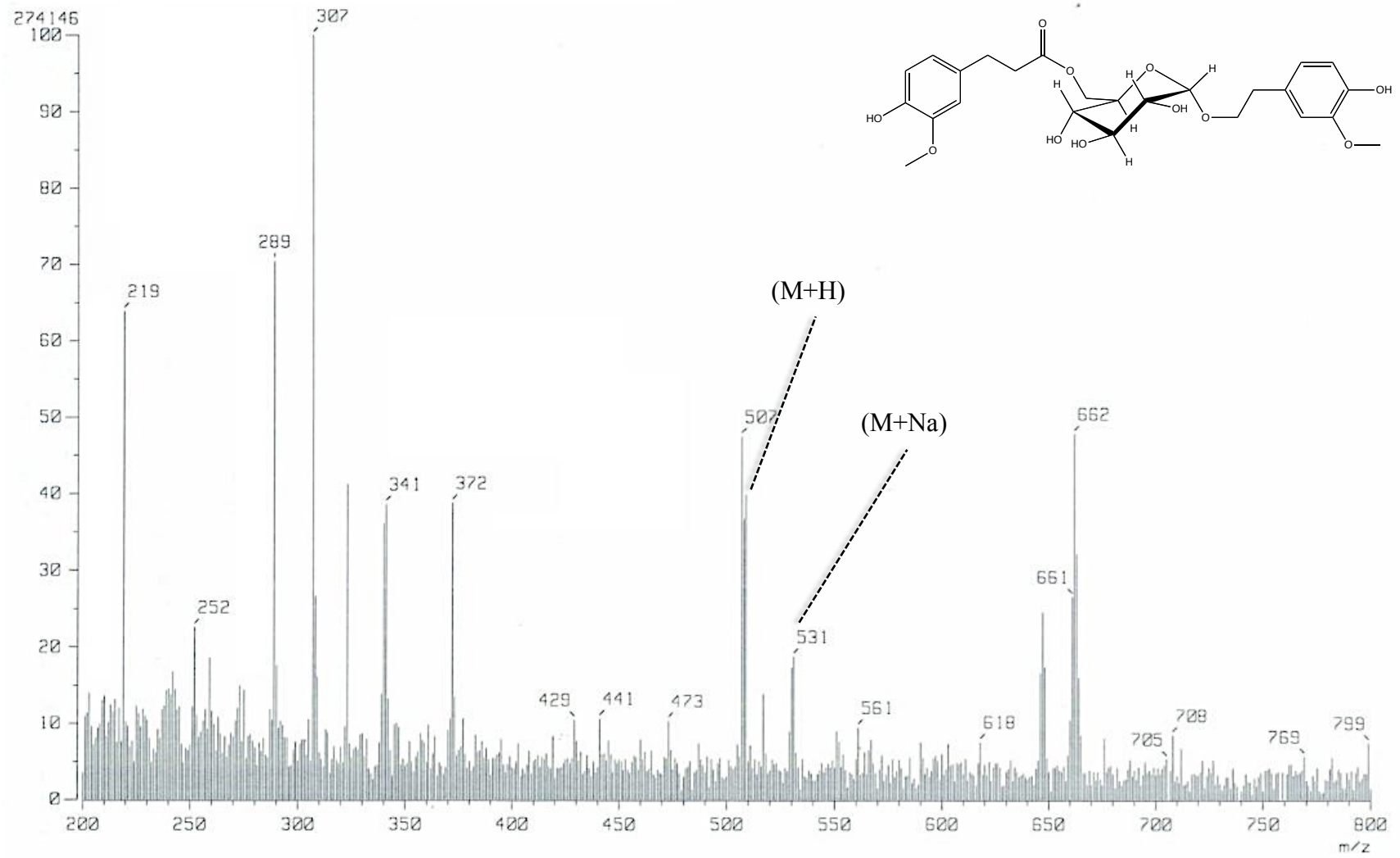


Figura 42.- Espectro de masas FAB (+) para el PPG- α -DHF.

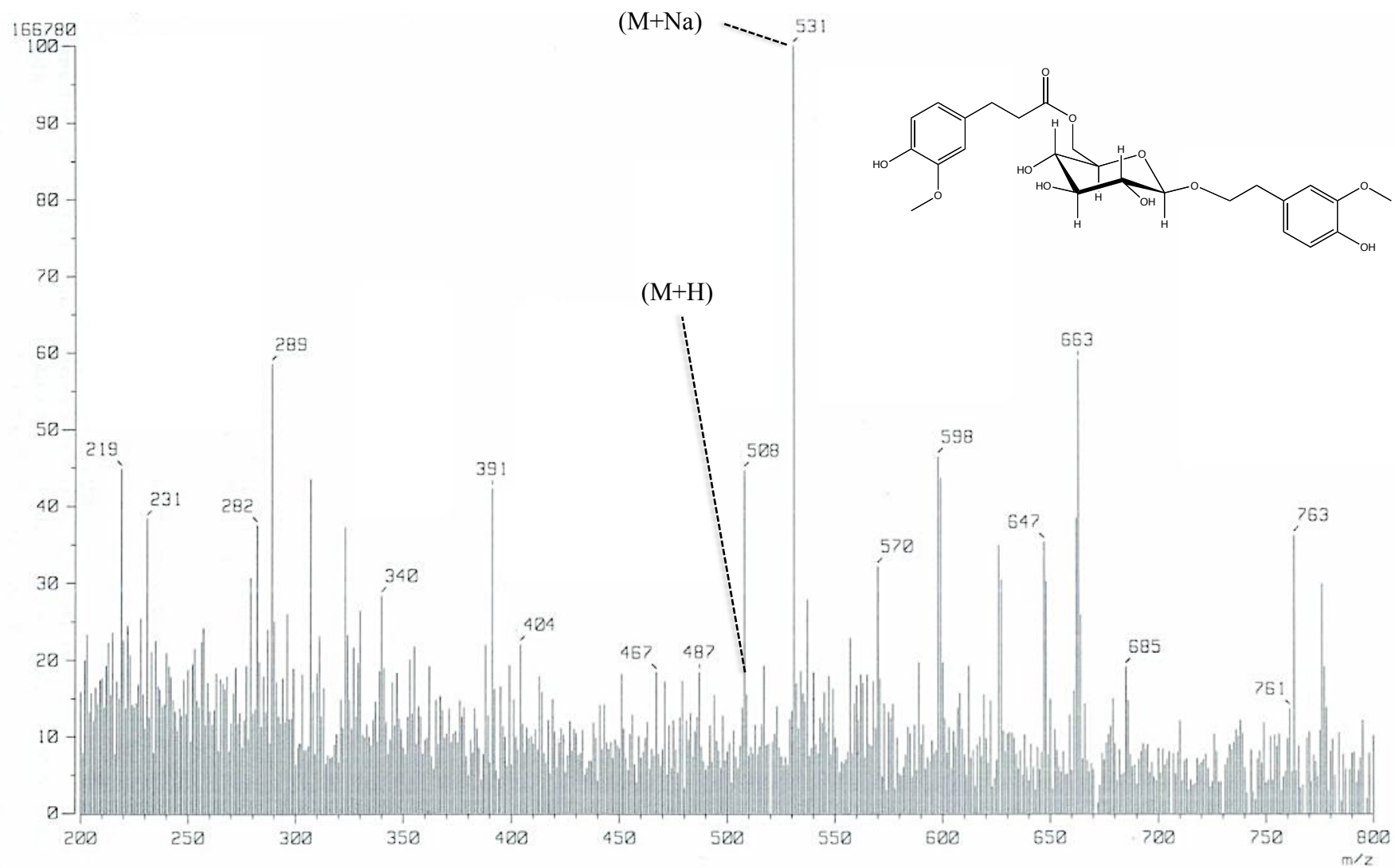


Figura 43.- Espectro de masas FAB (+) para el PPG-β-DHF.

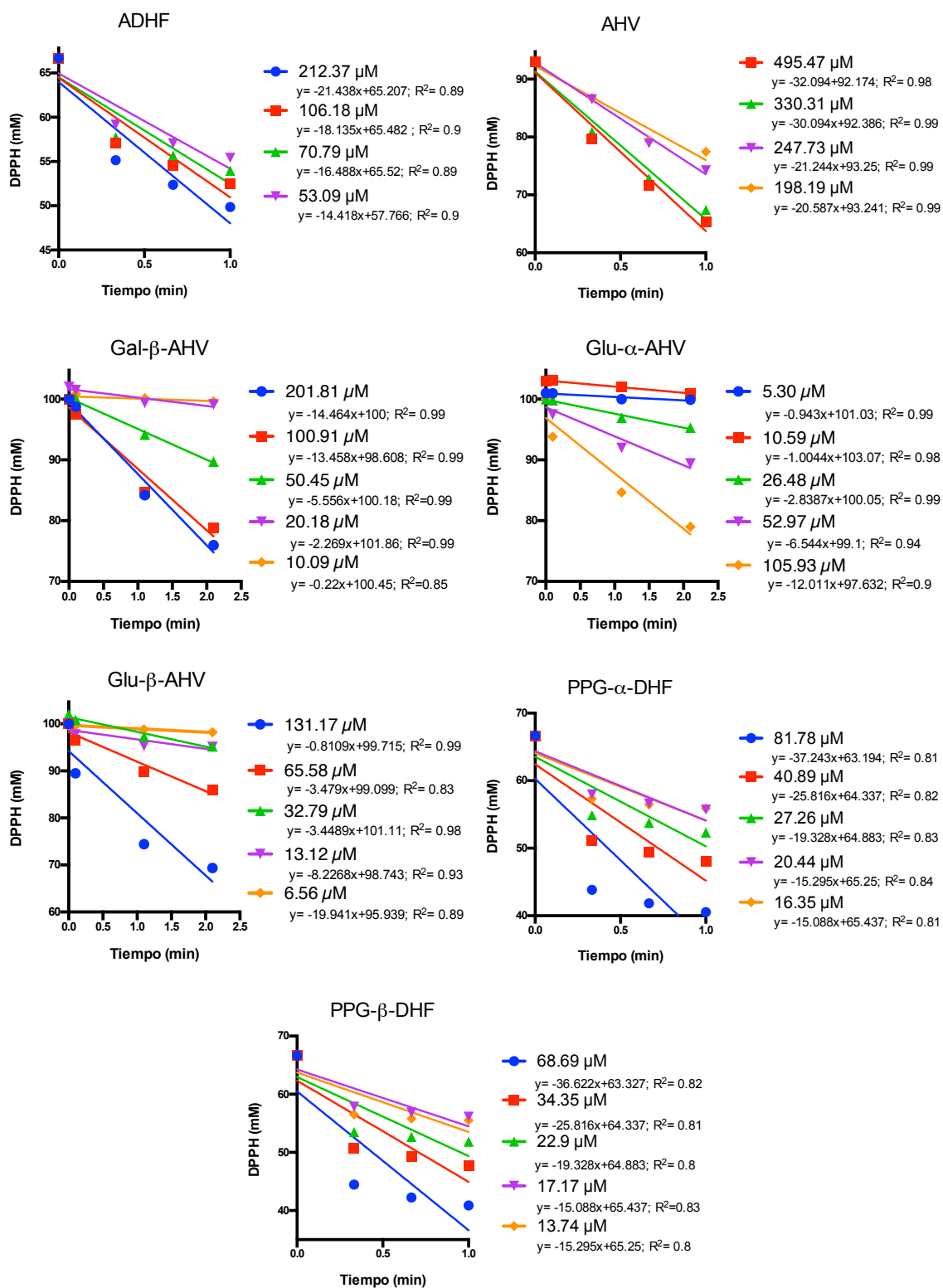


Figura 44.- Cinéticas de atrapamiento del radical DPPH. Las ecuaciones mostradas del lado derecho presentan la ecuación de la recta a la cual se ajustaron los puntos.