



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EPR DEL  
POLI(ÁCIDO GÁLICO) SINTETIZADO ENZIMÁTICAMENTE**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**P R E S E N T A:**

**ESPINO GONZALEZ ANA CARLA**

**MÉXICO, D.F., 2016**





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.

**JURADO ASIGNADO:**

<b>Presidente</b>	Profesor Arturo Navarro Ocaña
<b>Vocal</b>	Profesora Carolina Peña Montes
<b>Secretario</b>	Profesor Miquel Gimeno Seco
<b>Primer suplente</b>	Profesor Juan Manuel Germán Acacio
<b>Segundo suplente</b>	Profesora Nayeli López Balbiux

**Lugar donde se realizó la investigación**

Laboratorios 314, departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E,  
Facultad de Química, UNAM

**Asesor del tema:**

Dr. Miquel Gimeno Seco

---

**Sustentante:**

Ana Carla Espino González

---

## ABREVIATURAS

- **ABTS:** Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico
- **AG:** Ácido Gálico
- **AE:** Actividad Enzimática
- **BHA:** hidroxibutianisol
- **BHQT:** *ter*-butilhidroquinona
- **BHT:** butilhidroxitolueno
- **DPPH:** 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo
- **E:** coeficiente de extinción molar
- **EPR:** Resonancia Paramagnética Electrónica
- **ET:** Equivalentes Trolox
- **HRP:** Peroxidasa de rábano
- **KCl:** cloruro de potasio
- **KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:** fosfato de potasio monobásico
- **KOH:** hidrocido de potasio
- **IC<sub>50</sub>:** Capacidad Antioxidante
- **LiCl:** cloruro de litio
- **LTV:** lacasa *Trametes versicolor*
- **NaCl:** cloruro de sodio
- **Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:** fosfato de sodio dibásico
- **NaOH:** hidróxido de sodio
- **mb:** milibares
- **mg:** miligramos
- **min:** minutos
- **mL:** mililitros
- **nm:** nanómetros
- **PGAL:** Poli(Ácido Gálico)
- **PM:** peso molecular promedio en número determinado por SEC
- **RMN:** Resonancia Magnética Nuclear
- **SEC:** Cromatografía de exclusión por tamaño
- **Trolox:** Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

# ÍNDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>2</b>
<b>1. ANTECEDENTES .....</b>	<b>3</b>
1.1 Radicales libres .....	3
1.2 ¿Que son los antioxidantes? .....	3
1.3 ¿Qué son los polifenoles? .....	5
1.4 El ácido gálico (AG).....	8
1.5 Polimerización enzimática .....	10
1.5.1 La lacasa de <i>Trametes versicolor</i> (LTV) .....	10
1.5.2 La Peroxidasa de rábano (HRP) .....	12
1.6 Capacidad antioxidante .....	15
1.6.1 Métodos de determinación de capacidad antioxidante .....	15
1.6.2 Técnica de EPR .....	16
1.7 Antecedentes de grupo.....	18
1.8 Justificación .....	19
<b>2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVO .....</b>	<b>20</b>
2.1 Hipótesis .....	20
2.2 Objetivo general.....	20
2.3 Objetivos específicos .....	20
<b>3. METODOLOGÍAS .....</b>	<b>21</b>
3.1 Materiales .....	21
3.2 Determinación de la actividad enzimática de la enzima LTV .....	21
3.3 Determinación de la actividad enzimática de la enzima HRP .....	22
3.4 Síntesis enzimática de PGAL con LTV libre .....	22

3.5 Inmovilización de TLV en Polivinilalcohol (PVA) y Polietilenglicol (PEG) .....	23
3.6 Síntesis enzimática de PGAL con LTV inmovilizada .....	23
3.7 Síntesis enzimática de PGAL con HRP .....	24
3.8 Determinación de Capacidad Antioxidante por EPR con DPPH .....	25
3.9 Determinación del porcentaje de inhibición con DPPH.....	25
3.10 Determinación de Capacidad Antioxidante por UV-visible con ABTS .....	26
3.11 Espectroscopia FT-IR .....	26
3.12 Resonancia Magnética Nuclear .....	26
3.13 Cromatografía de líquidos SEC .....	27
<b>4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>28</b>
4.1 Determinación de la actividad enzimática específica U/mg de la LTV libre, LTV inmovilizada y HRP libre .....	28
4.2 Síntesis enzimática y caracterización de los PGAL obtenidos .....	28
4.2.1 Espectroscopia FT-IR .....	30
4.2.2 Resonancia Magnética Nuclear .....	31
4.3 Determinación de % de inhibición con respecto al radical DPPH .....	33
4.4 Determinación de Capacidad Antioxidante por UV-visible con ABTS .....	34
4.5 Determinación de Capacidad Antioxidante por EPR con DPPH .....	36
4.6 Compilación de resultados .....	38
<b>5.- CONCLUSIONES .....</b>	<b>40</b>
<b>6.- Trabajo futuro .....</b>	<b>40</b>
<b>7.- BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>41</b>
<b>8.- APÉNDICES.....</b>	<b>44</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Representación de un antioxidante .....	4
Figura 2 Clasificación de antioxidantes por origen.....	4
Figura 3 Clasificación de antioxidantes por su origen biológico .....	5
Figura 4 Clasificación de polifenoles por estructura química .....	6
Figura 5 Estructura básica de los flavonoides y sistema de numeración .....	6
Figura 6 Estructura química del ácido gálico .....	9
Figura 7 Estructura tridimensional de la LTV .....	11
Figura 8 Formación de radicales libre de derivados fenólicos con LTV. ....	12
Figura 9 Estructura tridimensional de HRP .....	13
Figura 10 Mecanismo de reacción general de las peroxidasa .....	14
Figura 11 Mecanismo de polimerización del fenol .....	15
Figura 12. Mecanismos de reacción por transferencia de electrones y transferencia de átomos de hidrógeno .....	16
Figura 13 Reacción enzimática general para la polimerización AG con LTV .....	18
Figura 14 Reacción enzimática general para la polimerización AG con HRP .....	28
Figura 15 Espectro FT-IR del AG (verde), PGAL con HRP (azul) y PGAL con lacasa (rojo) .....	30
Figura 16 Espectro de 1H RMN de AG .....	31
Figura 17 Espectro de 1H RMN de PGAL con lacasa.....	32
Figura 18 Espectro de 1H RMN de PGAL con HRP .....	32
Figura 19 Ampliación de la región aromática del espectro de 1H RMN de PGAL sintetizado con HRP. ....	32
Figura 23 Reducción del radical DPPH para PGAL-LTV-L.....	37

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Ejemplos de derivados de ácido benzoico y ácido cinámico .....	8
Tabla 2 Resultados de la U específica de LTV libre, LTV inmovilizada y HRP .....	28
Tabla 3 Rendimientos y distribución de PM de los productos sintetizados .....	29
Tabla 4 Resultados de los % de inhibición con respecto al radical DPPH.....	33
Tabla 5 Curva patrón de Trolox.....	34
Tabla 6 Equivalentes Trolox para PGAL .....	35
Tabla 7 Capacidad antioxidante IC50 con respecto al DPPH por EPR .....	36
Tabla 8 Comparación de resultados .....	39



## RESUMEN

En el presente trabajo se estudiara el efecto del grado de polimerización de ácido gálico sobre el la capacidad antioxidante del polímero, sintetizado con ayuda de enzimas oxidoreductasas como lo son la lacasa de *Trametes versicolor* y la peroxidasa de rábano, obteniendo un producto soluble en agua y con capacidad antioxidante. La poli-oxidación enzimática del ácido gálico (AG) con la enzima LTV y HRP, se lleva acabo manteniendo fijas variables como pH, temperatura e inyección de oxígeno o peróxido de hidrógeno, lo cual nos permite obtener un material novedoso soluble en agua, llamado PGAL, el cual al ser un polímero del ácido gálico (antioxidante de referencia), continua teniendo un poder antioxidante. Se obtuvieron 5 materiales diferentes, los cuales tenían pesos moleculares diferentes (PGAL-LTV-L 7576 g/mol, PGAL-LTV-I A 4833 g/mol, PGAL-LTV-I B 4834 g/mol, PGAL-HRP A 4838 g/mol y PGAL-HRP B 4839 g/mol). Además de que el PGAL sintetizado con lacasa tiene enlaces fenil-fenil y es lineal mientras que el PGAL sintetizado con HRP tiende a ser ramificado y puede tener enlaces fenil-fenil y fenil-oxi.

Como es conocido los fenoles debido a la presencia de uno o varios grupos hidroxilo fusionados con el anillo bencénico le confieren propiedades antioxidantes a la molécula esperándose que partiendo del monómero de AG el cual es utilizado como referencia en la medición de antioxidancia, al ser polimerizado mantenga su capacidad antioxidante, esto se analizó por diferentes métodos de determinación de capacidad antioxidante como la técnica espectrofotométrica del radical DPPH donde el PGAL-HRP A y el PGAL-HRP B tienen un porcentaje de inhibición de mayor con valores 77.86 y 72.93. Los resultados con EPR se encuentran PGAL-HRP A es más oxidante que el PGAL-HRP B. Y por último los Equivalentes Trolox donde los PGAL-LTV-I A y PGAL-LTV-I B más antioxidantes y por último EPR. Tomando en cuenta el tamaño y tipo de la cadena que podría tener se puede observar de que manera influye éste en las características antioxidantes de los materiales sintetizados en este trabajo.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad se ha motivado la búsqueda o generación de materiales multifuncionales, con propiedades antimicrobianas, antioxidantes, antiinflamatorias, entre otros. La modificación de fenoles catalizada por enzimas ha sido estudiada debido a sus ventajas sobre las rutas químicas tradicionales, como condiciones de reacción no drásticas en ausencia de reactivos tóxicos, así como su estabilidad, versatilidad y actividad. Entre ellas, la glucosilación o la alquilación vía esterificación con lipasas o esterasas (Xu, *et al.*, 2006). Por otro lado, existe la dimerización o polimerización, dependiendo de las condiciones de reacción, empleando oxidoreductasas. En el caso de la polimerización, su síntesis se ha hecho importante por ejemplo en la consecución de derivados poli-fenólicos con estructuras altamente conjugadas. En general, en este tipo reacciones es difícil tener control sobre la estructura del producto, debido a que el mecanismo de polimerización consiste en la formación de radicales libres y en el medio de reacción es donde éstos se acoplan al azar mediante enlaces fenil-oxi o fenil-fenil (López, 2014).

Los polifenoles son un grupo antioxidantes que se ingieren habitualmente en la dieta, los cuales cuentan con gran actividad antioxidante y resultan interesantes para industrias químicas, farmacéuticas o alimentarias, entre otras. Se encuentran en alimentos como el vino, cerveza o el aceite de oliva y cáscara de las frutas. La capacidad antioxidante puede estar asociada al estrés oxidativo y/o procesos inflamatorios por lo que estas moléculas son muy recomendables para la prevención de enfermedades. Entre ellas destaca prevención del cáncer y otras de índole cardiovascular (Tovar del Río, 2013). Uno de los polifenoles naturales más usado es el AG, el cual en el grupo de trabajo se polimerizó por primera vez usando LTV dando lugar al PGAL, el cual es un antioxidante, teniendo como propiedad diferencial respecto a su predecesor el ser muy soluble en agua, hasta 500 mg/mL e incluso conductor y antimicrobiano, entre otros (López, 2014).

En este trabajo se ha estudiado la poli-oxidación enzimática del AG con LTV y HRP enfocándonos en la capacidad inhibitoria de radicales libres o capacidad antioxidante, determinándolo por distintos métodos.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Radicales libres

Desde el punto de vista químico los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital de alta energía dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad (Venereo, 2002).

En este sentido, el oxígeno está asociado a las condiciones de vida aerobia y representa la fuerza motriz para el mantenimiento del metabolismo y viabilidad celular al mismo tiempo que involucra un peligro potencial debido a las características paramagnéticas de este gas, responsable de la formación de intermediarios parcialmente reducidos y dotados de una alta reactividad, conocidas como especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en ingles). Los ROS son radicales libres o precursores de radicales. Las especies reactivas del oxígeno son los principales radicales libres ya que tiene dos electrones desapareados (Trejo, *et al.*, 2011).

Entre los ROS destaca:

- **Radicales:** ion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), alcoxilo ( $RO^{\cdot}$ ), peroxilo ( $ROO^{\cdot}$ ) y óxido de nitrógeno ( $NO^{\cdot}$ )
- **No radicales:** peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), oxígeno singulete ( $\cdot O_2$ ) y peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) ((Trejo, *et. al.*, 2011)

Gracias a los antioxidantes se puede controlar los niveles de radicales libres y así mismo el daño oxidativo puede ser prevenido (Delgado, *et al.*, 2010).

### 1.2 ¿Que son los antioxidantes?

Los antioxidantes son moléculas capaces de prevenir o retardar la oxidación (pérdida de uno o más electrones) de otras moléculas, generalmente sustratos biológicos como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, los cuales pueden ser clasificados como un terminador de radicales libres, queladores de iones metálicos

capaces de catalizar la oxidación lipídica o como secuestrador (scavenger) de los radicales, como por ejemplo el oxígeno (Itzincab, 2014).

Los antioxidantes son capaces de donar electrones para estabilizar a los radicales libres y neutralizar sus efectos dañinos. Estos pueden ser de origen endógeno (sintetizado por el organismo) y exógeno (provenientes de fuentes externas, es decir de los alimentos) como se muestra en la Figura 1 (Delgado, *et al.*, 2010).

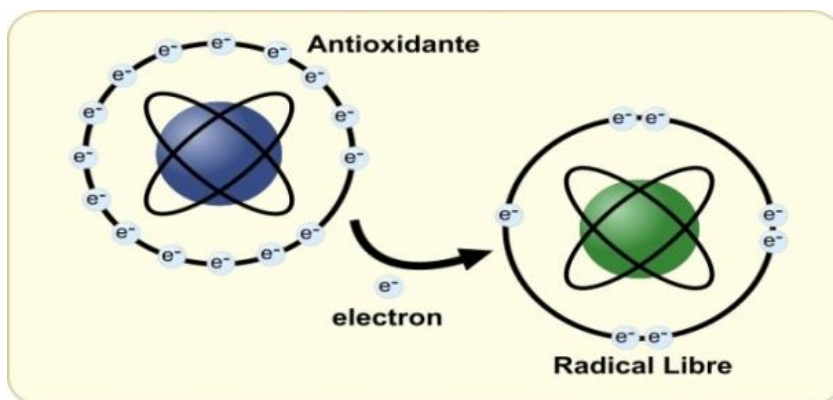


Figura 1 Representación de un antioxidante

(<http://musculo.xyz/reviews/el-radical-libre>)

Los antioxidantes por su origen se clasifican en:

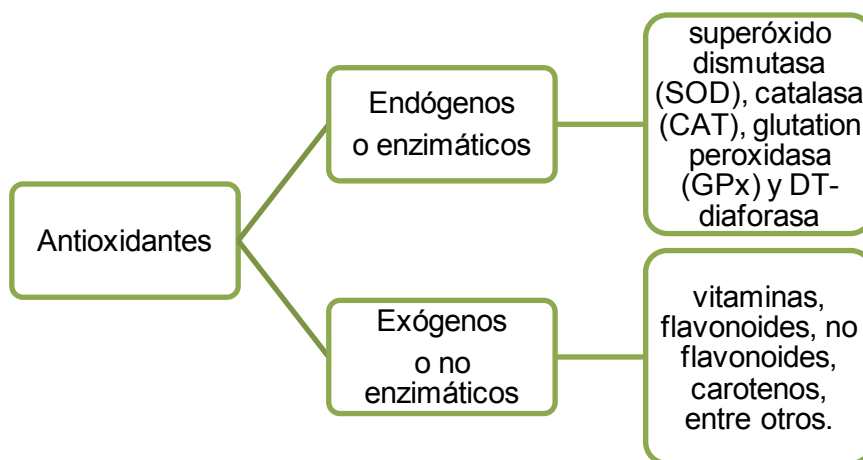


Figura 2 Clasificación de antioxidantes por origen

En la actualidad hay distintas clases de antioxidantes los cuales son clasificados de acuerdo a su estructura química y su origen bioquímico como se muestra en el Figura 3 (Delgado, *et al.*, 2010).

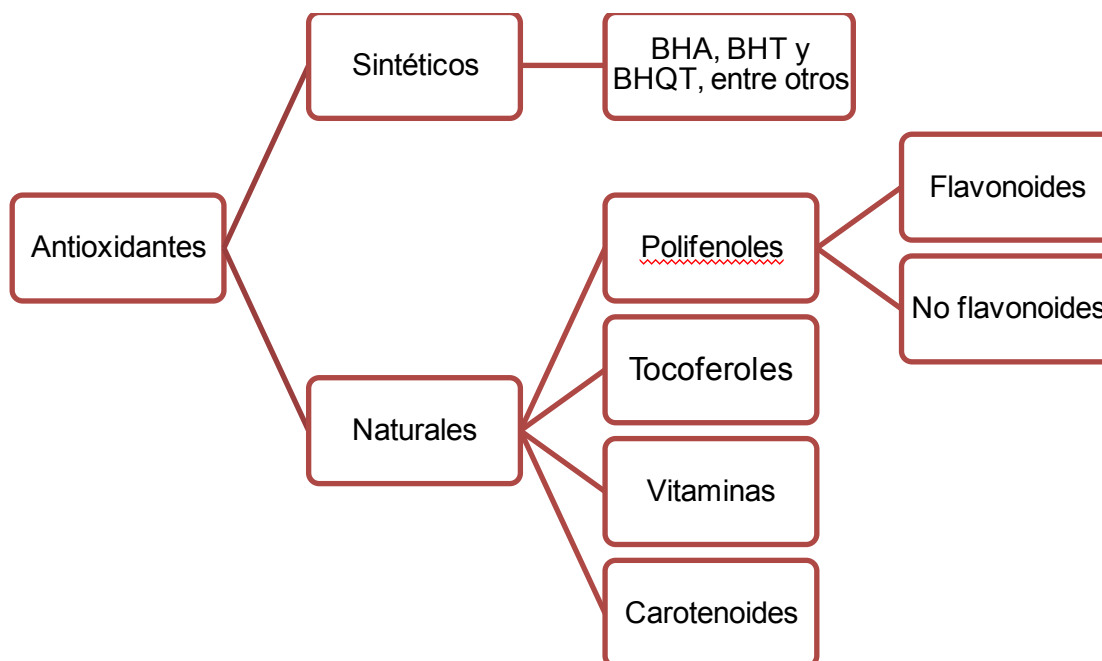


Figura 3 Clasificación de antioxidantes por su origen biológico

### 1.3 ¿Qué son los polifenoles?

Los polifenoles son compuestos provenientes del metabolismo secundario de las plantas y se encuentran naturalmente en alimentos y bebidas de origen vegetal. Desde el punto de vista químico se caracterizan por la presencia de uno o más anillos bencénicos (Padilla, *et al.*, 2008). Las sustancias fenólicas o polifenoles constituyen un grupo muy numeroso de sustancias que incluyen familias de compuestos con estructuras diversas. Los polifenoles pueden ser divididos en varios subgrupos atendiendo a su estructura básica (Quiñones, *et al.*, 2012), como se muestra a continuación (Figura 4):

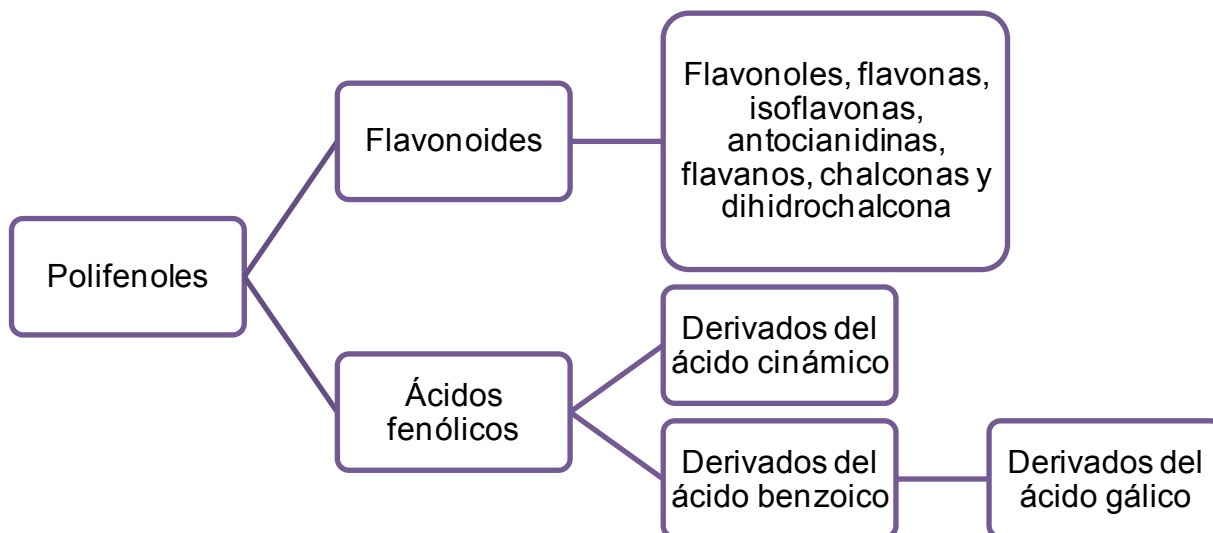


Figura 4 Clasificación de polifenoles por estructura química

Estos fenoles con peso molecular relativamente alto pueden tener un poder antioxidante 20 veces más fuerte que la vitamina E, esta actividad antioxidante es consecuencia de la estructura química de los polifenoles (Padilla, *et al.*, 2008).

El término flavonoide denota un grupo muy amplio de compuestos polifenólicos caracterizados por poseer dos anillos aromáticos bencénicos unidos por un puente de tres átomos de carbono, con la estructura general C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, (Figura 5) los cuales pueden o no un tercer anillo (Cartaya, *et al.*, 2001).

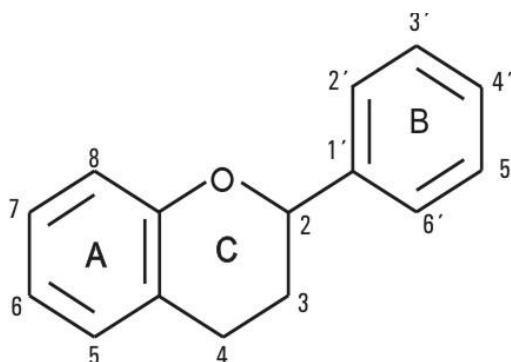


Figura 5 Estructura básica de los flavonoides y sistema de numeración

([http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol22\\_1\\_03/f0107103.jpg](http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol22_1_03/f0107103.jpg))

En la Figura 5 los anillos son denominados A B y C; los átomos de carbono individuales son referidos por un sistema numérico, el cual utiliza números ordinarios para los anillos A y C y números primos para el anillo B (Cartaya, *et al.*, 2001).

En función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

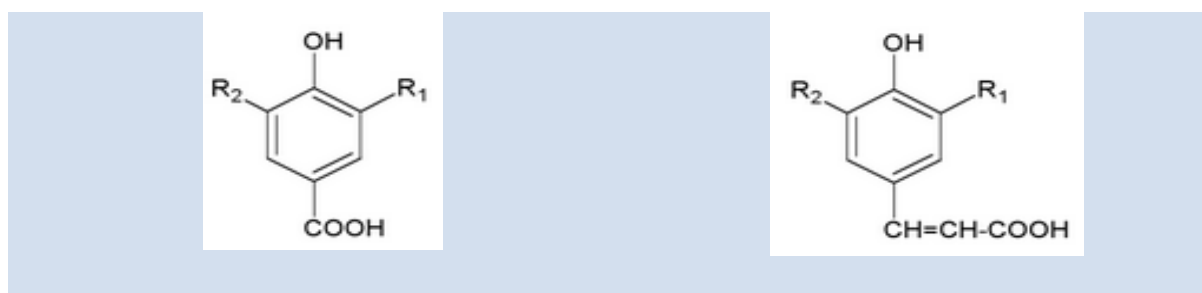
- **Flavanos:** como la catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
- **Flavonoles:** representados por la quercitina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
- **Flavonas:** como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.
- **Antocianidinas:** que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.
- **Isoflavonas:** el anillo B está en la posición 2, poseen un anillo bencénico lateral en posición C y grupos hidroxilos en los carbonos C7 y C4.
- **Chalconas y dihidrochalconas:** son poco abundantes, pues se convierten en flavanonas en medio ácido y la reacción es fácilmente observable “*in vitro*” (Cartaya, *et al.*, 2001).

Por otro lado los ácidos fenólicos se caracterizan por la presencia de un esqueleto fenólico, que se compone de un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo, teniendo como los más abundantes los derivados del ácido benzoico y el ácido cinámico. Su actividad antioxidante se debe fundamentalmente a la capacidad de donar átomos de hidrógeno y de captar los radicales libres por medio del grupo fenólico (Iglesias, 2009).

Los derivados del ácido cinámico están formados por 9 átomos de carbono mientras que los derivados del ácido benzoico poseen 7 átomos de carbono y son los más simples que se encuentran en la naturaleza (Iglesias, 2009).

Tabla 1 Ejemplos de derivados de ácido benzoico y ácido cinámico

Derivados del ácido benzoico			Derivados del ácido cinámico		
Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Ácido dihidroxibenzoico	-OH	-H	Ácido p-cumárico	-H	-H
Ácido gálico	-OH	-H	Ácido ferúlico	-H	-OCH
Ácido p-hidroxibenzoico	-H	-H	Ácido sinápico	-OCH	-OCH
Ácido vainílico	-H	-OCH	Ácido cafeico	-OH	-H
Ácido siríntrico	-OCH	-OCH			



De los principales derivados del ácido benzoico tenemos el AG, del cual se tiene conocimientos que este compuesto inhibe la oxidación de sustratos, moléculas simples y complejas, es por esto, que se le atribuyen diversas propiedades biológicas, ya que han mostrado algunos beneficios en la salud (Iglesias, 2009).

#### 1.4 El ácido gálico (AG)

El AG, también conocido como ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico (figura 6), es un ácido fenólico presente en diversas fuentes naturales como plantas, diversas frutas (uva, granada, nueces, plátano, fresa, limón, arándano, cáscara de



manzana y mango), verduras (acelgas y espinacas) y bebidas (café, vino tinto y té verde). Es producido industrialmente por la hidrólisis ácida de galotaninos (presentes en el aceite de la nuez de agalla) y en menor grado a través de la hidrólisis enzimática de éstos usando caldos diluidos de *Aspergillus niger* o *Penicillium glaucum* que contengan tanasas (Taitzoglou, *et al.*, 2001).

Los usos principales del AG se dan en fotografía, en tintas de impresión, en la producción de antimicrobianos, antivirales, analgésico, incluso exhibe actividad cito-tóxica contra células cancerosas; también se utiliza en la determinación de fenoles totales de extractos expresados como equivalentes de AG mediante el procedimiento de Folin–Ciocalteu y para la manufactura de alquil galatos, los cuales son usados como antioxidantes en aceites y productos grasos (López, *et al.*, 2014).

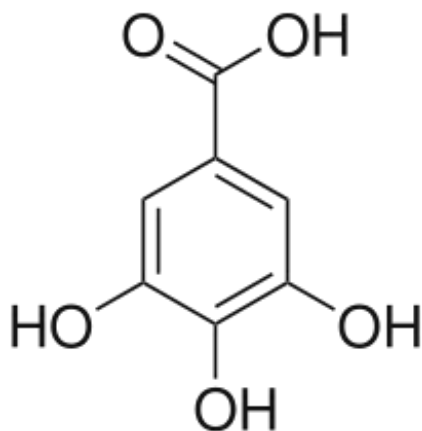


Figura 6 Estructura química del ácido gálico

(<http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%209/2.html>)

Asimismo, se le atribuyen varios efectos biológicos, que van desde la actividad antiinflamatoria, antioxidante y antibiótica, hasta la protección cardiovascular y anticancerígena. Destacando su actividad antioxidante y anticancerígena, debido a que es un compuesto donador de electrones, que neutraliza radicales libres, siendo estos los causantes de algunos padecimientos como envejecimiento, cardiopatías y en algunos casos cáncer (López, 2014; Sharma *et al.*, 1997; Kim, 2007).

## 1.5 Polimerización enzimática

En los últimos años se ha estudiado la polimerización enzimática como una alternativa de síntesis, alternativa a los métodos convencionales que involucran pH extremo, materiales tóxicos y cargas de calor (Kobayashi, *et al.*, 2003).

La polimerización enzimática de compuestos fenólicos usando medios normalmente mezcla de disolventes orgánicos miscibles en agua a pH controlado ha sido muy estudiada en los últimos 20 años. Esta vía de síntesis provee una alternativa en la cual se han empleado enzimas oxidoreductasas, como los son la lacasa de *Trametes versicolor* (LTV) y Peroxidasa de rábano (HRP), esperando que los catalizadores enzimáticos provean nuevos materiales poliméricos de estructura molecular difícil de obtener por un método convencional (Xu, *et al.*, 2006).

La naturaleza provee un claro ejemplo del poder de las enzimas en la preparación de polímeros fenólicos a través de la síntesis de lignina, uno de los polímeros más abundante sobre la tierra. Las suaves condiciones de reacción aunadas a la alta reactividad y estabilidad de la familia de las oxidoreductasas (que son enzimas que catalizan la transferencia de electrones, participando en reacciones REDOX) las hacen ideales para las aplicaciones de síntesis. En particular, la HRP y la LTV, han sido usadas para sintetizar polímeros y copolímeros fenólicos a partir de un amplio intervalo de monómeros, incluyendo *p*-cresol, *p*-fenilfenol, varios naftalenos y el mismo fenol (López, *et al.*, 2014).

### 1.5.1 La lacasa de *Trametes versicolor* (LTV)

Las lacasas (benzenodiol:dioxígeno oxidorreductasa) son enzimas con actividad fenoloxidasas que contienen átomos de cobre en su centro activo (Figura 7). Catalizan la oxidación de un amplio rango de compuestos aromáticos en un proceso acoplado a la reducción del oxígeno molecular en agua, pertenecen al grupo de las oxidasas multicobre (ascorbato oxidasa, ceruloplasmina, fenoxacinona sintasa, bilirrubin oxidasa, entre otras) (Moya, 2011).

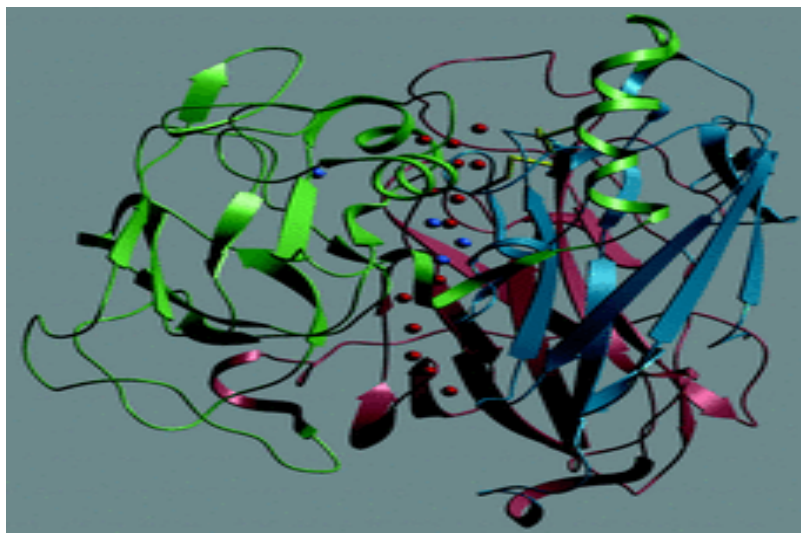


Figura 7 Estructura tridimensional de la LTV

(López, 2014)

La lacasa es una enzima comúnmente monomérica que normalmente contiene 4 átomos de cobre unidos a 3 sitios redox, clasificados de acuerdo a sus características espectroscópicas. El sitio tipo 1(T1) es mononuclear y le confiere el color azul a la enzima en solución y se caracteriza por una banda de absorción a 600 nm. El sitio tipo 2 (T2) también es mononuclear y presenta una geometría metálica trigonal y propiedades de Resonancia Paramagnética Nuclear comparables con los complejos tetragonales de Cu(II). Finalmente, el sitio tipo 3 (T3) es dinuclear y presenta un estado basal diamagnético que se origina por el acoplamiento antiferromagnético fuerte entre los dos iones Cu (II), conectados por un ión hidroxilo. En el Sitio T1 el sustrato interactúa con la enzima y se lleva a cabo la sustracción de un electrón, mientras que en el sitio T2/T3 se lleva a cabo la reducción del oxígeno a agua (figura 8) (Román, *et al.*, 2001).

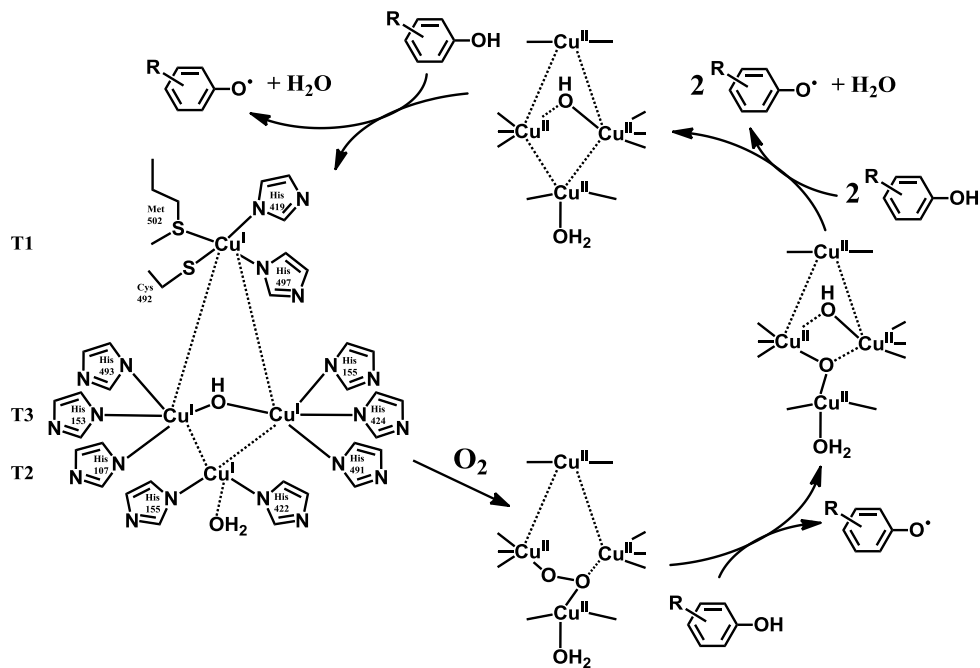


Figura 8 Formación de radicales libre de derivados fenólicos con LTV.

(Roman, *et al.*, 2001)

### 1.5.2 La Peroxidasa de rábano (HRP)

Las peroxidasa son oxidoreductasas que se encuentran distribuidas en el reino vegetal, los tejidos animales y microorganismos. Catalizan la oxidación de un amplio número de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando la capacidad oxidante del peróxido de hidrógeno. De entre ellas, la extraída del rábano picante, por sus siglas en Inglés HRP (Figura 9), horseradish peroxidase, es la más usada (Gutiérrez, 2011).

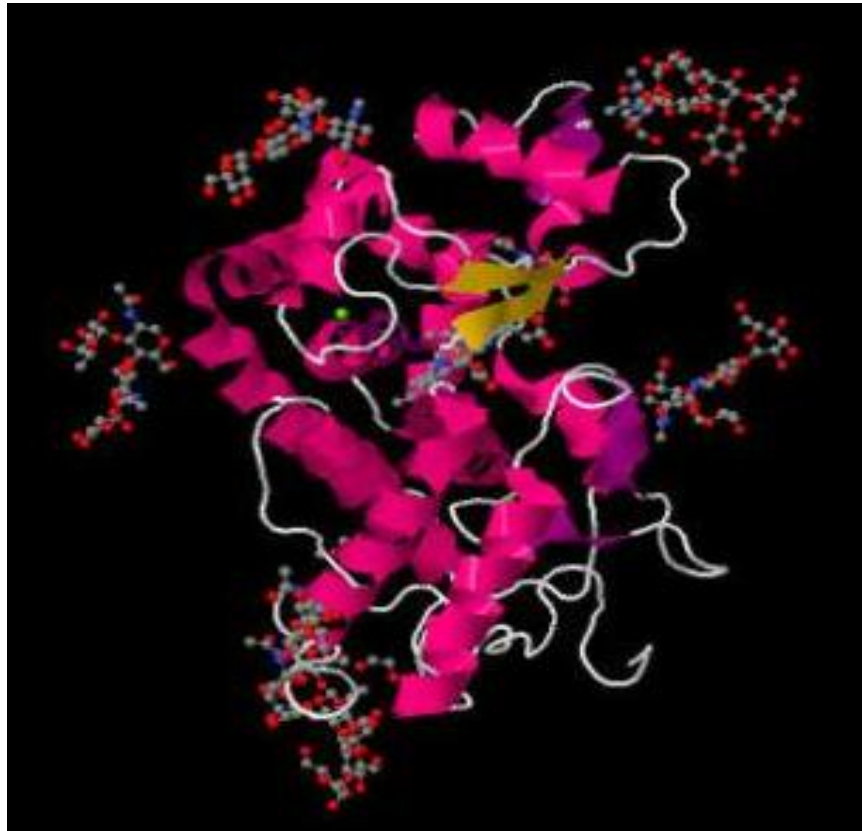


Figura 9 Estructura tridimensional de HRP

(<https://doityourselfscience.wordpress.com/2013/04/09/como-comprobar-la-actividad-peroxidasa-en-plantas/>)

Las peroxidasas son utilizadas en laboratorios clínicos y en la industria. Así, los ensayos para la determinación y cuantificación de metabolitos como glucosa, ácido úrico, colesterol o triglicéridos en fluidos biológicos usan peroxidasas como enzima acoplada. (Gutiérrez, 2011).

Las peroxidasas catalizan reacciones de peroxidación, como se muestra en la figura 10:

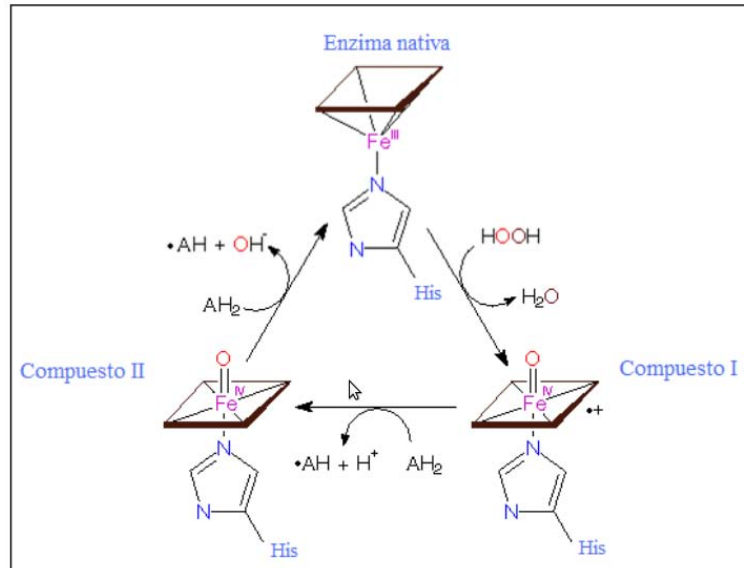
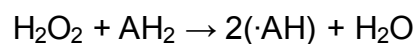


Figura 10 Mecanismo de reacción general de las peroxidasa

En el ciclo catalítico presentado en la Figura 10, la enzima nativa es oxidada por peróxido de hidrógeno formando el Compuesto I. Esto implica una reacción de óxido-reducción de dos electrones en la que el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) es reducido a agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ) y la enzima es oxidada. Un equivalente de oxidación reside en el hierro en forma de un intermediario oxoferril ( $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ ) y el otro, en la mayoría de las peroxidasa, reside en la porfirina (en forma de radical catiónico  $\pi$  de la porfirina, representado en la Figura 10 como  $\cdot+$ ). A continuación, el Compuesto I puede oxidar un sustrato ( $\text{AH}_2$ ) mediante una reacción de transferencia electrónica en la que se forma el radical del sustrato correspondiente ( $\cdot\text{AH}$ ). La enzima queda como Compuesto II con un centro  $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$  coordinado con la porfirina que ha recuperado su electrón. Finalmente, el  $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$  del Compuesto II es reducido a la forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ) de la enzima nativa mediante la sustracción de un electrón de otra molécula de sustrato, liberando un segundo radical libre ( $\cdot\text{AH}$ ) (Sakharovl, *et al.*, 1999).

La reacción enzimática general se presenta a continuación:



Los radicales libres formados durante el ciclo catalítico se unen formando cadenas de polímeros con baja solubilidad y que tienden a precipitar en la solución. En la remoción de fenol, los radicales formados son radicales fenoxil que pueden acoplarse entre sí para generar diversos oligómeros y polímeros (Figura 11) (Sakharovl, *et al.*, 1999).

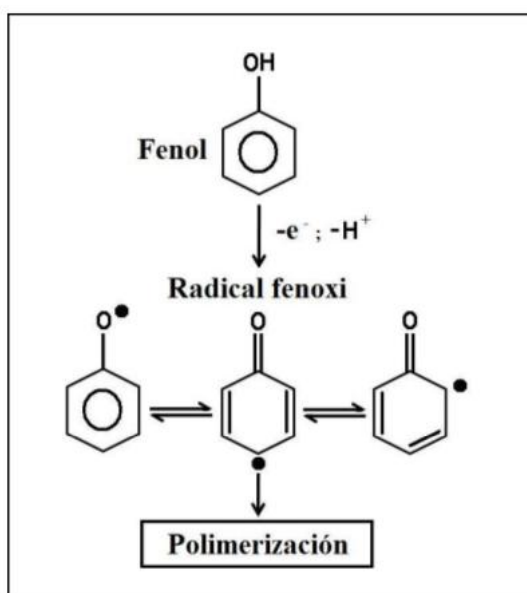


Figura 11 Mecanismo de polimerización del fenol

## 1.6 Capacidad antioxidante

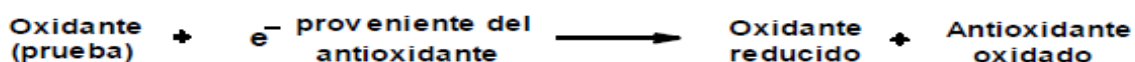
La capacidad antioxidante se define como la habilidad de moléculas redox en alimentos y sistemas biológicos para retardar o evitar la formación de radicales libres (Itzincab, 2012).

### 1.6.1 Métodos de determinación de capacidad antioxidante

Con base a las reacciones químicas (Figura 12), la gran mayoría de los ensayos para determinar de capacidad antioxidante pueden ser divididos en dos categorías (Huang, *et al.*, 2005).

- Ensayos basados en la reacción por transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)
- Ensayos basados en la reacción por transferencia de electrones (ET)

## Ensayos ET



## Ensayos HAT

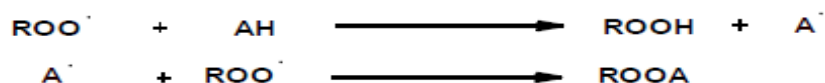


Figura 12. Mecanismos de reacción por transferencia de electrones y transferencia de átomos de hidrógeno

Los ensayos basados en la transferencia de electrones (ET) involucran una reacción redox con el oxidante como un indicador del punto final de reacción (Huang, *et al.*, 2005).

En los últimos años se han adoptado un amplio rango de ensayos espectrofotométricos para medir la capacidad antioxidante de los alimentos, muestras biológicas y extractos vegetales. Usualmente los ensayos antioxidantes *in vitro* utilizan un captador de radicales libres y son relativamente sencillos de realizar (Mercado, *et al.*, 2013).

Algunos métodos utilizados para determinar la capacidad antioxidante son:

- El método de ABTS (Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (Ver Apéndice B).
- Método del radical DPPH (Ver Apéndice B).
- Determinación de la actividad antioxidante por Espectroscopia paramagnética electrónica (EPR)

### 1.6.2 Técnica de EPR

La EPR es una clase de espectroscopia de absorción en la cual una radiación de microondas produce transición entre niveles de energía magnética de electrones desapareados. Usualmente, el origen de su paramagnetismo es un



radical libre para moléculas orgánicas o un ión de un metal de transición, en compuestos inorgánicos (Kvist, *et al.*, 1986).

La espectroscopía EPR mide las diferencias de energía entre los estados originados por el desdoblamiento que se genera al poner un sistema con electrones desapareados en un campo magnético externo (efecto Zeeman). La diferencia de energías entre dos estados será de la forma  $g \mu_B H$ , donde  $g$  es el factor de Landé,  $\mu_B$  es el magnetón de Bohr y  $H$  el campo magnético aplicado. La denominada *condición de resonancia* para obtener en el espectro un pico de resonancia es (Weil, *et al.*, 1994):

$$h \nu = g \mu_B H$$

donde  $H$  es el campo de resonancia

Las aplicaciones de la EPR son muy numerosas y se extienden a diversos campos de investigación de la física, química, geología, biología y medicina. Una lista de las aplicaciones de la EPR incluyen: defectos puntuales paramagnéticos en monocristales (tales como: centros de color, electrones desapareados, huecos, vacancias intersticiales, iones de metales de transición y iones de tierras raras), radicales libres en fases sólidas, líquidas o gaseosas, aceptores o donadores en semiconductores y sistemas con más de un electrón desapareado (como sistemas en estado triplete, birradicales y multirradicales), en el seguimiento de radicales vivos en disolución como en estado sólido y puede determinar datos sobre la acción antioxidante y la capacidad de inhibición de radicales libres utilizando radical estable DPPH. Actualmente también se aplica en Datación y Dosimetría. Una de las principales ventajas de esta técnica a la hora de caracterizar radicales orgánicos, es que proporciona diferente información en función de las características de la muestra y permite la medida directa de la concentración de radicales libres en solución (Ikeya, 1993).

## 1.7 Antecedentes de grupo

En 2011, Carlos Juvencio López Jiménez comenzó una investigación para la síntesis de materiales polifenólicos con propiedades conductoras, mediante la poli-oxidación enzimática mediada por LTV de sustancias y derivados naturales (AG y 4FG), buscando productos que exhibieran propiedades electro-ópticas tales como conductividad o luminiscencia en donde propuso un método para sintetizar PGAL con LTV.

López propuso la reacción enzimática general que esquematiza para la polimerización de AG por medio de la enzima LTV (Figura 13).

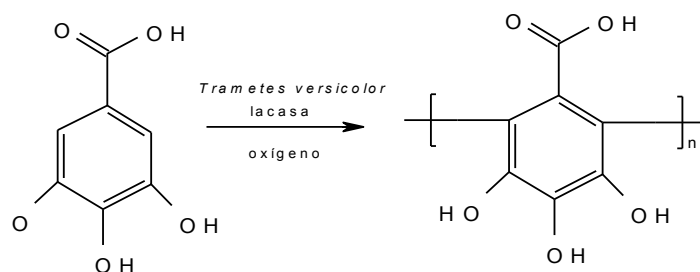


Figura 13 Reacción enzimática general para la polimerización AG con LTV

Posteriormente este trabajo se continuó analizando sus características, debido a la importancia que tienen los polifenoles, se continúan haciendo investigaciones para determinar sus propiedades antimicrobianas contra bacterias GRAM – y GRAM +, como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*, (trabajo realizado por Jocelyn Villalpando Bautista en su tesis de licenciatura), conductoras, antioxidantes, así como propiedades para recubrimiento (trabajo realizado por Alejandra Romero Montero para su tesis de Maestría).

También se ha trabajado con la síntesis de PGAL con LTV inmovilizada la cual ha sido realizada con enzimas con distintos soportes como sílice, polietilenglicol y polivinilalcohol, entre otros. (Trabajo realizado por Diego G. Garduño Troncoso para su tesis de Licenciatura)

## 1.8 Justificación

Los polifenoles son unas moléculas que tienen una gran actividad, atribuyéndoseles varias características como su capacidad antioxidante y resultan muy interesantes desde el punto de vista de la Química, de la Farmacia, de la Ingeniería Química y de la Biología. Los polifenoles se encuentran en muchos alimentos, como el vino, la cerveza o el aceite de oliva y, sobre todo, en la cáscara de las frutas. La capacidad antioxidante de estas moléculas las hace muy recomendables para la prevención de cáncer y enfermedades cardiovasculares. El Poli(ácido gálico) es un antioxidante derivado del ácido gálico, que también tiene un poder antioxidante, el cual es sintetizado con ayuda de las enzimas llamadas lacasa de *Trametes versicolor* y Peroxidasa de rábano. Se estudiara su capacidad antioxidante ya que este polímero polifenólico el cual tiene la ventaja de ser soluble en agua.

## **2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVO**

### **2.1 Hipótesis**

La polioxidación enzimática del AG dará lugar a un material soluble en agua y con propiedades antioxidantes, las cuales dependerán de su grado de polimerización.

### **2.2 Objetivo general**

Sintetizar enzimáticamente el PGAL de distintos pesos moleculares y comparar el efecto que tiene en la capacidad antioxidante mediante métodos analíticos.

### **2.3 Objetivos específicos**

- Sintetizar enzimáticamente el PGAL con LTV.
- Sintetizar enzimáticamente el PGAL con LTV inmovilizada.
- Sintetizar enzimáticamente el PGAL con HRP.
- Caracterizar los distintos materiales generados por métodos analíticos como <sup>1</sup>H RMN, SEC y FT-IR.
- Determinar el valor de IC50 antioxidante
- Determinar el porcentaje de inhibición
- Determinar el valor de Equivalentes Trolox (ET)

### 3. METODOLOGÍAS

Se realizaron 5 síntesis de las cuales los productos se nombraron como:

- **PGAL-LTV-L:** sintetizado con LTV libre.
- **PGAL-LTV-I:** es el PGAL de PM menor y al ser sintetizado por duplicado se denominan A y B (sintetizado con LTV inmovilizada).
- **PGAL-HRP:** debido a que la reacción se realizó por duplicado los compuestos son denominados A y B (sintetizado con HRP libre).

#### 3.1 Materiales

La LTV (enzima libre, Fluka, EUA) con una actividad específica (U) de 0.5 U/mg y HRP (enzima libre, Sigma Aldrich, EUA) con una actividad específica (U) de 250-330 U/mg. Las sustancias químicas utilizadas: ABTS, AG y DPPH fueron adquiridas de Sigma Aldrich (EUA). Etanol y acetona grado reactivo fueron adquiridas de Química Suastes S.A. de C.V. (México). Todos los otros compuestos químicos utilizados fueron analíticamente puros y fueron usados como fueron recibidos.

#### 3.2 Determinación de la actividad enzimática de la enzima LTV

La actividad enzimática fue medida agregando 0.05 mL de solución enzimática (1 mg/mL) a 2.9 mL de solución de ABTS (9.1 mM) disuelto en solución amortiguadora de fosfato de potasio (100 mM y pH 5), midiendo la variación de la absorbancia a 405 nm por 2 min ( $E_{405} = 36.8 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) utilizando un espectrofotómetro Genesys 10S Uv-vis (Thermoscientific, UEA). La U fue definida como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1.0  $\mu\text{mol}$  of ABTS por minuto a pH 5.0 (López, 2014).

Los resultados fueron tratados con las siguientes ecuaciones:

$$\frac{\text{Absorbancia}}{\text{Volumen de enzima}} = \frac{m}{\text{Volumen total del ensayo}} \times \text{Factor de dilución}$$

Dónde:

m=es la pendiente

VT= es el volumen total del ensayo

FD = es el factor de dilución

E = es el coeficiente de extinción milimolar a 405 nm

VE = Volumen de enzima

L = es la longitud de a celda (1 cm)

### 3.3 Determinación de la actividad enzimática de la enzima HRP

La actividad enzimática fue medida agregando 0.05 mL de solución enzimática (1 mg/mL) a 2.9 mL de solución de ABTS (9.1 mM) disuelto en solución amortiguadora de fosfato de potasio (100 mM y pH 5) y 0.05mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.3%), midiendo la variación de la absorbancia a 405 nm por 2 min ( $E_{405} = 36.8 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) en el espectrofotómetro. **La U fue definida como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1.0  $\mu\text{mol}$  of ABTS por minuto a pH 5.0** (López, 2014).

### 3.4 Síntesis enzimática de PGAL con LTV libre

Se agregaron 8.51 g de AG a una mezcla de 250 mL de solución amortiguadora de acetatos (250 mM a pH 5) y 20 mL de NaOH (2 M) en un matraz de bola de tres bocas color ámbar. Esta mezcla de reacción se acondicionó a  $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  con agitación constante (RCT basic safety control IKAMAG®, EUA) mientras se burbujeaba aire usando una bomba Elite 800 (Hagen Inc, Canada) hasta alcanzar una concentración inicial de oxígeno disuelto (OD) de  $6 \text{ mgmL}^{-1}$ , medida

con un sensor de oxígeno Aplisens conectado a un controlador ez-OD (Applikon, Holanda). Posteriormente, se agregaron 0.9481 g (256 U) de LTV y la mezcla de reacción se mantuvo a 25 °C durante 2 días; la mezcla de reacción se precipitó gota a gota en etanol frío (5 °C) bajo condiciones de agitación. Esta mezcla se dejó sedimentar a temperatura de 4°C; se filtró (0.45 μm) y se secó al vacío usando un horno (40 °C) acoplado a sistema de bomba de vacío Vacuubrand PC 3 RZ 2.5 (4 x 10<sup>-4</sup> mbar). El polvo de color negro brillante recuperado se pesó y se calculó el rendimiento con base en el porcentaje peso del material purificado entre el peso de sustrato inicial (López, 2014).

### **3.5 Inmovilización de TLV en Polivinilalcohol (PVA) y Polietilenglicol (PEG)**

Se mezclan 10 mL de PVA (PM=98-100 g/mol) 15% m/v y 10 mL de PEG (PM=950-1000 g/mol) 15% m/v, calentar a 90 °C hasta que la solución sea homogénea (RCT basic safety control IKAMAG®, EUA), enfriar hasta llegar a 40°C y adicionar 1 mL de NaOH 7M, evitando aglomeraciones, agitar durante 30 minutos, posteriormente ajustar pH a 5.5 con HCl 13M. Adicionar a la mezcla anterior 2 mL de solución de LTV 10% (disolver la lacasa en buffer de acetatos 100mM y pH= 5.5). Gotear solución en silicón a -20°C, filtrar las esferas y lavar con hexano y buffer de acetatos (1:2) tres veces (Trabajo realizado por Diego G. Garduño Troncoso para su tesis de Licenciatura).

### **3.6 Síntesis enzimática de PGAL con LTV inmovilizada**

Se agregaron 8.51 g de AG una mezcla de 250 mL de solución amortiguadora de acetatos (250 mM a pH 5) y 20 mL de NaOH (2 M) en un matraz de bola de tres bocas color ámbar. Esta mezcla de reacción se acondicionó a 25 ± 1 °C sin agitación (RCT basic safety control IKAMAG®, EUA) mientras se burbujeaba aire

usando una bomba Elite 800 (Hagen Inc, Canada) hasta alcanzar una concentración inicial de oxígeno disuelto (OD) de  $6 \text{ mgmL}^{-1}$ , medida con un sensor de oxígeno Aplisens conectado a un controlador ez-OD (Applikon, Holanda). Posteriormente, se agregaron 120% de perlitas (con respecto al peso del AG) de LTV inmovilizada y la mezcla de reacción se mantuvo a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 2 días; la mezcla de reacción se precipitó gota a gota en etanol frío ( $5 \text{ }^\circ\text{C}$ ) bajo condiciones de agitación. Esta mezcla se dejó sedimentar a temperatura de  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ; se filtró ( $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ ) y se secó al vacío usando un horno ( $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ) acoplado a sistema de bomba de vacío Vacuubrand PC 3 RZ 2.5 ( $4 \times 10^{-4} \text{ mbar}$ ). El polvo de color negro brillante recuperado se pesó y se calculó el rendimiento con base en el porcentaje peso del material purificado entre el peso de sustrato inicial (López, 2014).

### **3.7 Síntesis enzimática de PGAL con HRP**

Se agregaron 3.40 g de AG a una mezcla de 100 mL de solución amortiguadora de acetatos (250 mM a pH 5) y 8 mL de NaOH (2 M) en un matraz de bola color ámbar. Posteriormente, se agregaron 0.0102 g (3357.8 U) de HRP y la mezcla de reacción se mantuvo a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  mientras se adicionaba por goteo 1.67 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.5 v%) por intervalos cada 10 min por 2 horas, posteriormente se dejó en agitación constante durante una hora. La mezcla de reacción se precipitó gota a gota en etanol frío ( $5 \text{ }^\circ\text{C}$ ) bajo condiciones de agitación. Esta mezcla se dejó sedimentar a temperatura de  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ; se filtró ( $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ ) y se secó al vacío usando un horno ( $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ) acoplado a sistema de bomba de vacío Vacuubrand PC 3 RZ 2.5 ( $4 \times 10^{-4} \text{ mbar}$ ). El polvo de color café rojizo recuperado se pesó y se calculó el rendimiento con base en el porcentaje peso del material purificado entre el peso de sustrato inicial (López, 2014).



### 3.8 Determinación de Capacidad Antioxidante por EPR con DPPH

Se analizaron las muestras de PGAL y Trolox como control. Se utilizó una solución stock de 1 mg/mL de cada disolución; se hicieron disoluciones con diferentes concentraciones; posteriormente se tomaron 2 mL de la disolución de PGAL o Trolox, dependiendo el análisis, se mezclaron con 2 mL de una solución de DPPH 0.2 mM. Se sometieron a un Análisis de EPR el cual fue realizado en la USAI-FQ con un espectroscopio Bruker EPR modelo E-500 Elexsys Posteriormente los porcentajes se someterán a un análisis con un programa de probabilidad llamado Probit Estimation Section (Zavaleta, 2014).

### 3.9 Determinación del porcentaje de inhibición con DPPH

Se preparó una solución de DPPH 0.025 g/L en etanol y una solución de 1 mg/mL de las soluciones de PGAL. En una celda de plástico se colocaron 2.9 mL de DPPH 0.2 mM y 0.1 mL de la solución, se dio seguimiento a la reacción durante 20 minutos en un espectrofotómetro Genesys 10S Uv-vis Thermocientific (UEA) a una longitud de onda de 517 nm (Itzincab, 2012).

Para obtener el % de inhibición se utiliza la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{h_0 - h_c}{h_0} * 100$$

Dónde:

h<sub>0</sub> = Absorbancia del pico más alto del blanco del análisis del EPR

h<sub>c</sub> = Absorbancia del pico más alto de la muestra del análisis del EPR

### 3.10 Determinación de Capacidad Antioxidante por UV-visible con ABTS

Se preparó un radical de ABTS con persulfato de potasio 2.45mM (reposo 16 horas) (ver apéndice A); se tomaron 2 mL y se diluyeron en 200 mL de un buffer PBS y la absorbancia se midió en el espectrofotómetro, tomando como rango de absorbancia 0.7000+/-0.02; se preparó una curva patrón a partir de una solución de Trolox 1mg/mL preparando distintas soluciones, las cuales fueron disueltas en etanol; se adicionaron 100 µL de muestra y 1.9 mL de ABTS, se corrió un análisis por 7 minutos a una longitud de 734 nm. Para determinar los Equivalentes Trolox (ET) para PGAL se prepararon disoluciones de 0, 120, 240, 360, 480 y 600 ppm; tratadas como el Trolox (Trejo, 2011).

Los porcentajes de inhibición fueron calculados con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{blanco}}} * 100$$

### 3.11 Espectroscopia FT-IR

La espectroscopia FT-IR se realizó en la USAI-FQ en un espectrofotómetro ATR FT-IR Spectrum 400 (Perkin Elmer, EUA).

### 3.12 Resonancia Magnética Nuclear

RMN en líquido se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAII) de la Facultad de Química. Los espectros de RMN de protón (<sup>1</sup>H RMN) y carbono (<sup>13</sup>C RMN) se recolectaron en un espectrómetro modelo Unity Innova (Varian, EUA) (López, 2014).

### 3.13 Cromatografía de líquidos SEC

Se realizó una medición mediante SEC en un cromatógrafo Agilent 1210 series (EUA) equipado con automuestreador y detector de índice de refracción. Para el análisis de los productos se utilizó una columna Ultrahydrogel 500 (7.8 x 300 mm, Waters, EUA) y una solución 0.1 M de LiCl en agua ultrapura desionizada (Millipore infinity UV) como fase de elución (para evitar la formación de agregados) a un flujo de 0.8 mL/min y 30 °C. Estándares de polietilenglicol (Varian, UEA) fueron usados para la calibración; tanto los estándares como las muestras de producto fueron disueltas en la fase móvil (entre 1.5 y 2.5 mg mL<sup>-1</sup>) y filtradas (0.45 µm) antes de ser inyectadas al cromatógrafo (López, 2014).

## 4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Determinación de la actividad enzimática específica U/mg de la LTV libre, LTV inmovilizada y HRP libre

Al realizar el análisis de la U los resultados obtenidos están clasificados en la Tabla 2 (Apéndice C).

Tabla 2 Resultados de la U específica de LTV libre, LTV inmovilizada y HRP

	LTV libre	LTV inmovilizada	HRP
Actividad enzimática (Unidades/mg enzima)	0.27	0.02	328.80

Por lo que la enzima LTV que tiene reportado en su etiqueta una actividad de 0.5 U/mg, reportó una actividad de 0.27 U/mg, mientras que la HRP reporta en la etiqueta 250-330 U/mg y experimentalmente dio un resultado de 328.80 U/mg

### 4.2 Síntesis enzimática y caracterización de los PGAL obtenidos

De acuerdo a los datos reportados por López, 2014, quien nos dice que las reacciones tienden a formar radicales libres y de acuerdo al tipo de enzima se puede pensar que la reacción con HRP formará secuencias de propagación fenil-fenil o fenil-oxi, mientras que la reacción con LTV tiende a formar compuestos lineales de propagación únicamente fenil-fenil. Por lo que se cree que la figura 12 muestra el esquema de la reacción enzimática para la polimerización del AG utilizando la enzima HRP con la posible estructura del producto.

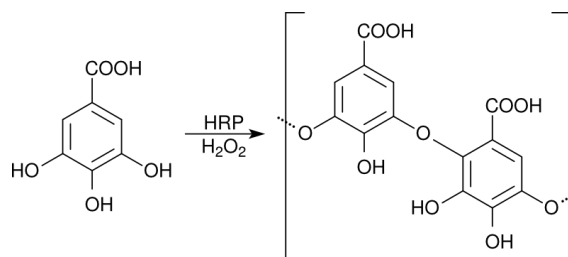


Figura 14 Reacción enzimática general para la polimerización AG con HRP

Se determinaron los rendimientos de cada una de la síntesis tomando como referencia el peso de AG inicial y el peso del producto purificado así como su caracterización del PM y polidispersidad (PDI) por SEC, como se observa en la Tabla 3.

Tabla 3 Rendimientos y distribución de PM de los productos sintetizados

<b>Muestra</b>	<b>Rendimiento (%)</b>	<b>PM (g/mol)</b>	<b>PDI</b>	<b>Solubilidad en agua (mg/mL)</b>
<b>PGAL-LTV-L</b>	95.74	7576	1.1783	500
<b>PGAL-LTV-I A</b>	8.23	4833	0.9998	50
<b>PGAL-LTV-I B</b>	3.88	4834	1	50
<b>PGAL-HRP A</b>	5.00	4838	0.9991	40
<b>PGAL-HRP B</b>	6.18	4839	1.0001	40

Tomando en cuenta la solubilidad del PGAL-LTV-L reportado con un valor de 500 mg/mL, el cual coincide al resultado experimental. Se observa una disminución en la solubilidad en los PGAL-LTV-I y PGAL-HRP, los cuales tienen una solubilidad de 50 mg/mL y 40 mg/mL respectivamente. Por lo que hubo una disminución de peso y también una disminución de solubilidad.

Se realizó un análisis de SEC en una fase acuosa de cloruro de litio el cual evita alguna agregación en la elución, lo cual fue medido contra estándares de polietilenglicol. Obteniendo resultados del peso molecular promedio en número y PDI de las muestras de polímero. Como se puede observar la PGAL-LTV-I da un valor más pequeño de PM lo cual puede deberse a diversos factores, tales como, una menor accesibilidad del sustrato por la enzima, menor actividad específica (U) o a la retención del producto dentro del soporte de la enzima. Por otro lado la U de la HRP es mayor a la de LTV sin embargo, se observa un menor rendimiento y peso molecular. Esto puede estar relacionado con el menor reconocimiento del

sustrato por parte de la peroxidasas, sin embargo no hay que descartar que el SEC está basada en la permeabilidad de las moléculas y se puede hipotetizar que la estructura molecular del PGAL obtenido con HRP puede ser lineal o con ramificaciones, por lo cual al tener ramificaciones hace que el volumen hidrodinámico sea menor y este producto permee más y por consiguiente se sobreestime el peso molecular contra los estándares lineales de polietilenglicol. Otro dato que puede dar fuerza a esta hipótesis podría ser la solubilidad, en una propagación fenil-fenil los grupos polares próticos como hidroxilo y carboxílico favorecen más la solvatación por la formación por puentes de hidrógeno. Sin embargo, la longitud de cadena puede ser un factor determinante en cuanto a la solubilidad del compuesto.

La enzima HRP no se inmovilizo debido, que apenas se está probando la reacción con lacasa libre e inmovilizada, para observar los rendimientos que estas puedan dar, ya que los rendimientos de la fracción soluble en agua de la reacción con HRP se observan que son muy bajos.

#### **4.2.1 Espectroscopia FT-IR**

En la Figura 15 se muestran los espectros de FT-IR del PGAL con lacasa, en los cuales se observaron bandas anchas (indicativos de polimerización); tanto la banda intensa y ancha de entre 3000 y 3400  $\text{cm}^{-1}$ , indicativo de la presencia de una gran proporción de grupos hidroxilos, como la ausencia de una banda entre 1230 y 1270  $\text{cm}^{-1}$  (característica de enlaces éter C-O-C aromáticos) son indicativos de una elongación polimérica vía enlaces fenil-fenil entre los carbonos 2 y 6 de la unidad de repetición. Mientras que en el caso del PGAL con HRP se encuentra la banda entre 1230 y 1270  $\text{cm}^{-1}$  la cual da indicios de un probable enlace fenil – oxi entre los carbonos 2 y 6 de acuerdo con López *et al.* (2014).

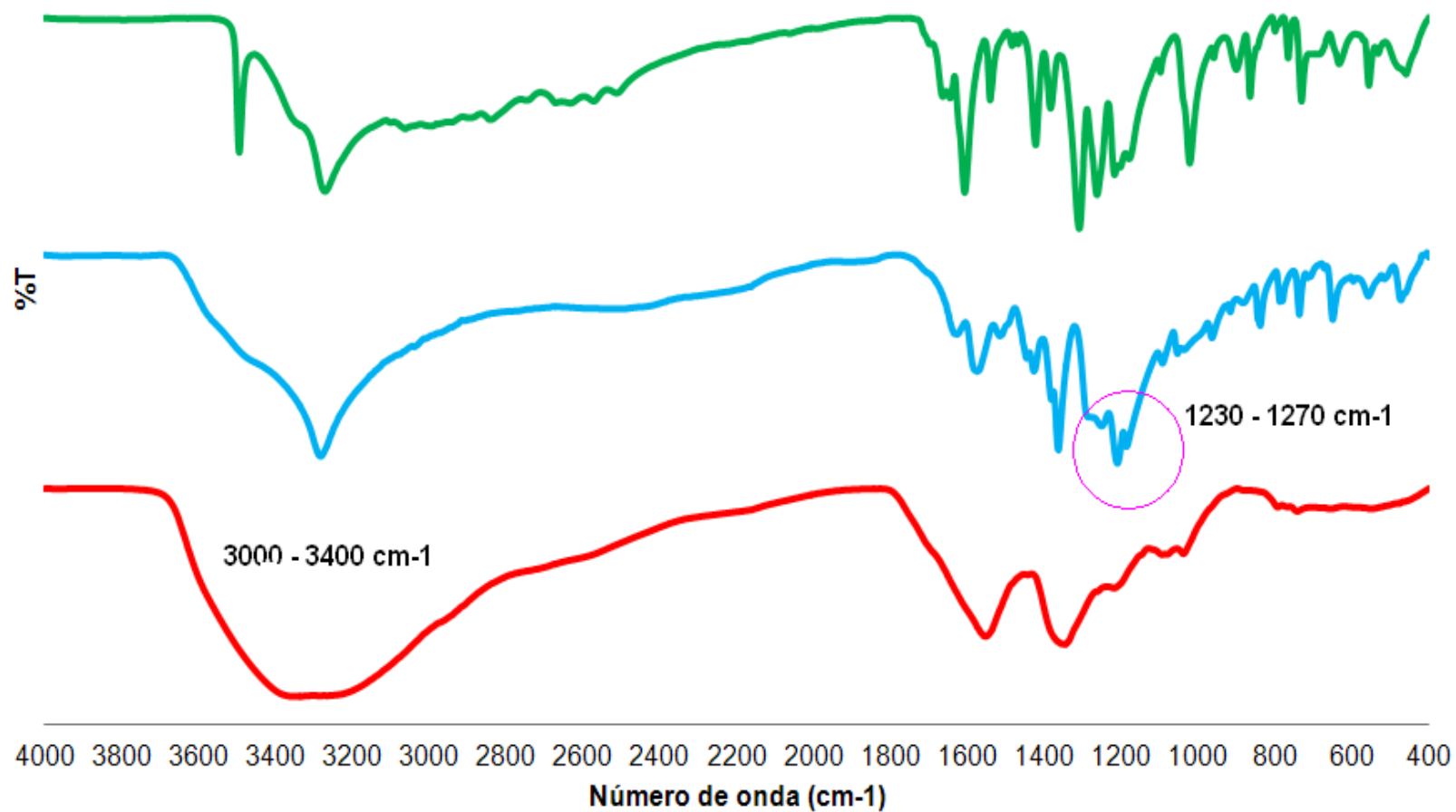


Figura 15 Espectro FT-IR del AG (verde), PGAL con HRP (azul) y PGAL con lacasa (rojo)

## 4.2.2 Resonancia Magnética Nuclear

De acuerdo con análisis antes hechos se encontró que, los espectros de  $^1\text{H}$  RMN de los PGAL con lacasa no mostraron señales en la región aromática, en contraste con la del AG (Figura 16 y 17). La desaparición de esta señal indicó que el crecimiento polimérico se dio vía enlaces fenil-fenil (López, 2014).

Mientras que en el PGAL con HRP al ampliar el espectro este muestra señales en la región aromática, al igual que el AG, por lo cual nuevamente se dan indicios de un enlace fenil-oxi, tal y como se discutió anteriormente con la SEC además que ayuda en plantear la idea de una estructura lineal o ramificada (Figura 18 y 19).

Corroborando que los espectros obtenidos experimentalmente (Figuras 16) corresponden al PGAL, lo cual se puede complementar con los espectros FT-IR.

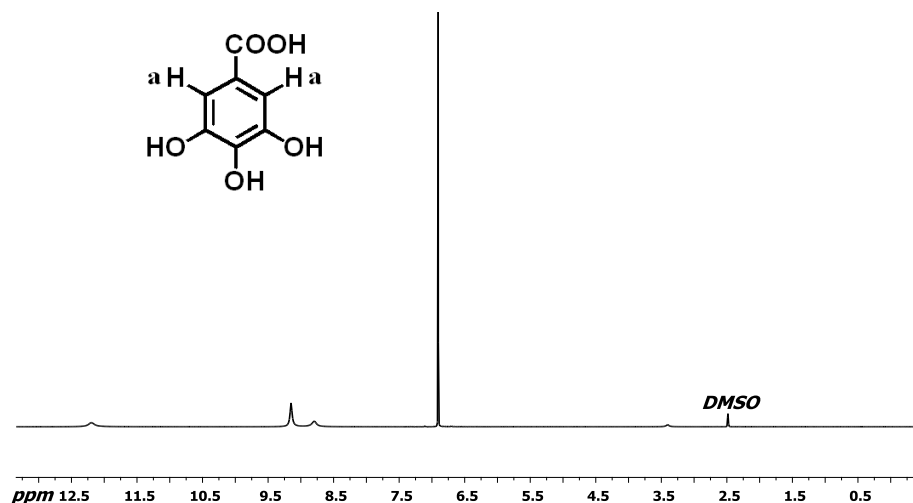


Figura 16 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de AG



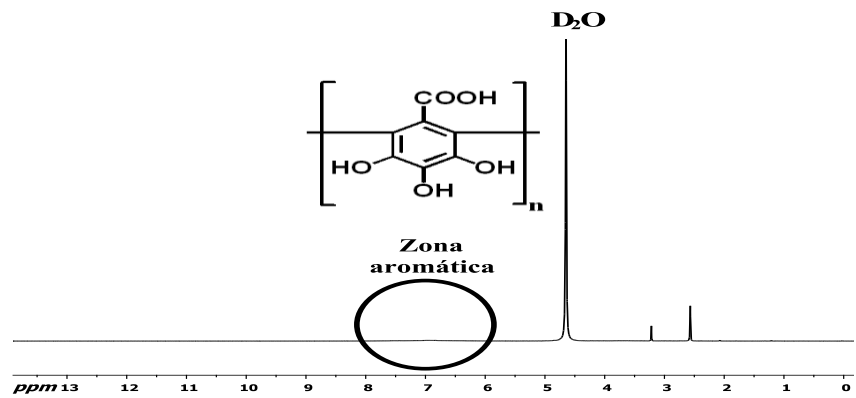


Figura 17 Espectro de 1H RMN de PGAL con lacasa.

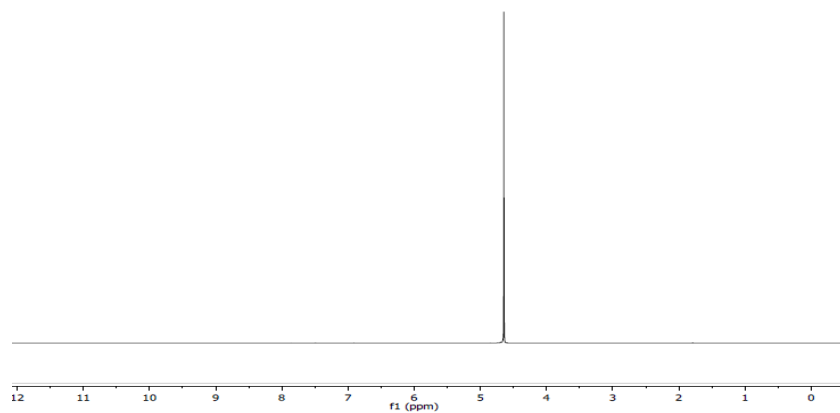


Figura 18 Espectro de 1H RMN de PGAL con HRP

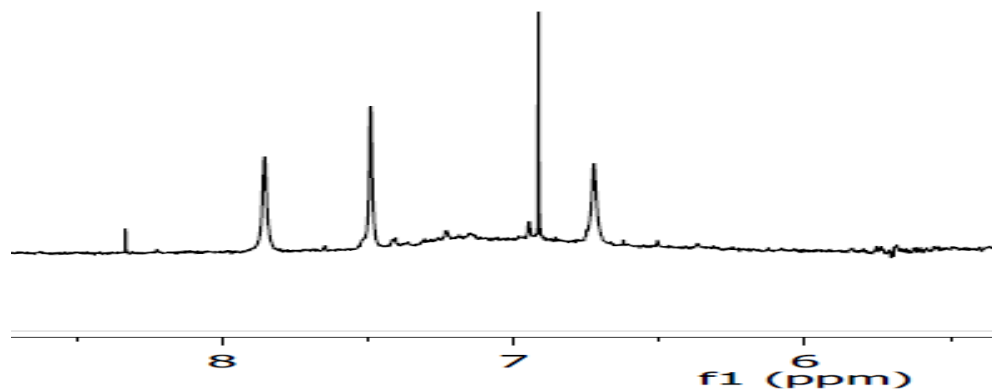


Figura 19 Ampliación de la región aromática del espectro de 1H RMN de PGAL sintetizado con HRP.

### 4.3 Determinación de % de inhibición con respecto al radical DPPH

Se sometieron las 5 muestras al análisis y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4 (ver apéndice C).

Tabla 4 Resultados de los % de inhibición con respecto al radical DPPH

	<b>Peso molecular (g/mol)</b>	<b>% inhibición</b>	<b>Promedio</b>
AG	170.12	95.39	94.51
		94.34	
		93.81	
PGAL-LTV-L	7576	52.97	53.47
		54.17	
		53.26	
TROLOX	250.29	96.60	96.51
		96.55	
		96.38	
PGAL-LTV-I A	4833	62.53	61.72
		60.97	
		61.66	
PGAL-LTV-I B	4834	62.06	61.91
		61.21	
		62.47	
PGAL-HRP A	4838	77.99	77.86
		73.76	
		81.82	
PGAL-HRP B	4839	69.97	72.93
		72.93	
		75.89	

En la Tabla 4 se muestra los resultados, en los cuales se observan que entre un menor PM detectado por SEC mayor inhibición presenta.

Pero a pesar de que los PM de los PGAL-LTV-I y PGAL-HRP son muy similares se observa que hay un mayor porcentaje de inhibición en los PGAL sintetizado con HRP esto puede deberse al tipo de enlace que tiene el polímero, ya que como antes se mencionó este puede estar ramificado mientras que el PGAL sintetizado con LTV tiene una estructura lineal.

#### **4.4 Determinación de Capacidad Antioxidante por UV-visible con ABTS**

Se realizó una curva patrón de Trolox (ya que es un antioxidante de referencia para comparar la capacidad antioxidante) por duplicado, por lo que se realizó un promedio, teniendo una ecuación de la recta la cual sirve para obtener los equivalentes Trolox (ET) (Ver apéndice D).

Tabla 5 Curva patrón de Trolox

<b>Concentración (ppm)</b>	<b>Absorbancia promedio</b>	<b>% Inhibición</b>
20	0.65	5.28
40	0.50	27.25
60	0.34	50.00
80	0.22	67.44
100	0.06	91.13

Al tener la curva patrón de la Tabla 5, se puede analizar el PGAL para encontrar una relación de la antioxidancia de este compuesto en Equivalentes Trolox, los resultados se muestran en la Tabla 6 (ver apéndice C):

Tabla 6 Equivalentes Trolox para PGAL

	<b>PM (g/mol)</b>	<b>Equivalencia promedio con TROLOX</b>
<b>PGAL-LTV-L</b>	7576	1.56 mg de PGAL equivale a 1 mg de Trolox.
<b>PGAL-LTV-I A</b>	4833	1.09 mg de PGAL equivale a 1 mg de Trolox.
<b>PGAL-LTV-I B</b>	4834	1.19 mg de PGAL equivale a 1 mg de Trolox.
<b>PGAL-HRP A</b>	4838	1.43 mg de PGAL equivale a 1 mg de Trolox
<b>PGAL- HRP B</b>	4839	1.84 mg de PGAL equivale a 1 mg de Trolox

En la Tabla 6 se observa que los Equivalentes Trolox tienen menor antioxidancia los PGAL-HRP A y el PGAL-HRP B, en comparación con los PGAL-LTV-I A Y B, que al compararse con el resultado anterior del porcentaje de inhibición, no son iguales. Esto puede deberse a diverso factores como:

1.- El sitio de acción de cada uno de los radicales, ya que las moléculas son diferentes y aunque los dos radicales tiene como sitio activo un grupo amino, las estructuras son distintas, ya que el ABTS es lineal y el DPPH tiene más impedimento estérico.

2.- La reacción es demasiado rápida por lo que puede haber un error experimental, debido a que para poder hacer la determinación se debía esperar a que el espectro diera la primer lectura para poder inyectar la muestra y continuar con el análisis de 7 minutos, por lo que podría ser que haya interferencia en las mediciones del espectro.

3.- Debido a las estructuras de las muestras ya que no se tiene control y se cree que el PGAL sintetizado con lacasa es de forma lineal mientras que el PGAL sinterizado con HRP puede llegar a tener ramificaciones, esto también puede explicar la diferencia de antioxidancia entre los PGAL-HRP A y el PGAL-HRP B, ya que tiene valores de 1.43 mg de PGAL equivale a 1 mg de Trolox y 1.84 mg de PGAL equivale a 1 mg de Trolox, respectivamente.

Al comparar las reacciones en cuestión de cinética la reacción del PGAL sintetizado con LTV tanto libre con inmovilizada es un poco más lenta que la reacción del PGAL sintetizado con HRP.

#### 4.5 Determinación de Capacidad Antioxidante por EPR con DPPH

Las muestras y el Trolox el cual es usado como referencia, se prepararon distintas concentraciones, para posteriormente determinar IC50 (la concentración a la que la mitad del sustrato ha reaccionado). En el gráfico 21 se observa la pérdida del color del DPPH en consecuencia la oxidación del radical, el cual pasa de un color morado a amarillo.

Posteriormente los cálculos de los resultados obtenidos se debe obtener el pico más alto para con este resultado poder calcular el % inhibición (el cual es calculado con la ecuación que a continuación se muestra), estos fueron analizados en un programa de Probit Estimation Section para determinar el IC50 (Capacidad antioxidante) de los compuestos y poderlos comparar entre sí. De acuerdo al programa los resultados obtenidos fueron los siguientes (ver apéndice C):

Tabla 7 Capacidad antioxidante IC50 con respecto al DPPH por EPR

<b>Muestra</b>	<b>Capacidad antioxidante (IC50) (ppm)</b>
Trolox	6.901388
AG	6.939218
PGAL-LTV-L	19.38471
PGAL-LTV-I A	5.226464
PGAL-LTV-I B	5.95497
PGAL-HRP A	6.787414
PGAL- HRP B	9.265738

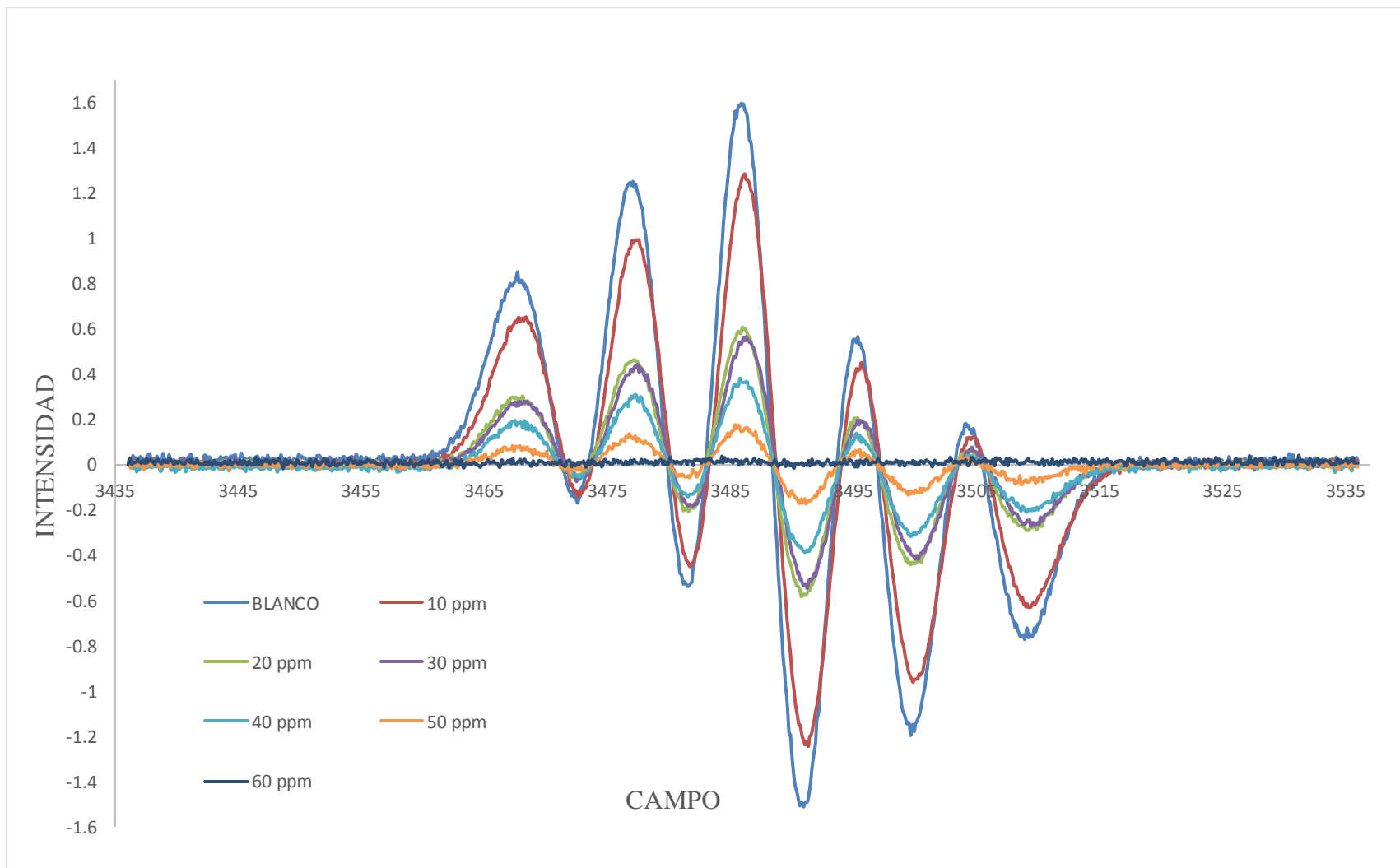


Figura 20 Reducción del radical DPPH para PGAL-LTV-L

Tomando en cuenta que los resultados están dados en ppm, encontramos que el PGAL-LTV-L, de mayor PM, requiere de 19.38 ppm para inhibir la mitad de la concentración mientras que los de menor PM requieren 5.59 ppm, esto puede ser debido a que hay más unidades disponibles de los fenoles terminales de la cadena, lo cual indicaría que estos son los que mayormente poseen actividad antiradicalaria, aunque al compararse con el AG y el Trolox se logra notar que el resultado es menor.

En el caso de los PGAL sintetizados con HRP son diferentes, por lo cual se podría volver a retomar la estructura tipo parcialmente ramificada, lo que implicaría el posible aumento de la capacidad antioxidante. En la Figure 21 se muestran los espectros de EPR de la reducción de DPPH para la PGAL-LTV-L, aunque se puede aplicar en el caso de todos los estudios que se utilice el radical DPPH en la técnica de EPR, modificando en su defecto las concentraciones que se utilicen.

#### **4.6 Compilación de resultados**

De acuerdo con la Tabla 8, podemos observar que el peso molecular si tiene influencia en la capacidad antioxidante de nuestro compuesto, así mismo tiene influencia en la solubilidad de las muestras.

De acuerdo a la técnica con DPPH (tanto EPR como % de inhibición) encontramos que el PGAL-HRP A es el que tiene la mejor capacidad antioxidante, además de que tiene una actividad similar al monómero, por lo que se podría decir que el AG al ser polimerizado mejora su capacidad antioxidante.

Tabla 8 Comparación de resultados

	PM (g/mol)	Solubilidad en agua (mg/mL)	% inhibición con DPPH	ET (mg)	IC50
Trolox	250.29	---	94.51	---	6.901388
Acido gálico	170.12	---	96.51	---	6.939218
PGAL- LTV-L	7576	500	53.47	1.56 mg de PGAL equivale a 1 mg de Trolox.	19.38471
PGAL- LTV-I A	4833	50	61.72	1.09 mg de PGAL equivale a 1 mg de Trolox.	5.226464
PGAL- LTV-I B	4834	50	61.91	1.19 mg de PGAL equivale a 1 mg de Trolox.	5.95497
PGAL- HRP A	4838	40	77.86	1.43 mg de PGAL equivale a 1 mg de Trolox	6.787414
PGAL- HRP B	4839	40	72.93	1.84 mg de PGAL equivale a 1 mg de Trolox	9.265738



## 5.- CONCLUSIONES

- El PGAL sintetizado con LTV tiene un enlace fenil-fenil, mientras que el PGAL con HRP posee enlaces fenil-oxi además de fenil-fenil.
- El PGAL con un PM menor tiende a ser más antioxidante que el PGAL de mayor PM
- El porcentaje de inhibición será mayor en un PGAL de PM menor, teniendo mayor efectividad el PGAL sintetizado con HRP
- Al disminuir el PM del PGAL, disminuye la solubilidad pero aumenta la capacidad antioxidante.
- EL PGAL-LTV-L y el PGAL-HRP tiene mayor capacidad antioxidante que el PGAL-LTV-I.

## 6.- Trabajo futuro

- Buscar mejorar el rendimiento, ya que la reacción de HRP es más rápida en comparación con la reacción de lacasa, al igual que probar la inmovilización de esta enzima.
- Buscar una manera de poder caracterizar molécula de manera más inequívoca sobretodo en referencia al PGAL sintetizado con HRP.
- Realizar más pruebas para tener una idea más acertada en la estructura de nuestro polímero, como análisis de RMN de con Carbono.

## 7.- BIBLIOGRAFÍA

- Cartaya, O. y Reynaldo, I., 2001, Flavonoides: Características químicas y aplicaciones, Cultivos tropicales, Vol. 22 (2), 5-14.
- Delgado, L., Betanzos, G., Sumaya, M., 2010, Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo, Investigación y Ciencia, Vol. 50, 10-15.
- Gutierrez, P., 2011, Estudio de la polimerización de fenoles utilizando peroxidasa presentes en rábano común (*Raphanus sativus* var *sativus*), con aplicación en la biorremediación de aguas residuales de una empresa textilera, Tesis de licenciatura, Departamento de Ciencias de la vida, Escuela politécnica del ejército.
- Huang D., Ou B., Prior R., 2005, The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays, Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 53, 1841–1856.
- Iglesias, J., 2009, Diseño de ingredientes antioxidantes de origen natural y su aplicación en la estabilización de productos derivados de la pesca, Tesis de Doctorado, Departamento de Química analítica, nutrición y Bromatología, Universidad de Santiago de Compostella (USC).
- Ikeya, M., 1993, New Applications Of Electron Spin Resonance: Dating, Dosimetry and Microscopy, World Scientific Publishing Company, Capítulo 2.
- Itzincab, L., 2012, Caracterización de las propiedades antimicrobianas y antioxidantes de quitosanos funcionalizados enzimáticamente con galato de octilo, Tesis de Maestría, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM.
- Kim, Y., 2007, Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid, Biological and Pharmaceutical Bulletin, Vol. 30, 1052–1055.
- Kobayashi, S., y Higashimura, H., 2003, Oxidative polymerization of phenols revisited, Progress in Polymer Science, Vol. 28, 1015-1048.
- Kvist, L. y Pedersen J., 1986, Distribution and taxonomic implications of some phenolics in the family Gesneriaceae determined by EPR

spectroscopy. *Biochemical Systematics and Ecology Journal*, Vol. 14, 385-405.

- López, J., 2014, Síntesis enzimática de materiales polifenólicos semiconductores, Tesis de Doctorado, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM.
- López, J., Hernández-Alcántara, J., Roquero P., Montiel, C., Shirai, K., Gimeno, M., y Bárzana, E., 2013, *Trametes versicolor* laccase oxidation of gallic acid toward a polyconjugated semiconducting material, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol. 97, 100-105.
- Mercado, G., Carrillo, L., Wall-Medrano, A., López, J., y Alvarez, E., 2013, Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México, *Nutrición Hospitalaria*, Vol. 28 (2), 36-46.
- Moya, R., 2011, Caracterización de la lacasa de *Streptomyces cyaneus* cect 3335 y aproximación al estudio de su potencial oxidativo y función biológica, Tesis de Doctorado, Departamento de microbiología y parasitología, Universidad de Alcalá.
- Padilla, F., Rincon, A. y Bou-Rached, L., 2008, Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces, *Archivos Latinoamericanos de nutrición*, Vol. 58 (3), 1-3.
- Quiñones, M., Miguel, M., y Aleixandre, A., 2012, Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular, *Nutrición Hospitalaria*, Vol. 27 (1), 76-89.
- Román, R., Torres-Duarte, C., Ayala, M. Y Vázquez-Duhalt, R., 2010, Producción a escala piloto de lacasa de *Coriopsis gallica*, *Revista Mexicana de Micología*, Vol. 32, 19-27
- Sakharov, I., Bautista, G., Sakharova, I., Rojas A. y Pletjuschkina O., 1999, Peroxidasas tropicales, *Revista colombiana de química*, Vol. 28 (1), 97-106.
- Sharma, S., Wyatt, G., y Steele, V., 1997, A carcinogen DNA binding assay as a biomarker screen for identifying potential chemo-preventive agents, *Methods in Cell Science*, Vol. 19, 4548.

- Taitzoglou, I., Tsantarliotou, M., Zervos, I., Kouretas, D., y Kokolis, N., 2001, Inhibition of human and ovine acrosomal enzymes by tannic acid in vitro, *Reproduction*, Vol. 10, 121-131.
- Tovar del Río, J., 2013, Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregión cafetera, Tesis de Licenciatura. Facultad de Tecnología, Universidad Tecnológica de Pereira.
- Trejo, A. y Pascual, S., 2011, Evaluación de capacidad antioxidante y determinación de fenoles totales para frutos, Manual del taller multidisciplinario de procesos tecnológicos de frutos y hortalizas, FES. Cuautitlán, 1-16.
- Venereo, G., 2002, Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes, *Revista Cubana Medicine Military*, Vol. 31 (2), 126-33.
- Weil, J., Bolton, J y Wertz, J., 1994, *Electron Paramagnetic Resonance. Elementary Theory and Practical Applications*, John Wiley and Sons, Inc. New York, Vol. 7, 6-7.
- Xu, P., Singh, y A., Kaplan, D., 2006, Enzymatic catalysis in the synthesis of polyanilines and derivatives of polyanilines, *Advances in Polymer Science*, Vol. 8, 194, 69-94.
- Zavaleta, L., 2014, Desarrollo y caracterización de recubrimientos comestibles con base en quitosano funcionalizado enzimáticamente, Tesis de Doctorado, División de Ciencia Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), Unidad Iztapalapa.

## 8.- APÉNDICES

### ➤ Apéndice A

- A.1 Buffer PBS

Pesar 4 g de NaCl, 0.10 g de KCl, 0.72 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0.12 de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Disolver en 400 mL de agua, Ajustar el pH a 7.4 con HCl o NaOH, según sea necesario. Aforar a 500 mL con agua des ionizada.

- A.2 Buffer Acetato 1.25 M a pH 5 250 mL

Mezclar 5.52 mL de ácido acético y 12.56 g de acetato de sodio, disolver y llevar al aforo la solución con agua desionizada. Posteriormente ajustar pH a 5. Para poder utilizar el buffer se toman 50 mL y se lleva a un volumen final de 250 mL con agua desionizada para obtener una concentración de 250 mM.

- A.3 ABTS 7 mM con persulfato de potasio 2.45 m M 5 mL

Pesar por separado 0.0194 g de ABTS (2,2' azino-bis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico) y 0.0033 g de persulfato de potasio, aforar a 5 mL e incubar a temperatura ambiente en la oscuridad por 16 horas.

**Nota:** El radical ABTS es estable durante 3 días.

- A.4 Buffer de fosfatos 100 mM a pH 5 1000 mL

Pesar 1.38 g de Fosfato monobásico de potasio y llevar al aforo de 100 mL. (ajustar pH con KOH 1M)

## ➤ Apéndice B

### • B.1 El método de ABTS (Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

La técnica mejorada para la generación del radical catión  $ABTS^{\bullet+}$ , implica la producción directa del cromóforo  $ABTS^{\bullet+}$  verde-azul a través de la reacción entre ABTS y el persulfato de potasio ( $K_2S_2O_8$ ). Este presenta tres máximos de absorción a las longitudes de onda de 645 nm, 734 nm y 815 nm. La adición de los antioxidantes al radical pre-formado lo reduce a ABTS. De esta manera el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del radical catión  $ABTS^{\bullet+}$  está determinado en función de la concentración y el tiempo; así como del valor correspondiente usando Trolox como estándar, bajo las mismas condiciones (Tovar del Rio, 2013).

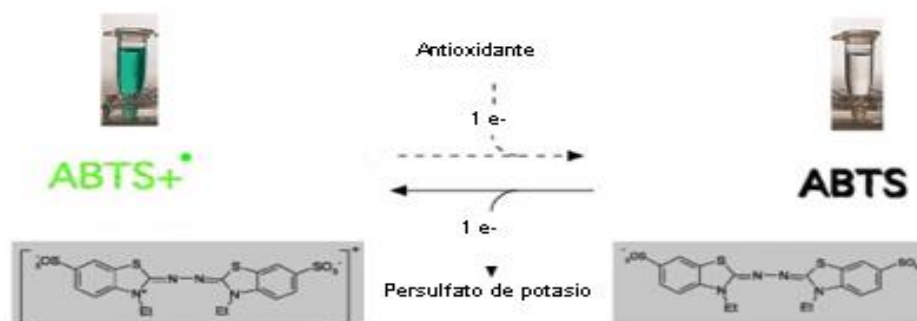


Figura B.1 Reacción de reducción del ABTS

### • B.2 Método del radical DPPH

El método del DPPH se basa en la reducción del radical  $DPPH^{\bullet}$  por los antioxidantes de la muestra. El radical es estable y tiene una coloración púrpura que se pierde progresivamente cuando se añade la muestra conteniendo sustancias antioxidantes. La decoloración del radical se determina a una  $\lambda$  de 515 nm hasta alcanzar el equilibrio. Entre las ventajas de usar este método, se tiene que el ensayo DPPH es un método rápido y sencillo y que no requiere de un

equipamiento sofisticado. La desventaja que tiene este método es que sólo puede disolverse en medio orgánico y en algunos casos la interpretación resulta complicada, ya que algunos antioxidantes pueden causar interferencias si poseen un espectro de absorción similar al DPPH (Weil, 1994).



Figura B.2 Reacción de reducción del DPPH

(Itzincab, 2013)

El procedimiento original para el ensayo DPPH<sup>•</sup> ha sido adoptado por muchos laboratorios y a pesar de que existen modificaciones a conveniencia, una revisión detallada de la literatura ha revelado que la mayoría de los estudios están basados en un tiempo de reacción de 20-30 min en vez de un tiempo de reacción total de 120 minutos requerido para alcanzar el estado estacionario y completar la reacción redox (Ikeya, 1993).

➤ **Apéndice C**

Tabla C.1 Datos de la U específica de LTV libre, LTV inmovilizada y HRP

Parámetro	Blanco	LTV	Blanco	LTV	Blanco	HRP
			inmovilizada			
<b>ΔAbs/mintest (promedio)</b>	0.0375	0.202	0.001	0.1075	0.0344	0.4375
<b>Volumen total de ensayo (mL) [VT]</b>	3.05		2.9		3.01	
<b>Factor de dilución (FD)</b>	10		1		100	
<b>Vol. de enzima (mL)</b>	0.05		6%		0.01	

Tabla C.2 Datos de absorbancia de los % de inhibición con respecto al radical DPPH

	A inicial			A final		
<b>AG</b>	1.823	1.855	1.889	0.084	0.105	0.117
<b>PGAL-LTV-L</b>	2.022	2.025	2.025	0.951	0.928	0.946
<b>TROLOX</b>	1.909	1.882	1.825	0.065	0.065	0.066
<b>PGAL-LTV-I A</b>	1.863	1.801	1.823	0.698	0.703	0.699
<b>PGAL-LTV-I B</b>	1.803	1.797	1.833	0.684	0.697	0.688
<b>PGAL-HRP A</b>	1.804	1.696	1.733	0.397	0.445	0.315
<b>PGAL-HRP B</b>	1.695	1.810	1.721	0.509	0.490	0.415



Tabla C.3 Equivalentes Trolox para PGAL

	PM (g/mol)	ppm	% inhibición	ET	mg PGAL/mg Trolox
<b>PGAL-LTV-L</b>	7576	-	-	-	-
		15	15.73	14.85	1.96
		30	21.49	20.28	1.16
		45	26.54	25.05	0.88
		60	32.94	31.09	0.76
<b>PGAL-LTV-I A</b>	4833	-	-	-	-
		10	11.32	10.68	1.07
		20	22.18	20.94	1.05
		30	34.28	32.36	1.08
		40	49.40	46.63	1.17
<b>PGAL-LTV-I B</b>	4834	-	-	-	-
		10	12.14	11.46	1.15
		20	24.66	23.27	1.16
		30	38.20	36.05	1.20
		40	52.43	49.48	1.24
<b>PGAL-HRP A</b>	4838	-	-	-	-
		10	13.34	12.59	1.26
		20	31.19	29.44	1.47
		30	46.20	43.60	1.45
		40	65.08	61.42	1.54
<b>PGAL-HRP B</b>	4839	-	-	-	-
		10	23.49	22.17	2.22
		20	36.27	34.24	1.71
		30	54.35	51.30	1.71
		40	72.64	68.56	1.71

Tabla C.4 Cálculo del % capacidad antioxidante de Trolox

Concentración (ppm)	% Capacidad Antioxidante de PGAL	Análisis con el programa de Probit Estimation Section		
		Parámetro	Estimado	Error est.
0	0			
5	39.51			
10	58.33	IC50	6.901388	0.4420331
15	82.72			
20	97.81			
25	97.53			

Tabla C.5 Cálculo del % capacidad antioxidante de AG

Concentración (ppm)	% Capacidad Antioxidante de PGAL	Análisis con el programa de Probit Estimation Section		
		Parámetro	Estimado	Error est.
0	0			
5	5.08	IC50	6.939218	0.2175231
10	98.80			
15	98.80			

Tabla C.6 Cálculo del % capacidad antioxidante de PGAL-LTV-I A

Concentración (ppm)	% Capacidad Antioxidante de PGAL	Análisis con el programa de Probit Estimation Section		
		Parámetro	Estimado	Std. Error
0	-			
5	37.38	IC50	5.226464	0.4081973
10	75.06			
15	97.69			

**20**

98.33

Tabla C.6 Cálculo del % capacidad antioxidante de PGAL-LTV-L

**Concentración (ppm)    %Capacidad Antioxidante de PGAL    Análisis con el programa de Probit Estimation Section**

<b>0</b>	-			
<b>10</b>	18.53			
<b>20</b>	41.68	Parámetro	Estimado	Error est.
<b>30</b>	74.74	IC50	19.38471	0.9221836
<b>40</b>	92.63			
<b>50</b>	95.16			
<b>100</b>	97.05			

Tabla C.8 Cálculo del % capacidad antioxidante de PGAL-LTV-I B

<b>Concentración (ppm)</b>	<b>%Capacidad Antioxidante de PGAL</b>	<b>Análisis con el programa de Probit Estimation Section</b>		
0	-			
5	38.97	Parámetro	Estimado	Std. Error
10	79.93	IC50	5.95497	0.3536789
20	98.63			

Tabla C.9 Cálculo del % capacidad antioxidante de PGAL-HRP A

Concentración (ppm)	% Capacidad Antioxidante de PGAL	Análisis con el programa de Probit Estimation Section								
0	0	<table border="0"> <tr> <td>Parámetro</td> <td>Estimado</td> <td>Error est.</td> </tr> <tr> <td>IC50</td> <td>6.787414</td> <td>0.3625112</td> </tr> </table>			Parámetro	Estimado	Error est.	IC50	6.787414	0.3625112
Parámetro	Estimado				Error est.					
IC50	6.787414				0.3625112					
5	31.05									
10	68.62									
15	94.86									
20	98.67									
50	99.17									

Tabla C.10 Cálculo del % capacidad antioxidante de PGAL-HRP B

Concentración (ppm)	% Capacidad Antioxidante de PGAL	Análisis con el programa de Probit Estimation Section								
0	0	<table border="0"> <tr> <td>Parámetro</td> <td>Estimado</td> <td>Error est.</td> </tr> <tr> <td>IC50</td> <td>9.265738</td> <td>0.4943288</td> </tr> </table>			Parámetro	Estimado	Error est.	IC50	9.265738	0.4943288
Parámetro	Estimado				Error est.					
IC50	9.265738				0.4943288					
5	22.61									
10	48.41									
15	74.52									
20	87.74									
50	98.88									

➤ APÉNDICE D

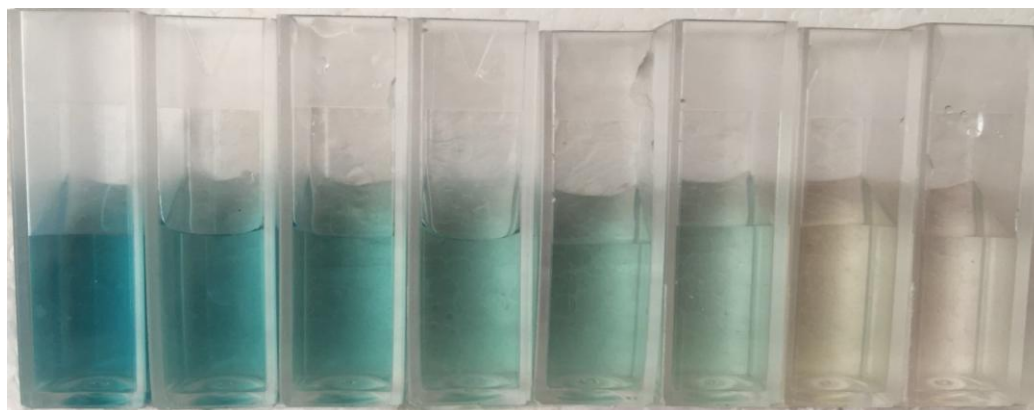


Figura D.1 Visualización de la curva patrón de ABTS

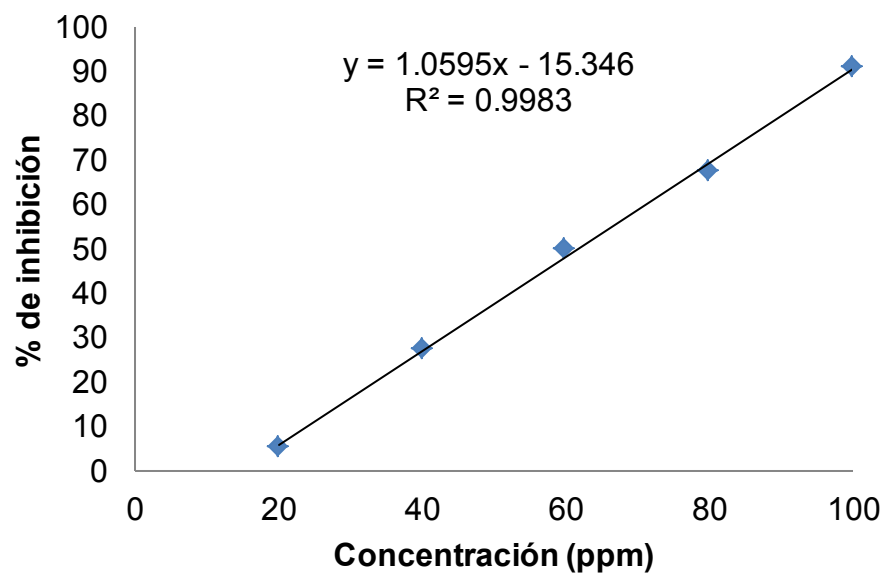


Figura D.2 Gráfico de la curva patrón de Trolox

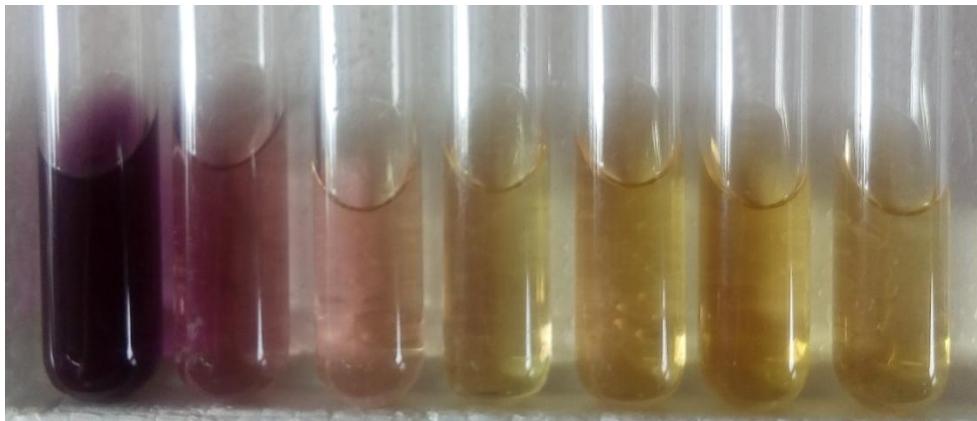


Figura D.3 Visualización de la reducción radical del DPPH