



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**OBTENCIÓN DE DERIVADOS FENÓLICOS MEDIANTE REACCIONES
DE ACOPLAMIENTO OXIDATIVO PROMOVIDO POR PEROXIDASAS
DE DIFERENTES FUENTES VEGETALES.**

TESIS

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

PRESENTA

LAURA MORALES TOLEDO



MÉXICO, D.F.

2013



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:

Presidente: Profesor: Raúl Genaro Aguilar Caballero

Vocal: Profesor: Arturo Navarro Ocaña

Secretario: Profesor: José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio

1er. suplente: Profesor: Ana Adela Sánchez Mendoza

2° suplente: Profesor: Jorge Arturo Aburto Anell

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**Laboratorio 321, Edificio E, Departamento de Alimentos y Biotecnología,
Facultad de Química, UNAM.**

Dr. Arturo Navarro Ocaña

Asesor del tema

Laura Morales Toledo

Sustentante

I) Contenido

II) Índice de figuras.....	4
1. Resumen	6
2. Introducción	7
3. Antecedentes.....	8
3.1 Aprovechamiento de residuos agroindustriales.	8
3.2 Enzimas en síntesis orgánica.....	8
3.3 Peroxidasas	10
3.3.1 Clasificación de las peroxidasas	10
3.3.2 Estructura general.....	11
3.3.3 Mecanismo catalítico de la peroxidasa de rábano (HRP)	13
3.3.4 Transformaciones mediadas por peroxidasas	15
3.3.5 Funcionalidad de las peroxidasas en plantas	19
3.3.6 Fuentes de peroxidasas en vegetales.	22
3.3.7 Aplicaciones de las peroxidasas.....	25
3.4 Fenoles	27
3.5 Acoplamiento oxidativo de fenoles iniciado por peroxidasas	28
4. Justificación	35
5. Hipótesis.....	35
6. Objetivos.....	36
6.1 Objetivo general	36
6.2 Objetivos particulares.....	36
7. Materiales y métodos.....	37
7.1 Diagrama general.....	37
7.2 Reactivos y equipos	37

7.3 Etapa 1.Pruebas preliminares	38
7.3.1 Obtención del biocatalizador.....	38
7.3.2 Determinación cualitativa de actividad de peroxidasa	38
7.4 Etapa 2. Ensayo de detección de sustratos	38
7.4.1 Ensayo con ácidos hidroxicinámicos y sus esteres.	39
7.4.2 Ensayo con vainillina.	39
7.5 Etapa 3. Medición de la actividad enzimática	39
7.5.1 Determinación de la actividad de peroxidasa	40
7.5.1.1 Ensayo de medición enzimática para peroxidasa de brócoli, caña de maíz y cebollín.....	40
7.5.1.2 Ensayo de medición enzimática para la peroxidasa de nopal.	40
7.5.2 Determinación de proteína.....	40
7.5.3 Determinación cuantitativa de la actividad de peroxidasa.	41
7.6 Etapa 4. Biotransformación de sustratos	41
7.6.1 Comportamiento frente a distintas concentraciones de H ₂ O ₂	42
7.6.2 Reacción de acoplamiento oxidativo 1.....	42
7.6.2.1 Purificación del crudo de la reacción de acoplamiento oxidativo 1..	43
7.6.3 Reacción de acoplamiento oxidativo 2.....	43
7.6.3.1 Purificación del crudo de la reacción de acoplamiento oxidativo 2..	44
7.6.4 Caracterización de los compuestos purificados de las reacciones de acoplamiento oxidativo 1 y 2.....	44
8. Resultados y discusión.....	45
8.1 Etapa 1.Pruebas preliminares.	45
8.1.1 Obtención del catalizador.	45
8.1.2 Determinación cualitativa de actividad de peroxidasa.	46
8.2 Etapa 2. Ensayo de detección de sustratos.	48

8.2.1 Ensayo con ácidos hidroxicinámicos y sus esteres.	48
8.2.2 Ensayo con vainillina.	54
8.3 Medición de la actividad enzimática.	55
8.4 Etapa 4. Biotransformación de sustratos.	62
8.4.1 Comportamiento frente a distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno.	63
8.4.2 Reacciones de acoplamiento oxidativo.	64
8.4.3 Caracterización de los productos purificados de las reacciones de acoplamiento oxidativo.	68
9. Conclusiones.	76
10. Bibliografía.	77
11. Anexos.	84

II) Índice de figuras

Figura 1. Reacción general para la enzima peroxidasa	10
Figura 2. Estructura general de la peroxidasa.....	12
Figura 3. Mecanismo catalítico de la peroxidasa con ácido ferúlico.....	13
Figura 4. Esquema de posibles rutas de inactivación de la peroxidasa de rábano	15
Figura 5. Productos obtenidos de la reacción mediada por peroxidases a partir de metil sinapato y ferulato	16
Figura 6. Reacciones de halogenación mediadas por peroxidases	17
Figura 7. Estructura de pared celular	20
Figura 8. Cicatriz en tallo	21
Figura 9. Fuentes vegetales de peroxidases.....	23
Figura 10. Productos derivados del acoplamiento oxidativo vía radicales libres del ácido ferúlico	29
Figura 11. Estructuras sintetizadas a partir de ácido ferúlico por peroxidases.....	31
Figura 12. Síntesis de la divainillina.	32
Figura 13. Diagrama general de etapas en las que se divide la metodología.	37
Figura 14. Estructuras de los compuestos utilizados en la preselección de sustratos.....	50
Figura 15. Resultado de las biotransformaciones con peroxidasa de brócoli.....	51
Figura 16. Resultado de las biotransformaciones con peroxidasa de caña de maíz.	51
Figura 17. Resultado de las biotransformaciones con peroxidasa de nopal.	52
Figura 18. Resultado de las biotransformaciones con peroxidasa de cebollín.	52
Figura 19. Estructura química de la vainillina.	54
Figura 20. Esquema del mecanismo ping-pong de la peroxidasa.....	56
Figura 21. Biotransformación con ácido ferúlico a diferentes concentraciones de H ₂ O ₂	63

Figura 22. Biotransformación con vainillina a diferentes concentraciones de H ₂ O ₂	64
Figura 23. Biotransformaciones con ácido ferúlico	65
Figura 24. Biotransformaciones con vainillina	67
Figura 25. Espectro RMN ácido 8-8' diferúlico	70
Figura 26. Espectro RMN de purificación del ácido ferúlico	71
Figura 27. Estructura del ácido 8-8' diferúlico.	72
Figura 28. Espectro RMN de divainillina.	73
Figura 29. Espectro RMN de purificación de vainillina	74
Figura 30. Estructura de la divainillina.....	75

1. Resumen

Las peroxidasas (EC 1.11.1.7) son enzimas oxidorreductasas que catalizan la reducción de peróxidos y la oxidación de compuestos orgánicos e inorgánicos donadores de electrones generando radicales libres. Estos radicales pueden reaccionar entre sí mediante reacciones de acoplamiento oxidativo generando dímeros, oligómeros o polímeros del compuesto inicial. La importancia de estas enzimas radica en su amplia distribución en las plantas, cumpliendo con funciones como lignificación de la pared celular o defensa contra infecciones. En la industria se emplea en inmunoensayos enzimáticos y purificación de aguas contaminadas. Una de las fuentes más populares de peroxidasas es la obtenida a partir de rábano, clasificada en la familia III subclase III (peroxidasas provenientes de plantas secretadas fuera de la célula o transportadas en vacuolas).

En este trabajo el objetivo fue evaluar fuentes alternativas de peroxidasas en diferentes vegetales para su uso en la reacción de acoplamiento oxidativo de compuestos fenólicos. Esto se llevó a cabo con la obtención de los extractos enzimáticos y su evaluación cualitativa de actividad de peroxidasa, resultando como fuentes más apropiadas el brócoli, el cebollín y la caña de maíz. Igualmente se realizó una selección entre varios sustratos evaluando la afinidad de las peroxidasas para promover las reacciones de acoplamiento oxidativo (vía radicales libres).

Se realizó la determinación de actividad enzimática en los extractos seleccionados para establecer cuál de los extractos presenta una mayor actividad, además de su comportamiento frente a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno.

Para los sustratos elegidos (vainillina y ácido ferúlico) se realizaron dos diferentes metodologías para la obtención de los compuestos de síntesis y también se evaluó el resultado de los productos de síntesis frente a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno. La obtención del producto crudo se realizó mediante el escalamiento de las metodologías el cual se purificó y se le realizó el análisis para la determinación de la naturaleza de los productos.

2. Introducción

La búsqueda de procesos sintéticos alternativos a los ya existentes se ha hecho cada vez más importante en los últimos años. Es por esta razón que la biocatálisis (el uso de enzimas como catalizadores) ha ido ganando importancia por las ventajas que representa frente a los catalizadores químicos: ser preferentemente usadas para reacciones con sustratos biológicos, las condiciones de uso no son tan extremas pues la mayoría acepta pH neutro y condiciones atmosféricas, pero de las ventajas más convenientes es que las enzimas presentan niveles de enantio, regio y estereoselectividad mayores a los que frecuentemente se obtienen por síntesis química.

Por otro lado, la industria agroalimentaria también ha crecido generando residuos, a los cuales, muchas veces no se les da un tratamiento adecuado; es por eso que se ha buscado darles un uso alternativo principalmente como material de compostaje, compuestos bioactivos o para la obtención de enzimas.

Las oxidorreductasas son ampliamente estudiadas por su gran variedad de aplicaciones, dentro de este grupo se encuentran las peroxidasas. Las peroxidasas (EC 1.11.1.7) están ampliamente distribuidas encontrándose en plantas, animales y microorganismos, siendo objeto de estudio desde hace muchas décadas y teniendo a la peroxidasa de rábano como una de las más populares. Aunque en la actualidad se empieza a explorar nuevas fuentes de peroxidasas.

Una de las reacciones que catalizan las peroxidasas son las reacciones de acoplamiento oxidativo, estas se llevan a cabo haciendo reaccionar la peroxidasa con algún sustrato donador de electrones en presencia de peróxidos dando como resultado la obtención de radicales libres los cuales darán paso a la formación de dímeros, oligómeros o polímeros. En este trabajo se busca observar el comportamiento de las peroxidasas de diferentes fuentes vegetales usando como parámetro tanto la actividad enzimática como las reacciones de acoplamiento oxidativo utilizando las enzimas.

3. Antecedentes

3.1 Aprovechamiento de residuos agroindustriales.

El término agroindustria se refiere a la integración de la producción primaria agrícola, pecuaria o forestal, el proceso de transformación y la comercialización del producto final. Tomando esta definición como base, los residuos agroindustriales son materiales en estado sólido o líquido que se generan a partir del consumo directo de productos primarios o de su industrialización, y que ya no son de utilidad para el proceso que los generó, pero que son susceptibles al aprovechamiento o transformación para generar otro producto con valor económico, de interés comercial y/o social. (Saval, 2012).

Este aprovechamiento se ha generado a partir de la necesidad de darle un uso alternativo a los residuos, para evitar, de cierta manera el impacto ambiental que ocasiona su disposición. El problema que se presenta frecuentemente es que no existe el conocimiento del manejo adecuado para estos residuos, además de la falta de recursos tecnológicos, económicos y legislativos para su adecuado procesamiento. Es por eso que la ciencia se ha planteado darle una aplicación a los residuos generados en la industria agrícola, pecuaria y forestal.

Dentro de los usos que se les han dado a los distintos tipos de residuos agroindustriales se encuentran: como sustrato para la producción fermentativa de metabolitos, como acondicionadores de suelo mediante el composteo, como suplemento alimenticio, como sustrato para la generación de bioenergéticos y como fuente de diversas enzimas.

3.2 Enzimas en síntesis orgánica

La síntesis orgánica ha sido una de las disciplinas más usadas para la obtención de compuestos que tienen diferentes aplicaciones. El uso de catalizadores ha sido un punto fundamental en la síntesis orgánica.

Las enzimas son proteínas que catalizan las reacciones del metabolismo celular y pueden involucrar sustratos tanto naturales como no naturales. El uso de enzimas representa una buena alternativa para la síntesis, debido a que presentan características convenientes frente a los catalizadores químicos.

Desde que se iniciaron los estudios bioquímicos se necesitó el uso de catalizadores diferentes a los químicos, esto debido a que las sustancias biológicas son sensibles a su uso, es por eso que sólo se puede hacer la síntesis mediante métodos biológicos. Otra razón para el uso de enzimas son las cuestiones ambientales ya que la mayoría de las enzimas reaccionan en agua y en condiciones poco extremas es decir, pH neutros y temperatura ambiente o cercana a la ambiente.

Las enzimas catalizan muchos tipos de reacciones y tienen afinidad por un gran número de sustratos; alguna otra ventaja es la selectividad que presentan ante ciertos sustratos. La selectividad puede darse en diferentes maneras: las enzimas actúan sobre un tipo de grupo funcional discriminando a otros, evitando que se lleven a cabo transformaciones indeseables lo que las vuelve quimioselectivas. Su estructura tridimensional les permite además, distinguir entre ambientes químicos diferentes pudiendo así dirigir la reacción hacia un grupo funcional determinado excluyendo a otros igual es de la misma molécula lo que se le llama como regioselectividad. Finalmente debido a que son entidades quirales, las enzimas son capaces de distinguir entre las orientaciones moleculares seleccionando un sustrato en específico entre las mezclas racémicas, esto es importante debido a que se ha estudiado que ciertos compuestos se comportan diferente dependiendo del enantiomero que se presente; esta es una de las principales ventajas del uso de enzimas pues la especificidad enantiomérica es difícil de lograr con las reacciones catalizadas químicamente (Sánchez-Carvajal, 2008).

3.3 Peroxidasas

Las peroxidasas (E.C. 1.11.1.7) son hemoproteínas que tienen en su sitio activo una protoporfirina IX férrica como grupo prostético. Son oxidorreductasas que catalizan la reducción de peróxidos como el peróxido de hidrogeno y la oxidación de un gran número de compuestos orgánicos e inorgánicos donadores de electrones. (Duarte-Vásquez y col. 2007) A continuación se presenta el esquema de reacción.

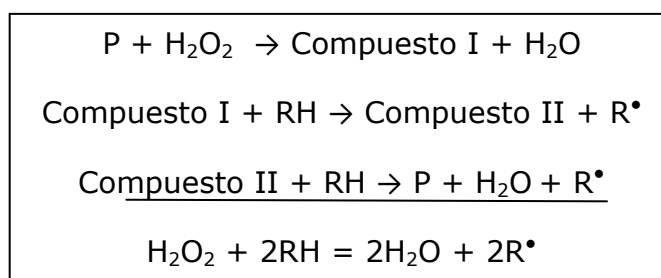


Figura 1. Reacción general para la enzima peroxidasa. (Dunford, 2010)

La actividad de peroxidasa ha sido identificada en microorganismos, plantas y animales; nombrándose frecuentemente de acuerdo a su origen: mieloperoxidasa, lactoperoxidasa y peroxidasa de rábano son algunos ejemplos.

3.3.1 Clasificación de las peroxidasas

El término peroxidasa se refiere al grupo de enzimas que se encargan de las reacciones de oxidoreducción entre el peróxido y compuestos reductores. Las peroxidasas se encuentran en animales, plantas y microorganismos, y se dividen en tres superfamilias basados en su estructura y propiedades catalíticas (Higara y col. 2001).

La primera superfamilia se refiere a las peroxidasas encontradas en animales como lo son: glutatión peroxidasa (EC 1.11.1.9), mieloperoxidasa (EC 1.11.1.7), lactoperoxidasa (EC 1.11.1.7). La segunda se refiere a las catalasas (EC 1.11.1.6)

encontradas en animales, plantas bacterias, hongos y levaduras. La tercera superfamilia agrupa a las peroxidasas de plantas, hongos, bacterias y levaduras. Debido a que la secuencia de aminoácidos en la superfamilia III es altamente variable y difieren en sus propiedades catalíticas esta se puede dividir en tres clases.

La clase I se refiere a las peroxidasas intracelulares en plantas, bacterias y levaduras como la citocromo C peroxidasa (EC 1.11.1.5) y la ascorbato peroxidasa (EC 1.11.1.11). La clase II son peroxidasas extracelulares de hongos como la lignino-peroxidasa (EC 1.11.1.14). Finalmente se encuentra la Clase III que agrupa a las peroxidasas secretadas fuera de la célula o en vacuolas, la enzima más popular de esta clase es la peroxidasa de rábano. Estudios han reportado que existen altos niveles de variabilidad de la secuencia total de aminoácidos, algunas veces con coincidencia de menos del 35% entre plantas de la misma especie. Sin embargo entre plantas de diferentes especies la coincidencia es cerca del 90% (Higara y col. 2001). Esto indica que especies aisladas de plantas pueden tener peroxidasas con características similares.

3.3.2 Estructura general

La peroxidasa de rábano es la más descrita en la literatura, su estructura contiene dos diferentes tipos de centro metálico, en uno se encuentra la ferroprotoporfirina IX (Fe III) la cual es llamada usualmente como grupo hemo y por otro lado dos átomos de calcio. Estos dos centros son esencialmente para la integridad estructural y funcional de la enzima. El grupo hemo está ligado a la enzima por un residuo de aminoácido His 170 mediante un enlace coordinado entre la cadena lateral de la histidina y el átomo de hierro del grupo hemo. El segundo sitio axial de coordinación no es ocupado en el estado fundamental sin embargo está disponible cuando reacciona con el peróxido. Los dos sitios de unión del calcio se encuentran en las posiciones distal y proximal al plano hemo y están unidos por puentes de hidrógeno. Cada sitio del calcio esta hepta-coordinado con ligandos donadores de

oxígeno formando una combinación de cadenas carboxiladas de aminoácidos. La pérdida del calcio da como resultado la disminución de la actividad enzimática y estabilidad ante la temperatura. (Veitch, 2004)

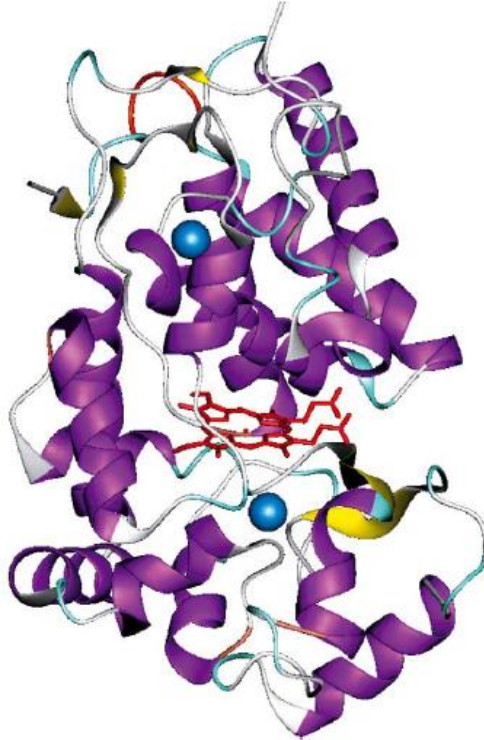


Figura 2. Estructura general de la peroxidasa. (Veitch, 2004)

En la figura 2 se muestra la representación tridimensional de la estructura cristalina de rayos X de peroxidasa de rábano (HRP). El grupo hemo (en rojo) está localizado en los dominios distal y proximal cada uno de ellos contiene un átomo de calcio (en círculo azul). Las estructuras α -hélice y β -plegada en morado y amarillo respectivamente.

3.3.3 Mecanismo catalítico de la peroxidasa de rábano (HRP)

El ciclo catalítico de la peroxidasa involucra diferentes estructuras intermediarias de la enzima. En la etapa inicial la enzima nativa férrica es oxidada por el peróxido de hidrógeno formando un compuesto intermedio inestable de alto grado de oxidación llamado compuesto I (Col) con una estructura hemo de FeIV=O-porfirina (centro oxiferrilo y un radical cationico porfirinico) con la correspondiente reducción del peróxido a agua. En términos generales el compuesto I tiene dos equivalentes que pueden ser oxidados a partir del estado fundamental inicial.

La primera reducción requiere de un sustrato donador de electrones por lo que el compuesto Col oxida al sustrato para dar lugar al compuesto II (Coll) liberando un radical libre. Coll se reduce una vez más por una segunda molécula de sustrato regenerando el estado del hierro III y formando un nuevo radical libre. Ambos compuestos I y II son oxidantes poderosos con potenciales redox cercanos a +1V.

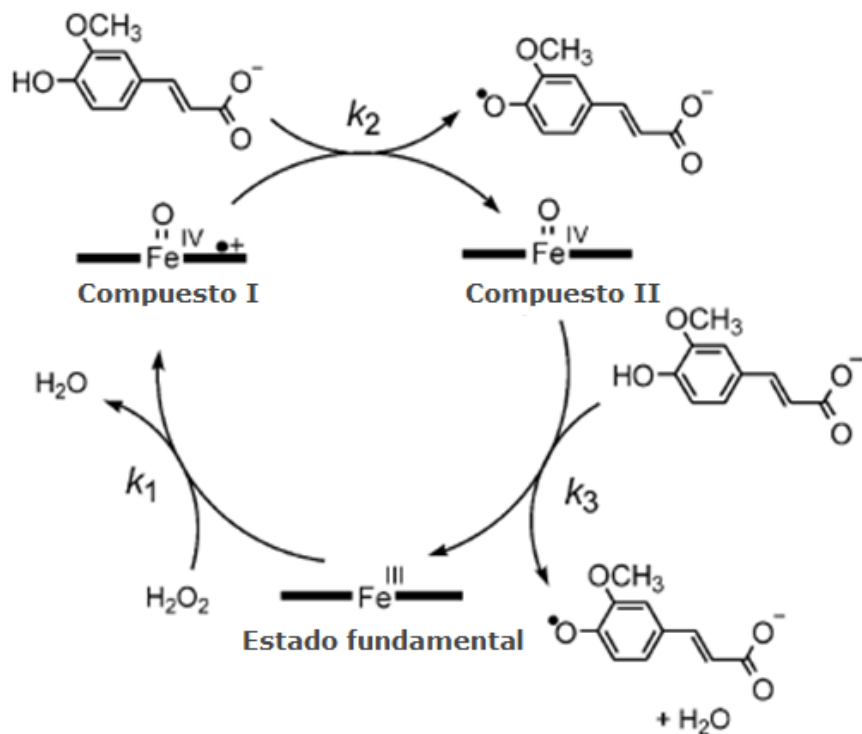


Figura 3. Mecanismo catalítico de la peroxidasa con ácido ferúlico. (Veitch, 2004)

En la figura 3 se muestra el ciclo catalítico que la peroxidasa de rábano usando ácido ferúlico como sustrato donador de electrones. Las constantes k_1 , k_2 y k_3 , representan, respectivamente, las velocidades de formación del compuesto I, de reducción del compuesto I al compuesto II y la reducción del compuesto II al estado fundamental.

- Comportamiento frente a peróxidos

En la ausencia de un sustrato donador de electrones y con un exceso de peróxido o con una concentración de peróxido muy por encima del sustrato donador de electrones existe la formación del intermediario enzimático: Compuesto I (CoI). Después pueden existir dos posibles rutas catalíticas:

a) La formación de un Compuesto III (CoIII) derivado de la reacción del Compuesto II (CoII) con exceso de peróxido de hidrógeno. Esta ruta es llamada reversible debido a que la enzima se va recobrando lentamente del CoIII el cual se va acumulando a partir del CoII; como se muestra en la figura 4, el compuesto II es reducido a un intermediario transitorio el cual reacciona con un radical superóxido provocando que la reacción se vea favorecida para la formación del compuesto III. También con un equivalente de peróxido de hidrógeno puede regresar a la forma de Compuesto I.

b) Esta ruta es también llamada irreversible esto es porque existe una inactivación de la enzima en la que la peroxidasa es convertida a un intermediario: la verdohemoproteína inactiva (figura 4), llamada P-670 o Compuesto IV, cuando se hace reaccionar con exceso de peróxido de hidrógeno. La P-670 también se forma cuando la enzima reacciona con otros hidroperóxidos como: metilhidroperóxido, hidroximetilhidroperóxido y el ácido *m*-nitroperoxibenzoico.

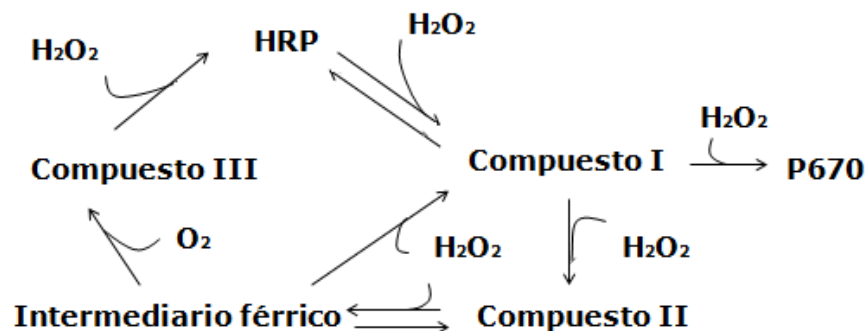


Figura 4. Esquema de posibles rutas de inactivación de la peroxidasa de rábano. Dónde HRP (peroxidasa de rábano) y O_2 (radical superóxido) (Baynton y col. 1993).

3.3.4 Transformaciones mediadas por peroxidadas

Las oxidaciones son de las transformaciones químicas principales. En las décadas pasadas los estudios fueron enfocados a la oxidación catalizada por metales y la organocatálisis. La biocatálisis se ha empleado como alternativa a estos métodos.

Las peroxidadas catalizan transformaciones de interés sintético las cuales son: deshidrogenación oxidativa, halogenación oxidativa, reacciones de transferencia de oxígeno y epoxidación de dobles enlaces carbono-carbono.

- Deshidrogenación oxidativa

Esta reacción es la clásica descrita como funcionamiento general de las peroxidadas. La formula general es:



Los sustratos más comunes usados en esta reacción son mono y difenoles produciendo radicales fenoxi los cuales se dimerizan en un paso no enzimático formandose difenoles y productos oligomeros. (Gamenara. 2013). Una parte de derivados de ácidos hidroxicinámicos han sido usados para oxidaciones mediadas por peroxidadas para la formación directa de lignanos. A continuación se muestran productos de las reacciones a partir de metil sinapato y ferulato.

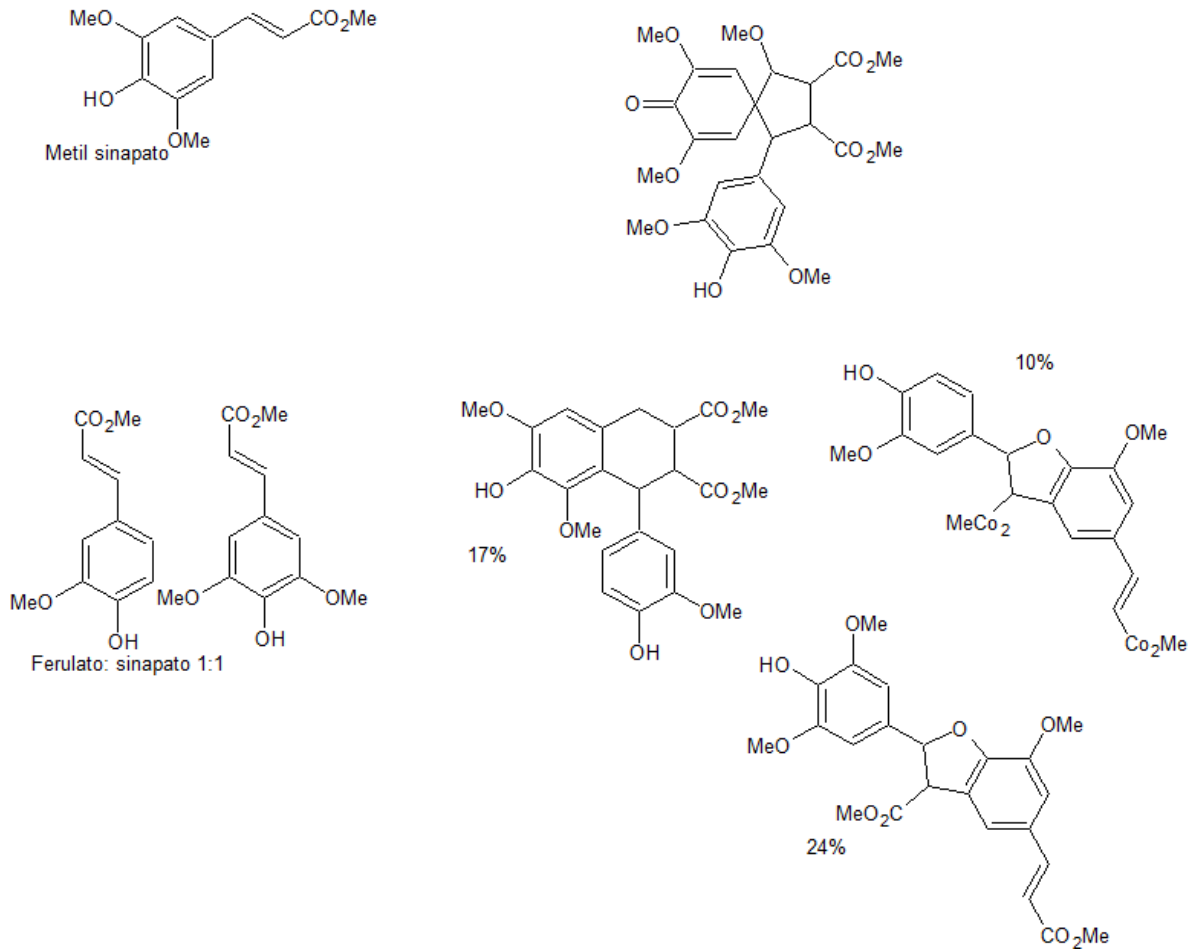


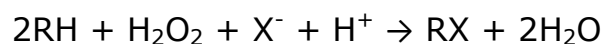
Figura 5. Productos obtenidos de la reacción mediada por peroxidasas a partir de metil sinapato y ferulato. (Gamenara. 2013).

En las reacciones mostradas en la figura 5 los rendimientos de la reacción entre el metil ferulato y el metil sinapato son: 24% para los productos de acoplamiento cruzado, 27% sumando este rendimiento a los dimeros y oligomeros 15%.

- Halogenación oxidativa

La haloperoxidasa es una de las enzimas que puede mediar la halogenación de compuestos orgánicos. Las haloperoxidasas catalizan reacciones de halogenación electrofílica a través de la transformación oxidativa de haluros con el consumo de

un equivalente de peróxido por producto halogenado formado. La ecuación general es la siguiente:



El grupo más importante de haloperoxidasas son las heme-haloperoxidasas encontradas en el reino fungi. Los sustratos comúnmente usados son compuestos aromáticos, alquenos y compuestos β -dicarbonílicos dando productos haloaromáticos, halohidrinas y compuesto β -dicarbonílicos mono y dihalogenados (Gamenara. 2013).

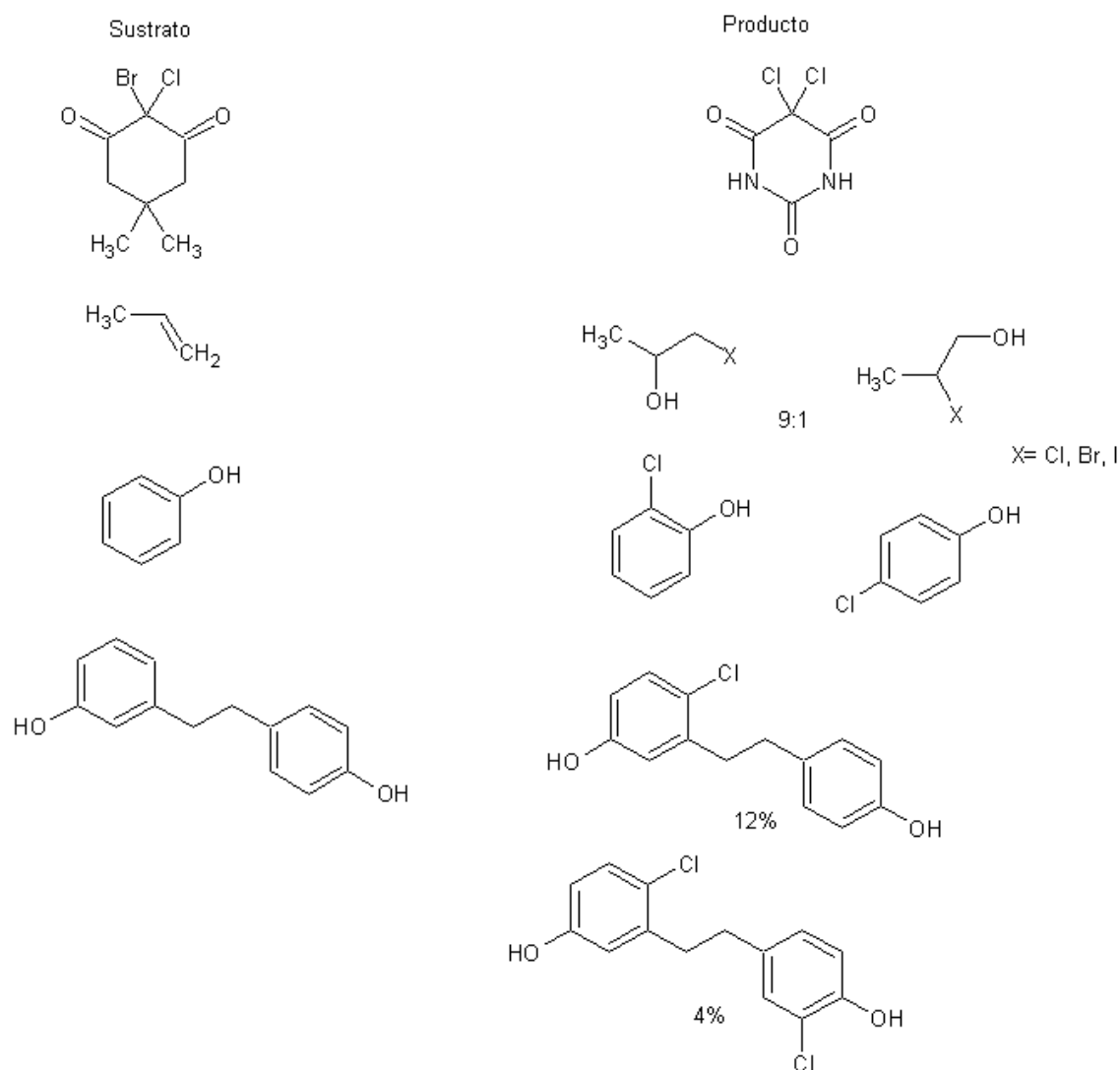


Figura 6. Reacciones de halogenación mediadas por peroxidasas (Gamenara. 2013).

Las haloperoxidasas también han sido utilizadas como catalizador en la oxidación del nitrito (NO_2^-) a NO_2^+ o NO_2^\bullet a un pH cercano al neutral haciéndolo reaccionar con diferentes compuestos fenólicos. Otra forma de derivados fenólicos nitrados es la oxidación con peroxidasas de la anilina (Gamenara. 2013).

- Reacciones de transferencia de oxígeno

La gran mayoría de las aplicaciones sintéticas de enzimas tienen que ver con transferencia de oxígeno, estas reacciones permiten la transferencia enantioselectiva de oxígeno en los sustratos orgánicos de una manera suave y controlada. Cuando el átomo de hidrógeno es transferido al sustrato, la enzima actúa como una monooxigenasa catalizando la oxidación o epoxidación heteroátomo.

- Epoxidación de dobles enlaces carbono-carbono.

Existen diversas clases de peroxidasas que catalizan la epoxidación de alquenos alifáticos. Cuando se da la reacción estas enzimas muestran una conformación molecular complicada formando un sistema multicomponente lo que hace su aplicación en estas reacciones difícil. Sin embargo, la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* (CPO) es la enzima más comúnmente usada. Esta cataliza las reacciones de epoxidación de alquenos cis y alquenos sustituidos gem logrando una alta pureza enantiomérica en los productos. Una de las aplicaciones reportadas más comunes es en la síntesis de (R)-(2)-mevalonolactona la cual tiene aplicaciones farmacéuticas como agente lipoproteínico y arteriosclerótico (Hollmann y col. 2010).

3.3.5 Funcionalidad de las peroxidasas en plantas

Se ha reportado que las peroxidasas intervienen en diferentes procesos dentro de las plantas como lo son: lignificación, suberización, la reticulación de las proteínas estructurales de la pared celular, el catabolismo de la auxina, autodefensa contra patógenos, halotolerancia, y senescencia. Todas estas funciones estructurales están basadas en propiedades catalíticas *in vitro*, perfiles de expresión, etc (Higara y col. 2001). A continuación se describen las principales funciones.

- Lignificación, suberización y otros procesos metabólicos de la pared celular

Las peroxidasas reaccionan generalmente con compuestos que contienen grupos hidroxilo unidos a anillos aromáticos. La oxidación de los compuestos fenólicos da como resultado la formación de radicales inestables los cuales reaccionan entre sí para formar polímeros. Así los ácidos hidroxicinámicos y sus derivados son convertidos en radicales fenoxi por la peroxidasa. Estos ácidos son precursores de alcoholes hidroxicinámicos los cuales son polimerizados en lignina. La lignina es un componente importante de la pared celular pues da rigidez y resistencia al ataque de microorganismos ya que impide la penetración de enzimas destructivas. Los ácidos hidroxicinámicos con fracciones alifáticas son polimerizados como suberina la cual, sirve como aislante de algunas células vegetales dando características impermeables lo que las hace resistentes a gases y ácidos (González y Raisman 2008). La peroxidasa también oxida compuestos fenólicos para la formación de polisacáridos ferulados y residuos de tirosina de la pared celular que son proteínas constituyentes de la pared celular como la hidroxiprolina. Estas moléculas son resultado de la oxidación de los compuestos fenólicos derivándose en moléculas más grandes de la pared celular.

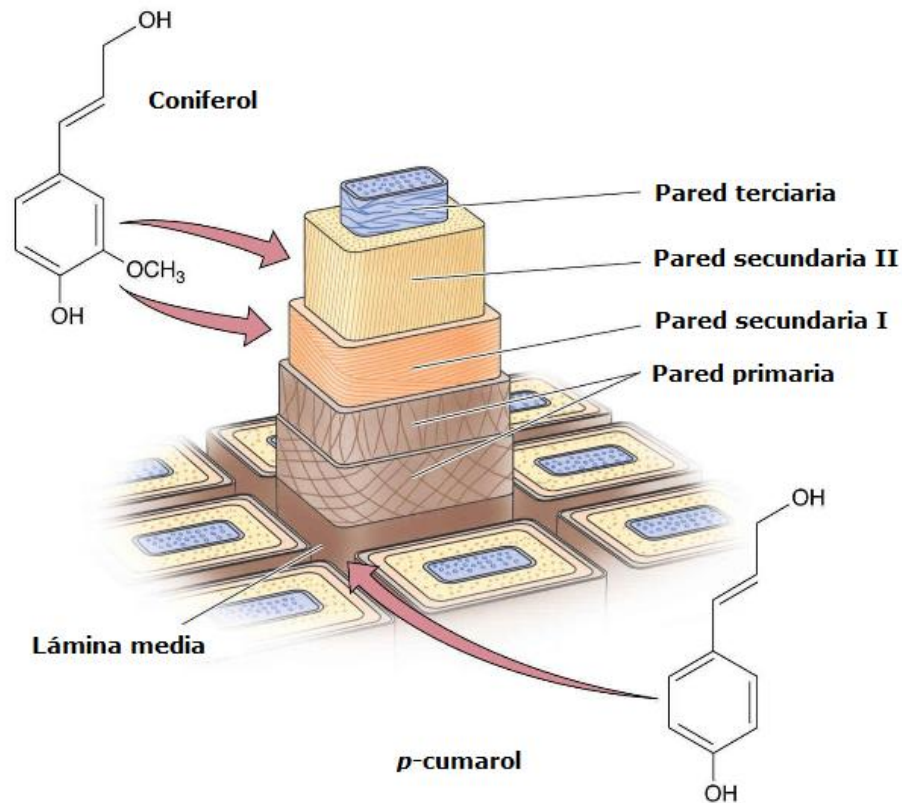


Figura 7. Estructura de pared celular. (Hildebrand, 2004)

- Catabolismo de la auxina

La auxina es una hormona vegetal involucrada en muchos procesos fisiológicos como la división y diferenciación celular. La peroxidasa contribuye a la descarboxilación de auxinas, provocando la inactivación del ácido indol-acético (IAA). El ácido indol-acético es la hormona vegetal de crecimiento más importante y también es un tipo de auxina, está involucrado en muchos procesos de crecimiento como la expansión celular, diferenciación de tejido vascular, iniciación del crecimiento de raíces, floración, maduración de frutos, senescencia y abscisión foliar de hojas y frutos (Higara y col. 2001).

- Cicatrización de heridas

Las heridas causadas por factores bióticos y abióticos pueden originar pérdida de órganos esenciales en las plantas así como una fácil penetración de patógenos. La respuesta vegetal para estos factores de estrés es la activación de sistemas de auto-defensas para reducir el daño a tejidos o defensa contra patógenos. Así los niveles de peroxidasa aumentan cuando se detecta un daño en la planta. Cuando existe un daño en la planta esta deposita suberina en los tejidos para ayudar al proceso de cicatrización (Kleinman, 2009).



Figura 8. Cicatriz en tallo (Kleinman, 2009).

- Defensa contra infecciones patógenas

Ante una infección las plantas sintetizan una serie de proteínas de defensa, son llamadas proteínas PR dentro de las cuales se encuentran las peroxidasas. Estas son sintetizadas bajo diferentes tipos de infecciones: de hongos, bacteria, virus y viroides. El rol que desempeñan las peroxidasas en la defensa contra infecciones es el reforzamiento de la pared celular a través de barreras físicas que comprenden lignina, suberina y polímeros de ácido ferúlico. Las peroxidasas se activan en la planta cuando hay un ataque de patógenos, aumentando

notablemente las concentraciones de radicales libres de oxígeno, los cuales en altas dosis son nocivos para el crecimiento de los microorganismos. La producción y acumulación de aniones superóxido y de radicales hidroxilo en la pared celular están relacionados con la presencia de patógenos. La actividad peroxidasa se incrementa enormemente pasados 12 h desde la invasión bacteriana en el sitio de infección (Martínez y col. 1998).

3.3.6 Fuentes de peroxidasas en vegetales.

La presencia de peroxidasa en tejidos vegetales, y su capacidad para oxidar a un gran número de sustratos ha llevado a asociar su presencia con la pérdida de color, sabor y valor nutricional en alimentos crudos y procesados. Se ha convertido en una enzima de gran utilidad para la evaluación de la eficacia de procesos térmicos. Es por eso que se ha estudiado su presencia en diferentes fuentes: melón, tubérculos, coles de Bruselas, col, naranjas, tabaco, raíces de zanahorias, papaya, espinacas, tomates, entre otros (Thongsook y Barret. 2005). El uso de nuevas fuentes de peroxidasas vegetales se enfoca principalmente a su aplicación en la industria (tratamiento de aguas residuales) y existen limitados estudios acerca de su uso en síntesis de compuestos (Alonso-Calderón, 2008). A continuación se describen algunas peroxidasas de importancia para este trabajo.



Figura 9. Fuentes vegetales de peroxidasas.

- Peroxidasa de brócoli

El interés inicial al estudiar las peroxidasas encontradas en el brócoli (*Brassica oleracea L.*) fue debido a los efectos producidos durante el almacenamiento lo que lleva a que el producto sea difícil de comercializar. Se ha reportado que la vida de anaquel desde el punto de vista de la calidad horticultural del brócoli es corta lo que vuelve limitada su comercialización. Existe una posible relación entre la producción de compuestos volátiles indeseables y la producción de enzimas, específicamente hablando de peroxidasas (Raseetha y col. 2011).

Recientemente se ha estudiado la peroxidasa de brócoli como alternativa a la peroxidasa de rábano pudiendo ser usada en ensayos inmunoenzimáticos, purificación de aguas negras entre otros. Así se ha encontrado que los tallos y las inflorescencias tienen una actividad enzimática de peroxidasa parecida (Duarte-Vázquez y col. 2007).

- Peroxidasas de maíz

Encontrar enzimas con actividad peroxidasa es común en los tejidos vegetales, en el maíz (*Zea mays*) existen alrededor de 24 isoenzimas de peroxidasas en cerca

de 250 diferentes variedades de maíz. La planta de maíz sufre elongación y diferenciación de tejidos rápidamente antes del surgimiento del “penacho”, el crecimiento continúa en los nodos superiores, hojas y cáscaras alrededor de una semana antes del periodo de florescencia. Existe una diferencia en la presencia de las diferentes isoenzimas de las peroxidasas durante el desarrollo de la planta mientras que otras no se ven afectadas. Esto implica que ciertas peroxidasas de la planta están ligadas al catabolismo de la auxina suprimiendo o activando el metabolismo (Hamill y Brewbaker. 1969). Sin embargo, la actividad de peroxidasa aumenta de manera general durante la proliferación celular.

También se han hecho estudios de el efecto que tiene el someter a procesos de estrés a la planta del maíz, se ha encontrado que las peroxidasas de la pared celular son las que reaccionan esencialmente ante los daños (principalmente refiriéndose a los ataques de patógenos), estrés oxidativo y tratamiento con exceso de peróxido de hidrógeno.

- Peroxidasa de nopal

El interés en el nopal (*Opuntia sp.*) ha crecido en los últimos años debido a los efectos benéficos que tiene sobre la salud humana, se ha estudiado su composición, sin embargo el estudio acerca de las enzimas del nopal es limitado. Se sabe poco de las aplicaciones dadas a las peroxidasas del nopal. Es reportada las características de actividad enzimática y comportamiento bioquímico de las peroxidasas encontradas en los nopales, con la finalidad de determinar las isoformas, su existencia y su diferente comportamiento puede servir como marcadores biológicos para poder diferenciar entre especies (Khales y Baaziz. 2005).

- Peroxidasa de cebolla y cebollín

Se ha reportado una relación negativa entre la elongación general de los tejidos y la actividad de peroxidasa. Específicamente para cebolla (*Allium cepa*) se sabe que los tratamientos con ascorbato o L-galactono- γ -lactona (el precursor inmediato

en la síntesis del ácido ascórbico), da como resultado la estimulación del crecimiento de las raíces de las cebollas reduciendo paralelamente la actividad de peroxidasa, esto es debido a que la reducción del ascorbato puede actuar como un inhibidor in vitro de las peroxidasas de la pared celular (Córdoba-Pedregosa y col. 2003).

Las peroxidasas de la pared celular de la cebolla tienen como principal función dar rigidez y moderar los niveles de elongación de la planta. A su vez se ha demostrado que se encuentran en mayor proporción en las zonas del meristemo apical cuyas células son responsables de la división celular (Córdoba-Pedregosa y col. 2005).

Es reportado que para las hojas de cebollín (*Allium schoenoprasum*) la exposición a radiación UV-mejora la actividad de la ascorbato peroxidasa sin embargo, la actividad de guayacol peroxidasa es inhibida (Egert y Tevini. 2003).

3.3.7 Aplicaciones de las peroxidasas.

Como ya se ha mencionado antes, el modo en que las peroxidasas funcionan es la reducción del grupo hemo en presencia de sustratos donadores de electrones lo que las hace útiles para aplicaciones tanto industriales como analíticas (Hamid y Khalil. 2009). A continuación se describen algunas de las aplicaciones que se les da a estas enzimas.

- Eliminación de compuestos fenólicos

Los compuesto aromáticos, incluyendo fenoles y aminas aromáticas, constituyen el mayor grupo de tipos de contaminantes. Estos comúnmente se encuentran en las aguas de desechos de un gran número de industrias (refinación de petróleo, plásticos y resinas, revestimiento de metal, textiles, papel, entre otras.) La mayoría de los compuestos aromáticos son tóxicos y deben ser removidos de las aguas de desecho antes de ser vaciadas al ambiente. El tratamiento enzimático ha sido propuesto como uno de los mejores para estos métodos de conversión. Debido a

su alta selectividad pueden actuar efectivamente incluso en muestras diluidas, también son menos propensas a sufrir inhibición por sustancias que pueden ser tóxicas para los microorganismos y su costo puede ser menor a futuro (Delgadillo-López, 2011).

- Decoloración de tintes sintéticos

Los tintes sintéticos son usados para impresión en papel, coloración de fotografía y cómo aditivo en derivados del petróleo, estos tienen estructuras aromáticas complejas. Los problemas que presentan este tipo de tintes es que muchas veces son tóxicos y recalcitrantes, son resistentes a la degradación biológica y no son fácilmente removidos en las plantas de tratamiento de aguas residuales. Debido a su estructura muchas veces es necesario eliminar estos residuos mediante métodos fisicoquímicos como oxidación química, adsorción y ósmosis inversa los cuales son eficientes. Estos métodos también presentan desventajas principalmente por el alto costo que representan, su aplicación limitada y la necesidad de un gran gasto de energía. El uso de enzimas es una alternativa debido a que la eliminación de estas sustancias mediante su oxidación esta grandemente estimulado por enzimas oxidativas (Hamid y Khalil. 2009).

- Síntesis orgánica de polímeros

La peroxidasa de rábano ha sido usada para polimerizar compuestos fenólicos y aminoaromáticos. La producción de polímeros conductores ha tenido especial interés por su amplia aplicación. Ejemplo de esto es la polianilina pues es altamente estable en el ambiente y cuenta con propiedades electrónicas debido a la deslocalización de su carga, sin embargo su producción no es amigable con el ambiente debido a que se lleva a cabo a pH muy bajo (Rodríguez, 2008). Recientemente se ha usado una peroxidasa anionica de palma para la síntesis de la polianilina. Alguna otra aplicación de las peroxidases en la síntesis de polímeros es en la producción de lignina, la cual es el segundo biopolímero más abundante en el planeta y es usado en la producción de dispersantes, agentes de acondicionamiento de suelos, resinas adhesivas y laminados.

- Biosensores con peroxidasas

Recientemente los electrodos que funcionan con peroxidasas han sido utilizados para análisis analítico en la determinación de peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos. Cuando la enzima se encuentra inmovilizada en un electrodo, está será oxidada por el peróxido de hidrógeno pero será el mismo electrodo quien actuará como donador de electrones para regresar a la enzima a su estado nativo. Cuando se encuentra con otros donadores de electrones estos actuaran como sustratos secundarios creando un potencial el cual podrá ser medido (Peña-García, 2003).

- Inmunoensayos enzimáticos

Los ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA por sus siglas en inglés) son pruebas diseñadas para la detección de antígenos y anticuerpos las cuales se basan en pruebas colorimétricas. La enzima se une al anticuerpo que es específico para el antígeno, además de necesitar el sustrato cromogénico, el cual, en presencia de la enzima cambiara de color. La cantidad de color desarrollado será proporcional a la cantidad de antígeno en la prueba (Hamid y Khalil. 2009).

3.4 Fenoles

Los fenoles son compuestos de formula general $ArOH$ donde Ar es el grupo fenilo sustituido por uno o más grupos funcionales, y OH es el grupo hidroxilo unido al anillo. Los fenoles más sencillos son líquidos o sólidos de bajo punto de fusión, y con punto de ebullición bastante elevados debido a la formación de puentes de hidrógeno, la mayoría de los fenoles son insolubles en agua, son incoloros a menos que presenten un grupo capaz de imponerles alguna coloración pero se oxidan con facilidad por lo que es fácil que se coloreen (Morrison y Boyd. 1987).

Este grupo de compuestos se encuentra distribuido principalmente en las plantas, son productos secundarios de su metabolismo, producidos por dos rutas metabólicas principales: ruta del ácido shikímico y la ruta del ácido malónico. Sus

principales funciones dentro de las plantas son la defensa contra agentes patógenos, soporte, atracción de polinizadores, absorción de radiación UV, entre otros. Los más comunes son las cumarinas, lignanos y flavonoides.

3.5 Acoplamiento oxidativo de fenoles iniciado por peroxidasas

El acoplamiento oxidativo de compuestos orgánicos es una reacción que involucra la eliminación de hidrógeno de las moléculas y la formación de enlaces tipo carbono-carbono, carbono-oxígeno, carbono-nitrógeno y otros heteroátomos. El mecanismo de reacción depende de las especies que reaccionan y los catalizadores que se involucran en el proceso. En esta reacción existe la formación de radicales libres o radicales con carga (catión-radical o anión-radical). Este tipo de reacciones se ha empleado principalmente para la obtención de polímeros de compuestos aromáticos donde es necesario la formación de enlaces para la obtención de estructuras altamente conjugadas.

Dentro de las plantas el acoplamiento oxidativo de los fenoles da como resultado la obtención de algunos biopolímeros como la lignina y la melanina. Estas reacciones son catalizadas por las oxidorreductasas, dentro de este grupo de enzimas se encuentran las peroxidasas, oxidasas y oxigenasas. La polimerización oxidativa usando peroxidasas (la más usada es la peroxidasa de rábano) ha sido investigado por muchos años. Esta enzima muestra una alta reactividad para la generación de radicales libres sin embargo, no es capaz de controlar el acoplamiento oxidativo. En caso de los fenoles que poseen grupos funcionales, la quimioselectividad entre el grupo fenólico y los otros grupos reactivos se puede lograr, la regioselectividad está controlada ocasionalmente debido a los sustituyentes funcionales (Kobayashi y Higashimura. 2003).

- Reacciones de acoplamiento oxidativo con ácido ferúlico y vainillina

Un gran número de investigaciones se han enfocado en las oxidaciones con enzimas del ácido ferúlico. La mayoría a la formación de compuestos naturales como lignanos o neolignanos. Con la generación de radicales de fenoles teóricamente puede derivar en la generación de dímeros, oligómeros y polímeros.

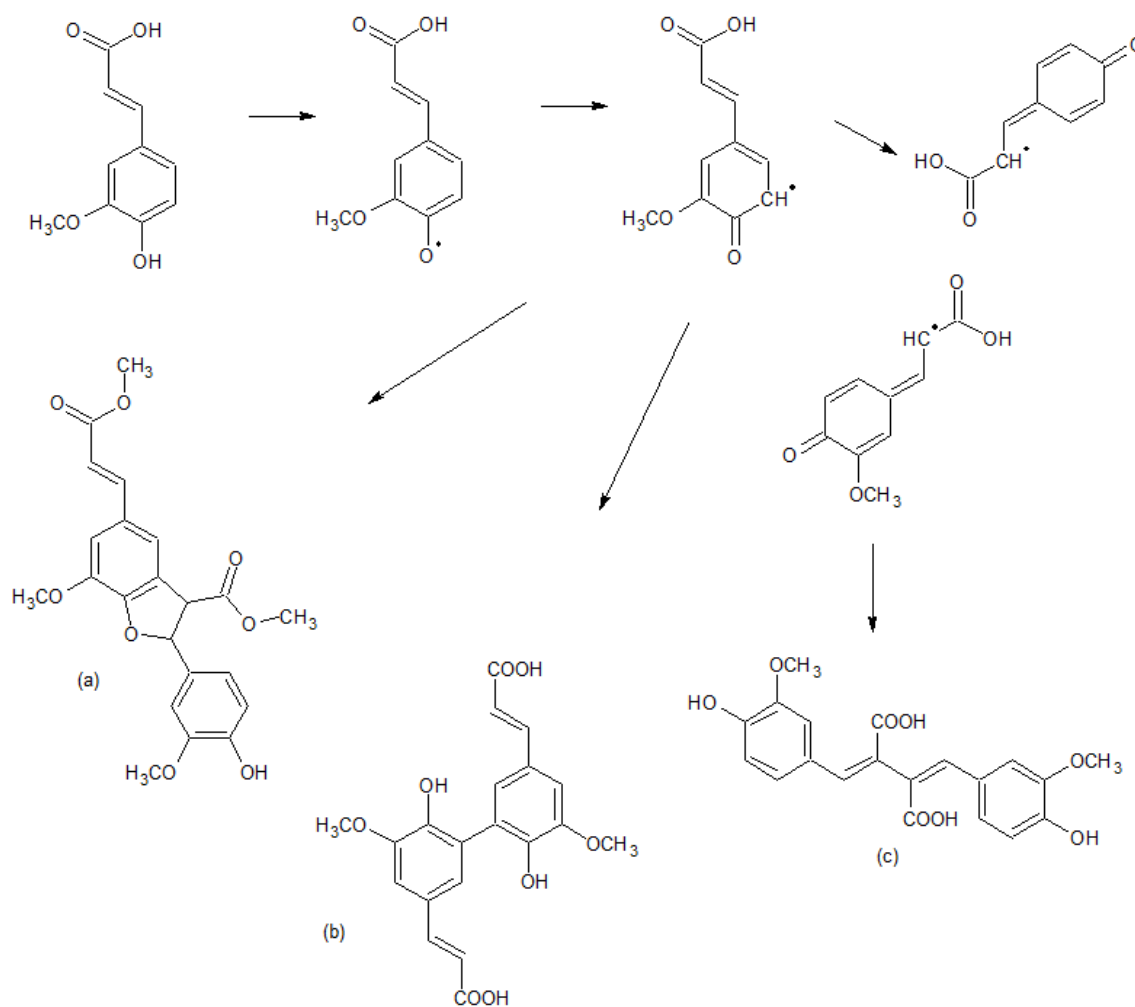


Figura 10. Productos derivados del acoplamiento oxidativo vía radicales libres del ácido ferúlico (Rosazza y col. 1995).

La oxidación del ácido ferúlico con la peroxidasa de rábano da una mezcla de productos compleja, se ha detectado la formación de esteres de metil ferulato que son transformados a compuestos fenil cumaricos (figura 10a) con un rendimiento de 25%. Esta oxidación ha sido usada como modelo para el comportamiento frente a otras peroxidases sin embargo se muestran comportamientos diferentes en otras peroxidases. La cafeato peroxidasa convierte al ácido ferúlico a dímeros con unión tipo β como en la figura 10c. La peroxidasa de cacahuete convierte el ácido ferúlico en compuestos tipo bifenoles como en la figura 10b.

Como se puede observar en la figura 10 la generación del radical se puede llevar a cabo en diferentes partes de la molécula de ácido ferúlico, es por eso que se obtienen diferentes productos, se reportan hasta el momento la síntesis de seis diferentes dímeros derivados de la reacción de acoplamiento oxidativo con diferentes peroxidases (Mouterde y col. 2012). A continuación se muestran las estructuras de los dímeros obtenidos a partir del ácido ferúlico.

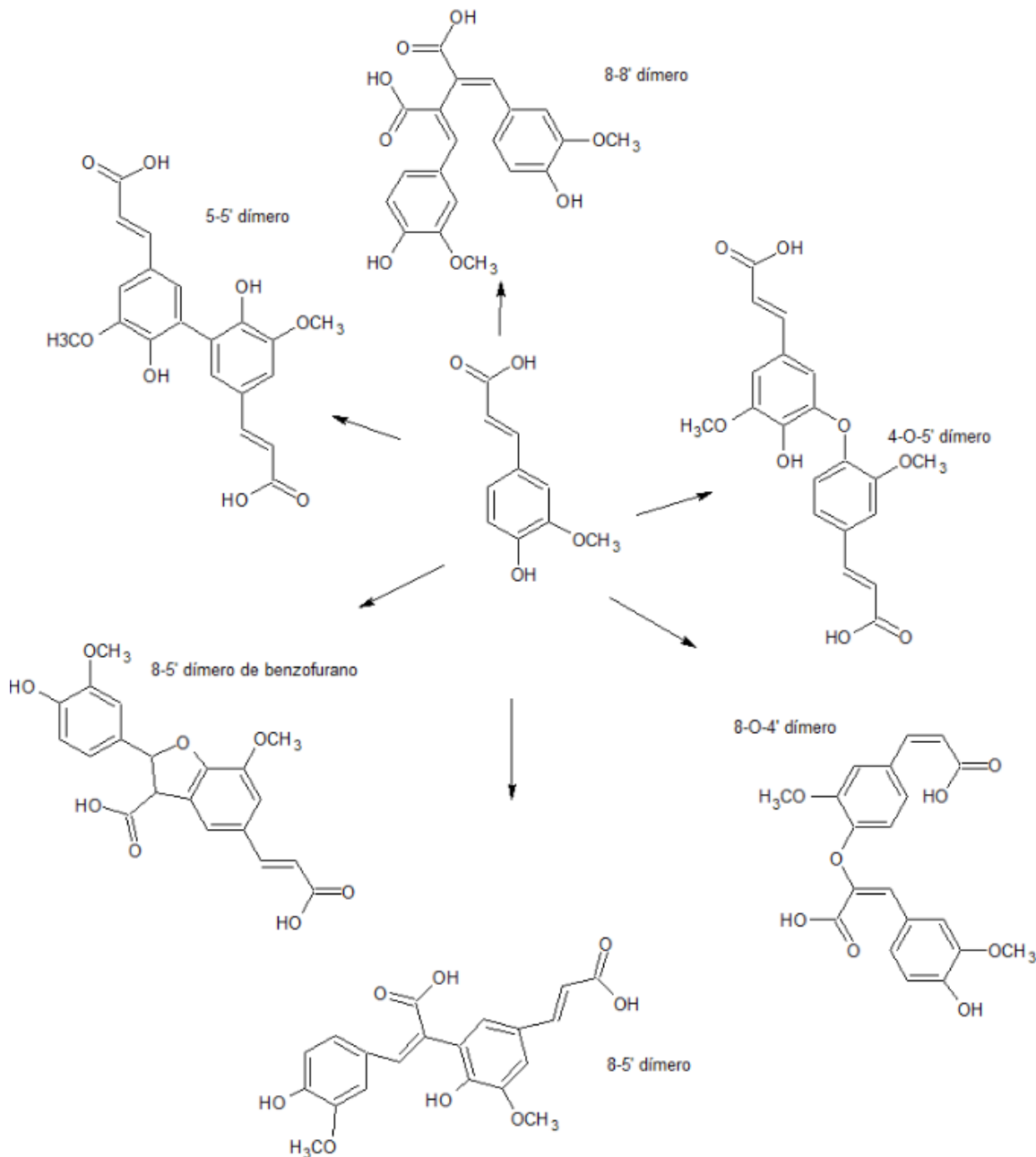


Figura 11. Estructuras sintetizadas a partir de ácido ferúlico por peroxidadas (Mouterde y col. 2012).

Las investigaciones con vainillina se han enfocado principalmente en su uso como precursor de ácido ferúlico en síntesis, sin embargo, debido a su uso como saborizante se ha buscado la forma de aumentar esta característica lográndose a través de la síntesis a partir de peroxidasa de rábano de la divainillina (Nishimura y col. 2010). A continuación se muestra la reacción de síntesis.

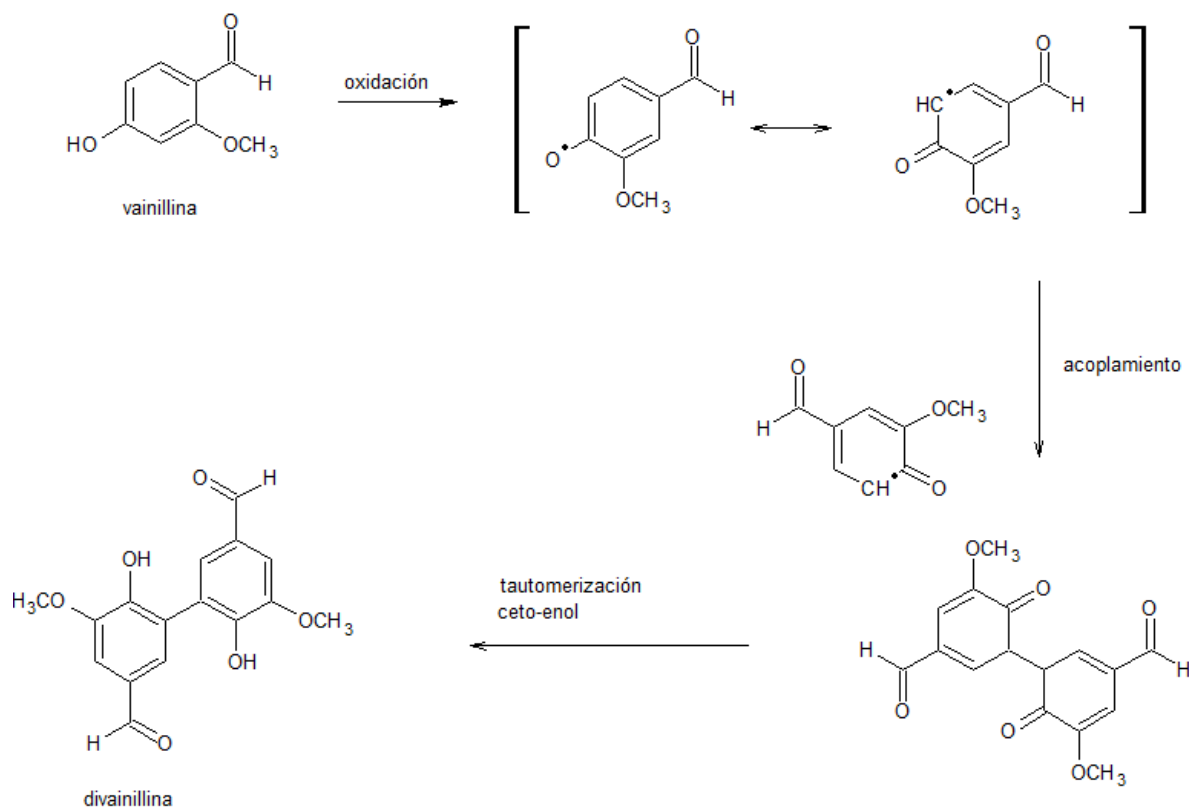
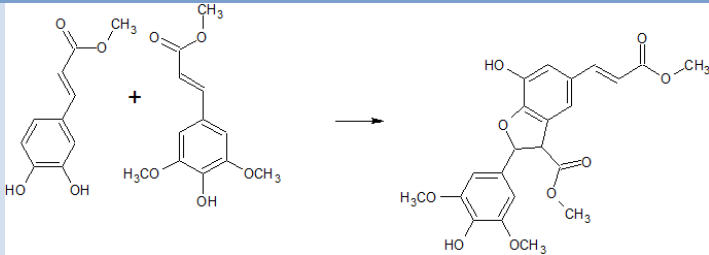
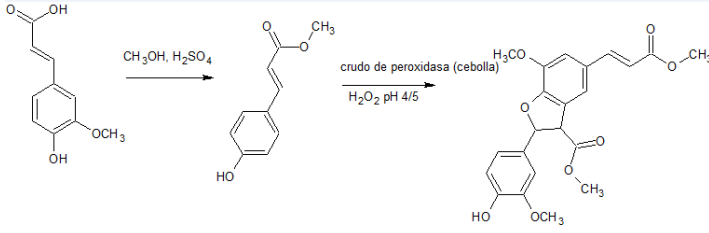


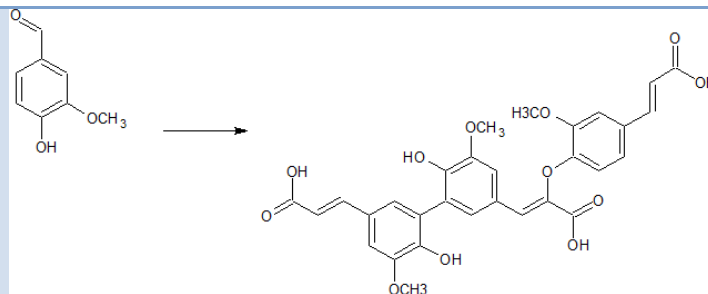
Figura 12. Síntesis de la divainillina (Nishimura y col. 2010).

Se ha sintetizado la dehidrodivainillina mediante acoplamiento oxidativo de vainillina usando peroxidasa de soya, FeCl_3 o persulfato de sodio/potasio como agente oxidante (Gaur y col. 2009). Este compuesto tiene interés por las aplicaciones a dispositivos electrónicos pues es usado como precursor de polímeros y como formador de enlaces moleculares con objetivo de reforzar los polímeros.

A continuación se presenta una tabla con investigaciones recientes de las reacciones de síntesis mediadas por peroxidasas con ácido ferúlico y vainillina.

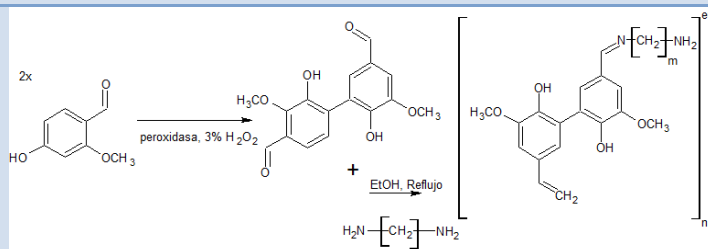
Tabla 1. Síntesis mediadas por peroxidadas.

Tipo de peroxidasa	Investigación realizada	Referencia
Peroxidasa de rábano	<p>Reacciones de acoplamiento oxidativo cruzado con amidas derivadas de ácido ferúlico y sinápico, sintetizando productos con la estructura del dihidrobenzofurano.</p> 	Saliu y col. 2011
Peroxidasa de cebolla	<p>Dimerización y ciclación oxidativa de metil ester de ácido ferúlico, caféico y cumárico para la obtención de lignanos con un mayor poder antioxidante.</p> 	Moussouni y col. 2011
Peroxidasa de rábano	<p>Síntesis de un dehidrotrimero de ácido ferúlico a partir de vainillina comercial mediante acoplamiento de grupos arilo y condensación aldólica mediada por peroxidasa de rábano.</p>	Mouterde y col. 2012



Peroxidasa de maíz Reacciones cruzadas de oxidación con Burr y Fry. arabinoxilanos ferulados mediante enlaces covalentes. 2009

Peroxidasa de rábano Condensación de monómeros de divainillina con diaminas alcalinas para la obtención de polímeros de bases de Schiff. Los polímeros a base de vainillina son usados para la quelación de metales. Amarasekara y Razzaq. 2012



4. Justificación

La demanda actual de alimentos vegetales por la población mundial ha provocado el aumento en la producción de los mismos. Así, paralelamente ha crecido la producción de residuos derivados de esta industria. Las peroxidasas han sido estudiadas arduamente durante muchos años, encontrando aplicaciones a las nuevas tecnologías emergentes, una de las peroxidasas más estudiadas es la peroxidasa de rábano de la cual se han hecho muchos estudios acerca de su conformación y aplicaciones. El uso de residuos de la agroindustria de diferentes fuentes vegetales representa una alternativa para aprovecharlos y utilizarlos como nuevas fuentes de peroxidasas abriendo el panorama para su estudio, desde estructura, funciones y aplicaciones.

5. Hipótesis

Utilizando peroxidasas extraídas a partir de diferentes fuentes vegetales, mostrarán un comportamiento similar con los sustratos propuestos para las reacciones de acoplamiento oxidativo realizadas con peroxidasa de rábano comercial.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Evaluar el comportamiento de peroxidasas encontradas en diferentes vegetales que pueden ser alternativas a la peroxidasa de rábano, para su uso en la reacción de acoplamiento oxidativo de compuestos fenólicos.

6.2 Objetivos particulares

- Obtención de extractos con actividad de peroxidasa a partir de diferentes fuentes (brócoli, caña de maíz, nopal, cebollín).
- Determinar mediante un ensayo de detección, el sustrato(s) más adecuado(s) (ácido ferúlico y vainillina) para su uso en las reacciones de acoplamiento oxidativo.
- Plantear una metodología para la extracción e identificación de los compuestos obtenidos.

7. Materiales y métodos

7.1 Diagrama general

El presente trabajo se dividió en 4 etapas principales las cuales se enumeran de forma general a continuación.

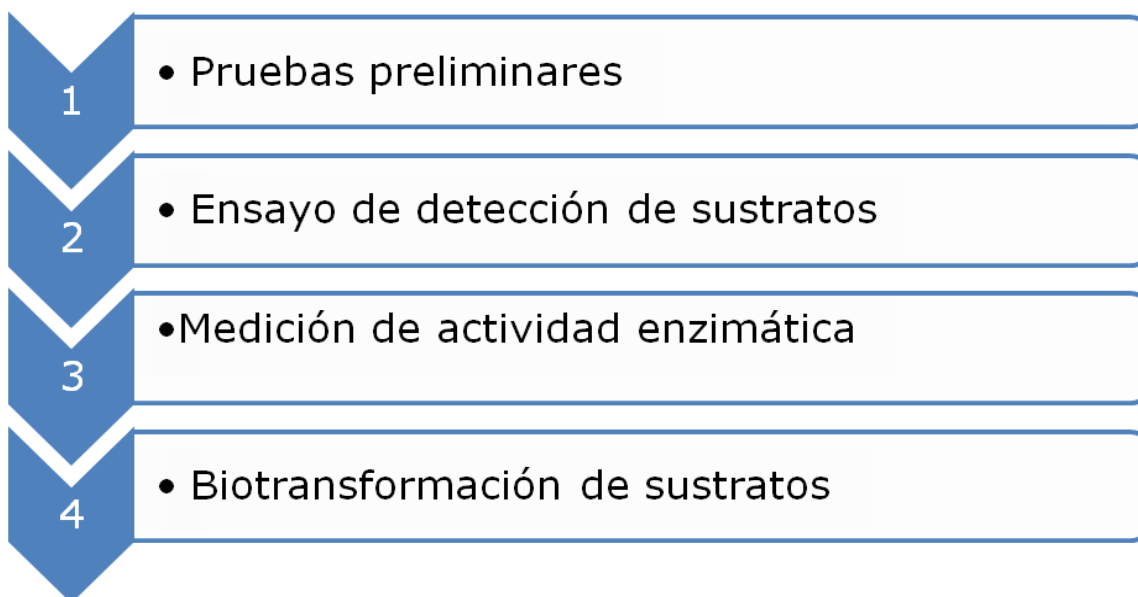


Figura 13. Diagrama general de etapas en las que se divide la metodología.

7.2 Reactivos y equipos

Los ácidos hidroxicinámicos utilizados (ácidos ferúlico, caféico, cumárico y sinápico) y las sales para preparación de buffer (K_2HPO_4/KH_2PO_4) fueron adquiridos en ALDRICH Chemistry. La vainillina fue adquirida en Química JVC. El guayacol y la bencidina se adquirieron en SIGMA. Los metil ésteres de ácidos hidroxicinámicos fueron sintetizados en la Facultad de Química Edificio E. Laboratorio 321. El acetato de etilo fue adquirido en VWR Internacional. La peroxidasa de rábano usada fue adquirida en SIGMA-ALDRICH con 167U/mg. De actividad El rotavapor usado es de marca BÜCHI R-205. El espectrofotómetro fue marca GBC-cintral.

7.3 Etapa 1. Pruebas preliminares

Las pruebas preliminares consistieron en la preparación del biocatalizador para después realizar la correspondiente selección de extractos a partir de la actividad cualitativa de peroxidasa.

7.3.1 Obtención del biocatalizador

El extracto se obtuvo licuando cada uno de los residuos orgánicos: tallos de brócoli (*Brassica oleracea L.*), hojas de sábila (*Aloe vera*), caña de maíz (*Zea mays*), espinas de nopal (*Opuntia sp.*), hojas de capulín (*Prunus serotina*), tallos de cebollín (*Allium schoenoprasum*), con buffer de acetatos 100mM pH 6.8 en una proporción 1:3 (parte sólida: buffer). El extracto se filtró a través de gasa en un embudo y se recibió en baño de hielo en un matraz de 1L; posteriormente se decoloró con carbón activado y se filtró al vacío con una cama de celita en embudo Büchner, recibiendo en un matraz de 1L en baño de hielo. El extracto se almacenó a 4°C.

7.3.2 Determinación cualitativa de actividad de peroxidasa

La determinación se realizó mediante la reacción colorida con guayacol y bencidina tomando como resultado positivo una coloración intensa rojo ladrillo y azul respectivamente. Este ensayo se realizó mezclando 0.5mL de la solución de bencidina/guayacol al 1% en etanol, 3mL de extracto del vegetal en el buffer de fosfatos y 1mL de peróxido de hidrógeno al 1% en un tubo de ensayo. Se esperó aproximadamente 5 segundos para la aparición de la coloración.

7.4 Etapa 2. Ensayo de detección de sustratos

El ensayo de detección de sustratos se realizó con dos diferentes metodologías, se realizó un ensayo con ácidos hidroxicinámicos y sus metil ésteres. El segundo ensayo se realizó con vainillina. Para así poder determinar los mejores sustratos a utilizar en las reacciones de acoplamiento oxidativo.

7.4.1 Ensayo con ácidos hidroxicinámicos y sus esteres.

Los sustratos utilizados fueron ácido ferúlico, caféico, cumárico y sinápico y los esteres de los mismos: metil ferulato, cafeato, cumarato y sinapato. Para la biotransformación se mezclaron 2mL de sustrato al 1% con 4mL de extracto en buffer de fosfatos y 1.5mL de peróxido de hidrógeno al 1% y 7.5mL de acetato de etilo en viales de 20mL. Se recolectaron fracciones de acetato de etilo (aproximadamente 1mL) de la reacción a los siguientes tiempos 10, 30 y 60 minutos y a las 24 horas de empezada la reacción.

Se llevó a cabo una prueba de cromatografía en capa fina para identificar si había compuestos de biotransformación, esto se hizo en cromatoplasmas de sílica-gel 60 con indicador de fluorescencia UV₂₅₄ con eluyente acetato de etilo: hexano en proporción 8:2 y se agregó 0.5mL de ácido acético concentrado. Como revelador se utilizó sulfato cérico. El criterio a seguir para comprobar que los sustratos habían sido biotransformados por las peroxidasas fue la aparición de señales con un Rf diferente al del sustrato.

7.4.2 Ensayo con vainillina.

El sustrato utilizado en este ensayo fue la vainillina. Se pesó 0.5g de sustrato (vainillina), se agregaron 50mL de agua destilada y se bajó hasta pH 4 con dos gotas de ácido acético concentrado. Se calentó hasta 40°C y se agregaron 150mL de extracto enzimático; finalmente se agregaron 3.7mL de H₂O₂ al 2%. Se dejó en reposo por un tiempo de 5-30 minutos. La aparición de un precipitado color crema indica una reacción positiva. Se filtró al vacío con embudo Büchner para la obtención de la fracción sólida. Se midió el rendimiento del crudo obtenido por diferencia de pesos.

7.5 Etapa 3. Medición de la actividad enzimática

La medición de actividad enzimática se llevó a cabo con dos ensayos a proporciones diferentes uno para las peroxidasas de brócoli, caña de maíz y

cebollín y otro para la peroxidasa de nopal. Para calcular la actividad específica se determinó la cantidad de proteína en los extractos.

7.5.1 Determinación de la actividad de peroxidasa

El ensayo de medición de actividad enzimática se llevo a cabo mediante la reacción colorida de oxidación del guayacol con las diferentes peroxidases en presencia de peróxido de hidrógeno.

7.5.1.1 Ensayo de medición enzimática para peroxidasa de brócoli, caña de maíz y cebollín.

Para este ensayo se mezclaron 1.4mL de buffer de fosfatos, 20µL de extracto de peroxidasa, 400µL de guayacol con concentración de 1% en etanol y 200 µL de H₂O₂ a diferentes concentraciones: 0.5%, 1%, 2%. La reacción se llevo a cabo en la celda de cuarzo. Se midió la absorbancia a 470nm en intervalos de 10 segundos durante un periodo de 4 minutos. En todos los casos se realizó un testigo (el cual no contenía enzima) y las muestras se analizaron por triplicado.

7.5.1.2 Ensayo de medición enzimática para la peroxidasa de nopal.

Para este ensayo se mezclaron 1.3mL de buffer de fosfatos, 400µL de extracto de nopal, 200µL de guayacol con concentración de 1% en etanol y 100 µL de H₂O₂ a diferentes concentraciones: 0.5%, 1%, 2%. La reacción se llevo a cabo en la celda de cuarzo. Se midió la absorbancia a 470nm en intervalos de 10 segundos durante un periodo de 4 minutos. En todos los casos se realizó un testigo (el cual no contenía enzima) y las muestras se analizaron por triplicado.

7.5.2 Determinación de proteína

Para calcular la concentración de proteína se utilizó el método de Bradford. El ensayo se realizó de acuerdo con las instrucciones descritas en el kit. Para la determinación de proteína en cada se mezclaron 1mL de extracto (el mililitro de el extracto llevó la dilución adecuada) con 1mL de reactivo de Bradford. Se dejó reaccionar por 5 minutos y se leyó la absorbancia a 595nm. La concentración de

proteína se determinó interpolando los datos obtenidos con la curva de calibración la cual se realizó tomando como patrón la albúmina y de acuerdo con las instrucciones descritas en el kit.

7.5.3 Determinación cuantitativa de la actividad de peroxidasa.

A partir de las absorbancias obtenidas de la determinación de actividad de peroxidasa se calculó la concentración del producto basándose en la ley de Lambert-Beer:

$A = (\varepsilon)(b)(c)$ Donde A es absorbancia, ε es el coeficiente de extinción molar ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$), b es el ancho de la celda (cm) y c es la concentración del producto. Para el caso del guayacol el coeficiente de extinción molar de de $26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

La actividad enzimática (expresada en μmol de producto formado $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}$ de enzima⁻¹) se obtuvo a partir de la pendiente la cual se calcula graficando la parte lineal de las absorbancias medidas contra el tiempo. Por lo que el cálculo se realizó con base en la expresión:

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{\Delta DO}{\Delta t} * \frac{1}{\varepsilon} * \frac{\text{Vol}_{\text{ens}}}{\text{Vol}_{\text{enz}}} * \text{dil}$$

Donde $(\Delta DO)/(\Delta t)$ es la variación de la densidad óptica en el tiempo, ε e el coeficiente de extinción molar, Vol_{ens} es el volumen de aforo del ensayo, Vol_{enz} es el volumen de enzima usado y dil es la dilución usada.

Para el cálculo de la actividad enzimática específica se expresó como la actividad enzimática (U)/concentración de proteína (mg de proteína $\cdot \text{mL}^{-1}$ de enzima).

7.6 Etapa 4. Biotransformación de sustratos

En la biotransformación de sustratos se verificó el resultado de la reacción frente a diferentes concentraciones de peróxido. Con las concentraciones de peróxido fijadas, se escaló los ensayos del detección de sustratos para la obtención de los productos de las reacciones de acoplamiento oxidativo. El crudo de reacción se

purificó para ser analizado mediante RMN. Se obtuvieron los espectros correspondientes y se analizaron.

7.6.1 Comportamiento frente a distintas concentraciones de H₂O₂

Las reacciones se llevaron a cabo variando las concentraciones de peróxido de hidrógeno y usando ácido ferúlico como sustrato. El ensayo se llevo a cabo bajo las mismas condiciones que en la preselección de sustratos (Punto 7.3.1) solamente haciendo variación de las concentraciones de peróxido de hidrógeno. Las concentraciones usadas fueron 0.5%, 1% y 2%. Las reacciones se detuvieron a los 60 minutos y se monitoreo a través de cromatoplasas con eluyente acetato de etilo: hexano en proporción 8:2 y se agrego 0.5mL de acido acético concentrado. Como revelador se utilizó sulfato cérico.

Se realizó otra evaluación del comportamiento del sustrato frente a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno pero usando como sustrato la vainillina. Se mezclaron 0.25g de vainillina y 25mL de agua destilada en un vaso de precipitado de 50mL se llevo a pH 4 y se calentó a 40°C. Se traslado la reacción a un matraz de 250mL y se agregaron 75mL de extracto de peroxidasa y 1.87mL de peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones, 0.5%, 1% y 2%. Se monitoreo la reacción disolviendo en metanol con 2 gotas de acido acético concentrado y eluyendo con hexano: acetato de etilo: cloruro de metileno proporción 2:3:5.

7.6.2 Reacción de acoplamiento oxidativo 1.

El ensayo se llevo a cabo mezclando 20mL de ácido ferúlico al 1%, 40mL de extracto de peroxidasa de las diferentes fuentes seleccionadas además de la peroxidasa de rábano comercial, 15mL de peróxido de hidrógeno al 1% y 75mL de acetato de etilo en un matraz de 250mL. Se tomaron muestras a los 10, 20 y 60 minutos para verificar que se efectuara la biotransformación por placa cromatográfica. El acetato de etilo se separo de la mezcla de reacción en embudo de separación y se filtro para posteriormente evaporar en rotavapor en un matraz bola de 250mL. Se recuperó con acetona y se evaporó en un transcurso de dos

días en cámara de vacío a temperatura ambiente para la obtención de la fracción sólida. Se realizó una placa cromatográfica para revisar el resultado de la reacción con eluyente acetato de etilo: hexano en proporción 8:2 y se agregó 0.5mL de ácido acético concentrado.

7.6.2.1 Purificación del crudo de la reacción de acoplamiento oxidativo 1.

El crudo de la reacción obtenido se purificó por columna cromatográfica, se pesaron 0.2069g de crudo mezclándose con 1g de celita. La columna se montó con sílica-gel 60 en polvo y se eluyó con 1000mL de acetato de etilo: hexano en proporción 8:2 y se agregó 0.5mL de ácido acético por cada 10mL de eluyente. Se recolectaron fracciones de aproximadamente 1mL en tubos de ensayo. Posteriormente se realizó una placa cromatográfica a cada una de las fracciones para verificar la separación de los compuestos. Las fracciones con una separación adecuada fueron enviadas para su caracterización en resonancia magnética nuclear (RMN).

7.6.3 Reacción de acoplamiento oxidativo 2.

Para la reacción de acoplamiento oxidativo 2 se pesó 1g de vainillina y se mezclaron con 100mL de agua destilada en un vaso de precipitado de 150mL. Se bajó el pH a 4 con dos gotas de ácido acético concentrado y se calentó a 40°C. Se trasladó la mezcla a un matraz de 500mL y se agregaron 300mL de extracto enzimático de las diferentes fuentes seleccionadas (paralelamente se usó la peroxidasa de rábano comercial) y 7.5mL de peróxido de hidrógeno al 2%. Se esperó de 5 a 30min y se filtró al vacío para la obtención del precipitado. Se verificó la reacción diluyendo el precipitado en metanol con 2 gotas de ácido acético concentrado y eluyendo con hexano: acetato de etilo: cloruro de metileno proporción 2:3:5.

7.6.3.1 Purificación del crudo de la reacción de acoplamiento oxidativo 2.

El crudo de la reacción de acoplamiento oxidativo 2 se purificó redisolviendo en la mínima cantidad de metanol con 2 gotas de ácido acético concentrado. La fracción disuelta se evaporó a temperatura ambiente sometida a cámara de vacío. Una vez evaporado el disolvente las muestras fueron enviadas para su caracterización en Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

7.6.4 Caracterización de los compuestos purificados de las reacciones de acoplamiento oxidativo 1 y 2.

La caracterización de los compuestos se llevo a cabo a través de resonancia magnética nuclear (RMN) de H^1 y C^{13} . Las muestras de las reacciones acoplamiento oxidativo 1 y 2 se llevaron a cabo en el equipo de marca VARIAN modelo VNMRS de 400Mz de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química. Los valores de desplazamiento químico son expresados en ppm con respecto al tetrametilsilicio (TMS) usado como referencia. Los disolventes usados fueron cloroformo deuterado ($CDCl_3$) para las reacciones de acoplamiento oxidativo 1 y dimetilsulfóxido deuterado (DMSO) para las reacciones de acoplamiento oxidativo 2.

8. Resultados y discusión

8.1 Etapa 1. Pruebas preliminares.

Las pruebas preliminares se realizaron para la obtención de los extractos con los que se trabajaría y determinar las mejores fuentes vegetales de peroxidasas.

8.1.1 Obtención del catalizador.

La materia prima para el biocatalizador fue obtenida en mercados locales cerca de Ciudad Universitaria para brócoli, cebollín y nopal, las cañas de maíz fueron obtenidas en un plantío de maíz en la delegación de Milpa Alta. La materia prima debía contar con la característica de ser comercialmente fresca, es decir, que se encuentre en su madurez comercial la cual se determina de diferente manera para cada vegetal. El criterio empleado en este trabajo fue que ninguna de los desechos empleados en la elaboración del biocatalizador tuviera algún tipo de degradación de clorofila (cambio de color verde a amarillo), daños por frío o daños mecánicos.

Se reporta que la presencia de peroxidasas en las plantas depende de la etapa de crecimiento del vegetal. Así, en el caso del rábano, la presencia de peroxidasas es mayor durante los primeros días de almacenamiento es por eso que los daños mecánicos y por hidrólisis de carbohidratos afectan menos la planta en esta etapa (Wang y col. 2000).

8.1.2 Determinación cualitativa de actividad de peroxidasa.

Mediante un ensayo cualitativo de identificación de presencia de peroxidasa a partir de bencidina y guayacol, se realizó una diferenciación entre las fuentes de peroxidadas con las que se contaba. El parámetro tomado para la elección de las fuentes de peroxidadas para este trabajo fue la aparición intensa y casi instantánea del color azul en caso de bencidina o café/rojo ladrillo en el caso de guayacol. Estos indicadores son los clásicos utilizados para la determinación cualitativa de actividad de peroxidasa.

Se han reportado ensayos de detección de fuentes de peroxidadas derivadas de residuos agrícolas post-cosecha, se estudiaron desechos (tallos y hojas) de cardo, lenteja, guisante, garbanzo, frijol mantequilla, girasol entre otros. Se realizaron mediciones de actividad cuantitativa con guayacol así como parámetros cinéticos. De todas las fuentes probadas el extracto del rastrojo de lenteja fue el que mostró mayor actividad de peroxidasa incluso mayor que la peroxidasa de rábano (Hidalgo-Cuadrado y col. 2012).

Las fuentes vegetales utilizadas han sido estudiadas previamente para determinar su comportamiento cinético, caracterización y purificación para las peroxidadas de brócoli, nopal y sábila (Duarte-Vázquez y col. 2007, Khales y Baaziz. 2005, Sabe y col. 1993) o la presencia de peroxidasa en diferentes etapas fisiológicas de la planta de cebolla o maíz (Córdoba-Pedregosa y col. 2003, Mika y col. 2009). Del capulín no se han reportado estudios de comportamiento en general y el cebollín sólo se ha estudiado el efecto de aditivos en el comportamiento cinético, la mayoría de los estudios han sido efectuados con base a la cebolla.

La presencia de peroxidasa se atribuye principalmente al tipo de tejidos que se estudien, los cuales son tallos para el caso de brócoli, caña de maíz y cebollín. La presencia de la enzima peroxidasa en las fuentes seleccionadas puede estar directamente relacionada con una de las funciones que desempeña dentro de las células, que es la síntesis de lignina vía radicales libres. Este biopolímero contiene alrededor de 10-20% de grupos hidroxilo fenólicos que le confieren rigidez a la

pared celular de las plantas y además las protege del ataque de organismos patógenos. La mayor parte de la lignina se encuentra entremezclada con las hemicelulosas y formando una matriz que rodea las ordenadas microfibrillas de celulosa. (Dávila y Vázquez, 2006).

Las peroxidasas también tienen influencia en el catabolismo de la auxina pues actúan en la descarboxilación del ácido indolacético. El ácido indolacético es responsable de la elongación y la proliferación celular, se asocia con los tejidos en intensa división, especialmente en: meristemas apicales de tallos y raíces, hojas jóvenes y frutos en desarrollo. Las peroxidasas están presentes en tejidos meristemales; en el caso de las espinas de nopal se espera que exista un alto contenido de peroxidasas debido a que es fuente de tejido meristemal, a partir de los meristemas, en lugar de brotes nuevos, crecen las espinas (Khales y Baaziz. 2005). A continuación se presentan el resultado de la reacción con los extractos utilizados.

Tabla 2. Evaluación de la actividad de peroxidasa en diferentes extractos.

Fuentes del extracto	Reacción con	
	Guayacol	Bencidina
Tallos de brócoli	Positivo	Positivo
Hojas de sábila	Negativo	Negativo
Espinas de nopal	Positivo	Positivo
Hojas de capulín	Negativo	Negativo
Tallos de cebollín	Positivo	Positivo
Caña de maíz	Positivo	Positivo

De acuerdo con la tabla 2 las fuentes de peroxidasas elegidas para seguir con la experimentación fue: tallos de brócoli, espinas de nopal, caña de maíz y tallos de cebollín. Las fuentes descartadas fueron hojas de sábila y capulín.

Es importante puntualizar que en los extractos elegidos no sólo influye un solo tipo de peroxidasa, los tejidos vegetales están compuestos por muchos tipos de células, sin embargo, están especializados por lo que se espera que también cuenten con peroxidasas predominantes del tejido que se esté utilizando.

8.2 Etapa 2. Ensayo de detección de sustratos.

El ensayo de detección de sustratos se realizó para observar la especificidad de las diferentes peroxidasas frente a los sustratos, también para seleccionar cual era el más adecuado para las siguientes determinaciones. Se utilizaron dos diferente metodologías de obtención de los productos de las reacciones de acoplamiento oxidativo. Las reacciones fueron monitoreadas a través de cromatografía en capa fina. Un Rf diferente al sustrato indica una biotransformación.

8.2.1 Ensayo con ácidos hidroxicinámicos y sus ésteres.

Para esta etapa, se utilizaron ácidos hidroxicinámicos y ésteres de los mismos. La búsqueda de sustratos afines a las peroxidasas se ha desarrollado desde hace mucho tiempo, se han reportado como sustratos afines a estas enzimas los ácido fluorogénicos (ácido [3-hidroxifenil] propionico, alcohol *p*-hidroxifenetil, *p*-etilfenol, 3-[*p*-hidroxifenil] propanol, *p*-*n*-propilfenol, y ácido *p*-hidroxifenil láctico). El sustrato que resultó más adecuado fue el ácido propionico; la actividad de peroxidasa cuantitativa también fue medida para este caso (Zaitsu y Ohkura. 1980).

Los ácidos hidroxicinámicos son compuestos centrales en la síntesis de polifenoles mediante la vía del ácido shikímico. Además de esto se encuentran de manera abundante como constituyentes de la pared celular. Se tiene especial

interés ya que son compuestos bioactivos por tener naturaleza antioxidante y precursores de aromas. Cuando los ácidos hidroxicinámicos son esterificados esto aumenta su lipofilidad haciendo más amplia su aplicación como antioxidantes.

Los derivados de ácidos hidroxicinámicos son ampliamente estudiados por sus propiedades y porque son constituyentes de diferentes compuestos. Así se ha identificado a los derivados de ácidos hidroxicinámicos unidos covalentemente en una matriz compleja como la suberina, la cual es un biopolímero constituyente de la pared celular de células especializadas cumpliendo funciones de barrera impermeable para el almacenamiento de agua (Bernards y col. 1995).

Debido a la naturaleza fenólica de los derivados de ácidos hidroxicinámicos se han estudiado sus aplicaciones. Se reporta para los complejos formados a partir de ácido caféico (el más efectivo) y otros derivados de ácidos sinápico y ferúlico la capacidad para inhibir la oxidación de lipoproteínas humanas de baja densidad, las cuales están relacionadas con enfermedades como la arteriosclerosis (Nardini y col. 1995).

En la figura 14 se muestran las estructuras de todos los compuestos utilizados.

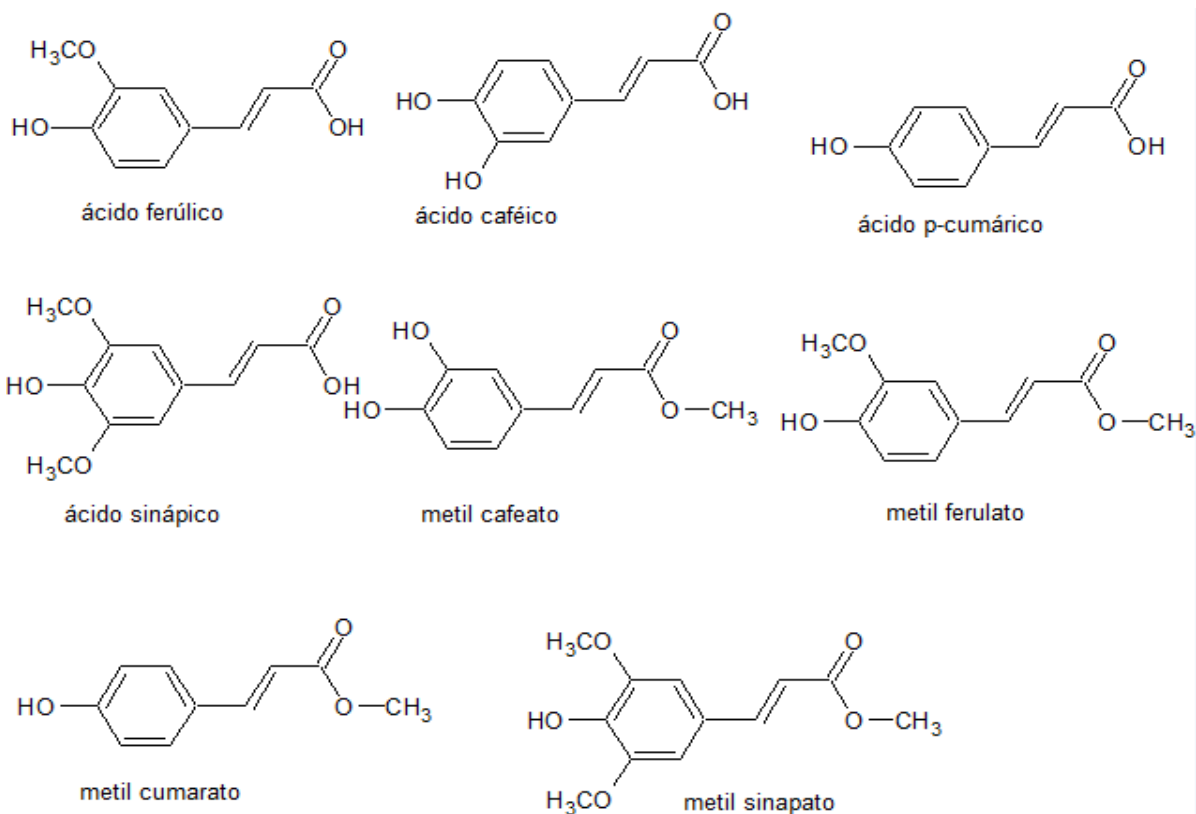


Figura 14. Estructuras de los compuestos utilizados en la preselección de sustratos.

En casi todas las reacciones probadas hubo cierto grado de bioconversión, el parámetro tomado para hacer esta afirmación fue con base en los productos obtenidos identificados por cromatografía en capa fina, si el producto de la reacción mostraba un R_f diferente al mostrado por el control (el cual era el sustrato sin biotransformar) es indicio de una biotransformación, las cuales están encerradas en círculos azules. A continuación se muestran las placas cromatográficas para los diferentes sustratos y peroxidasa. Para cada cromatoplaça los señalamientos corresponden a: C.- sustrato si biotrasformar, 10.- muestra a los 10min, 30.- muestra a los 30min, 60.- toma de muestra a los 60min y 24.- toma de muestra a las 24hrs.

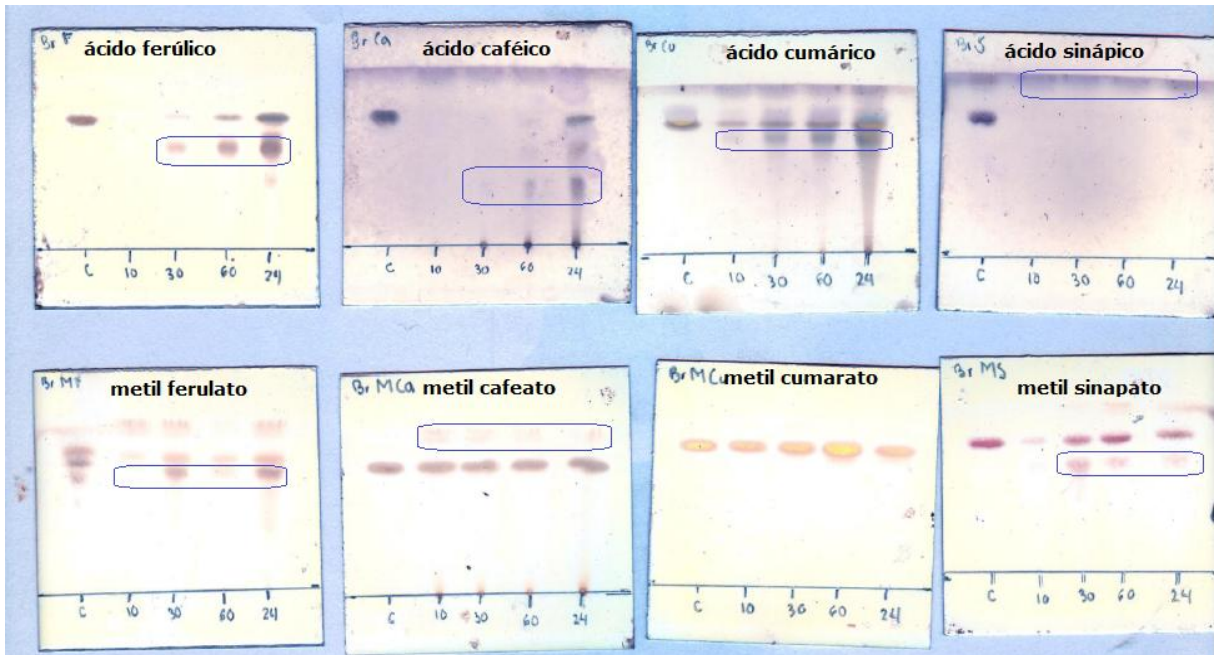


Figura 15. Resultado de las biotransformaciones con peroxidasa de brócoli.

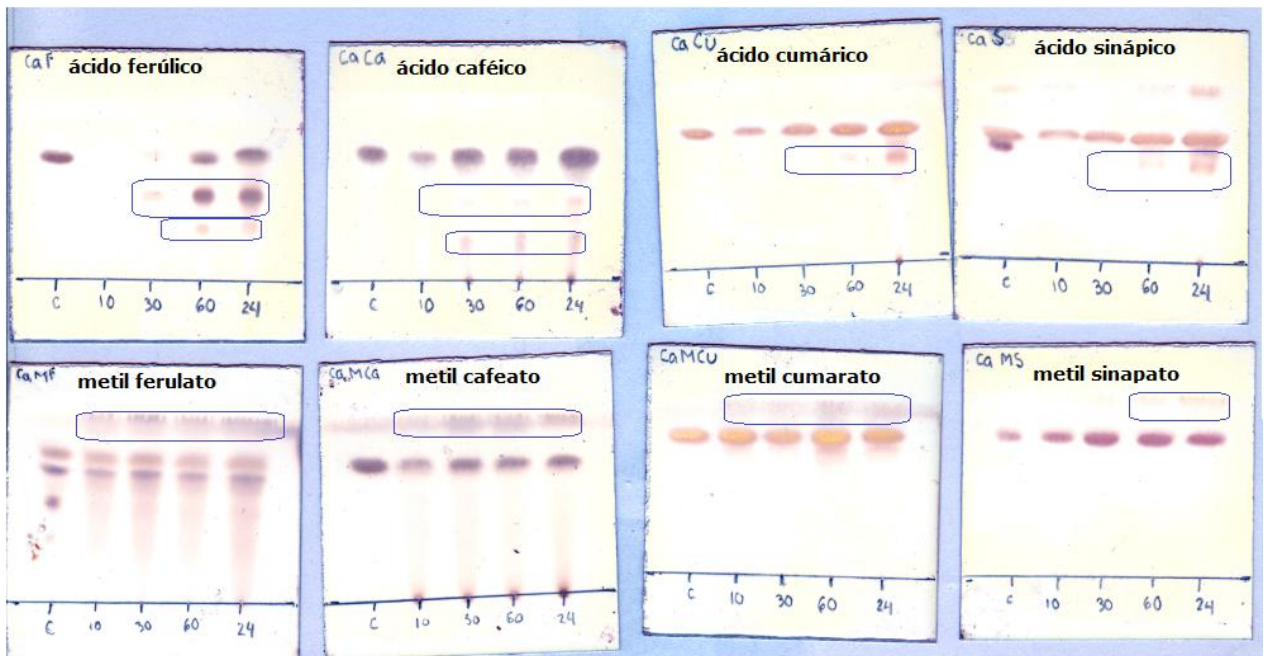


Figura 16. Resultado de las biotransformaciones con peroxidasa de caña de maíz.

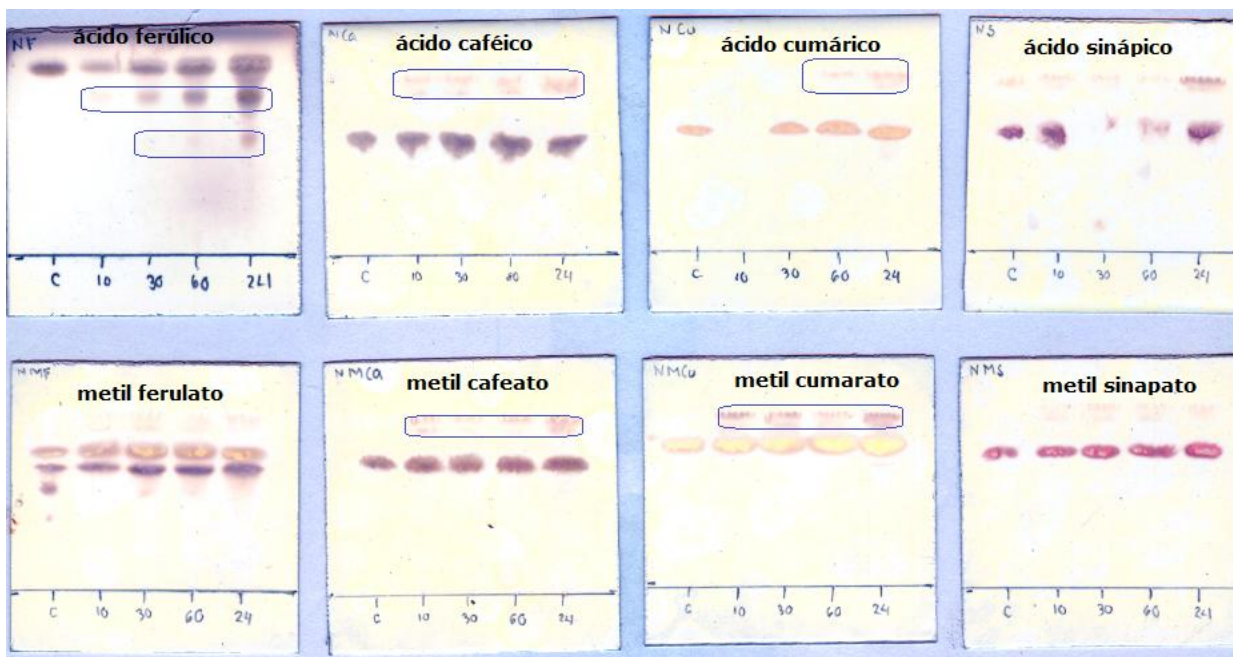


Figura 17. Resultado de las biotransformaciones con peroxidasa de nopal.

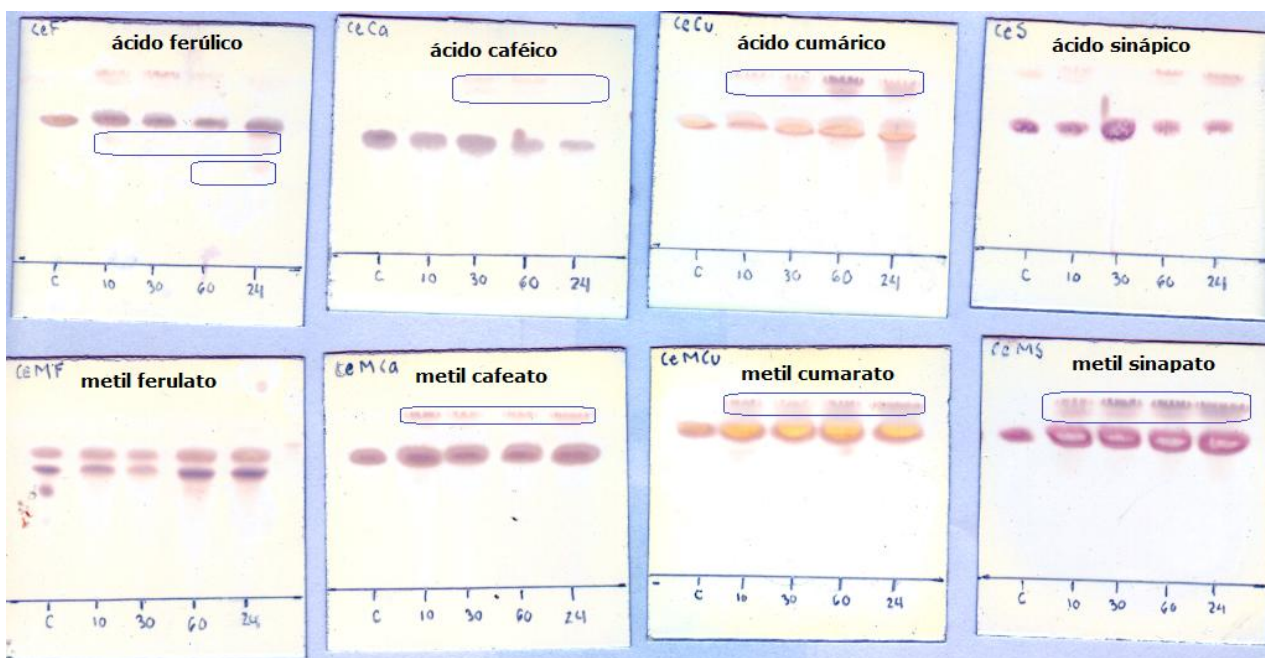


Figura 18. Resultado de las biotransformaciones con peroxidasa de cebollín.

De manera general se observan biotransformaciones con señales por debajo del control, lo que indica la formación de sustratos de diferente grado de polimerización, esto se puede observar claramente en las reacciones con ácido ferúlico, las cuales muestran en las placas para las peroxidasas utilizadas, señales por debajo del control. El grado de biotransformación no puede ser identificado con cromatoplasmas pero da información acerca de la naturaleza de los compuestos obtenidos. También se muestran señales por arriba del control, indicando una biotransformación donde pudo haber descarboxilación de las moléculas provocando un peso molecular más bajo que el control y por lo tanto son más fácilmente arrastrados por el eluyente elegido, este comportamiento se muestra más frecuente en este experimento para los metil ésteres de los ácidos hidroxicinámicos con todas las peroxidasas elegidas.

Los sustratos reportados en la literatura para las peroxidasas son los ácidos hidroxicinámicos utilizados en este trabajo (Schomburg y Schomburg, 2006), también se utilizaron los metil ésteres de los mismos ácidos; no obstante los sustratos no son reportados para el mismo tipo de peroxidasas por lo que se puede decir que las peroxidasas utilizadas no serán especialmente específicas por todos los sustratos. La especificidad que muestra las enzimas dependerá de las isoformas presentes, pues un grupo de peroxidasas puede comportarse similar para una misma reacción, las isoenzimas aisladas tienen un comportamiento cinético y fisicoquímico diferente entre sí. (Shannon y col. 1965). Al ser un extracto crudo de los biocatalizadores con los que se trabajó, se espera que se tengan isoformas distintas por lo que la afinidad por los productos puede variar de una fuente de peroxidasa a otra. Sin embargo, debido a su naturaleza (superfamilia III clase III) no se espera que la afinidad por los sustratos entre las diferentes peroxidasas sea muy desigual, esto se puede ver en las figuras 15-18 donde las cromatoplasmas son muy parecidas entre sí.

El sustrato elegido para trabajar en las siguientes pruebas fue el ácido ferúlico, esto fue debido al comportamiento registrado ante la biotransformación (cromatoplasmas) mostrando la síntesis de dos compuestos con una separación

adecuada, los productos obtenidos fueron similar en todas las fuentes de las peroxidases, además es uno de los compuestos más abundante en la pared celular en las plantas (Sindhu y Emilia. 2004) por lo que las peroxidases podrán mostrar una mayor afinidad.

8.2.2 Ensayo con vainillina.

Anteriormente la identificación de productos en el ensayo con ácidos hidroxicinámicos y sus metil ésteres se realizó mediante la prueba de cromatografía en capa fina. En este ensayo el parámetro de identificación de producto fue la aparición de precipitado después de la reacción.

La metodología empleada para la obtención del precipitado de vainillina fue el reportado en Nishimura y col. 2010. El interés en la vainillina es debido a su uso como saborizante siendo objeto de estudio en las biotransformaciones los últimos años (Rimko y col. 2009). A continuación se muestra la estructura química de la vainillina.

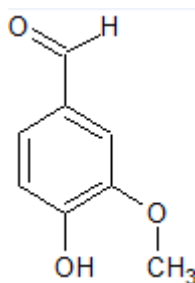


Figura 19. Estructura química de la vainillina.

El parámetro tomado para comprobar que se llevó a cabo la biotransformación fue la obtención de precipitado después de ciertos minutos de la adición del extracto enzimático. Con todas las peroxidases se obtuvo un cierto grado de bioconversión con diferente cantidad de precipitado obtenido. Debido a los resultados obtenidos, se decidió usar también la vainillina como sustrato para las biotransformaciones posteriores principalmente por la nueva metodología empleada para la obtención del producto.

8.3 Medición de la actividad enzimática.

La medición de actividad enzimática se realizó a través de la reacción colorida con guayacol, midiendo a 470nm es posible hacer la cuantificación de actividad. Se usaron diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno para evaluar el comportamiento de las peroxidasas usadas. Con la determinación de proteína fue posible calcular la actividad específica.

Es necesario saber la medición de la actividad enzimática, pues muestra la capacidad de la enzima para transformar un sustrato; así, la actividad enzimática se expresa como la cantidad de sustrato transformado por unidad de tiempo, teniendo en cuenta el volumen de la reacción. Además, los estudios de peroxidasas usualmente incluyen la medición de actividad enzimática.

Para uniformizar el reporte de actividad se utilizan las unidades de actividad enzimática (U) las cuales se definen como la cantidad de micromoles de sustrato convertido por minuto. Otra unidad utilizada es la actividad específica la cual se refiere a la actividad enzimática (U) por cantidad de proteína usualmente en miligramos de proteína. Existen muchas maneras de monitorear la actividad enzimática, para este trabajo se utilizó el método colorimétrico. El donador de electrones más popular para realizar este ensayo es el guayacol, el cual es oxidado a un complejo coloreado llamado tetraguayacol, su velocidad de formación ha sido usado como parámetro para la medición de actividad enzimática de peroxidasa, a través de lecturas espectrofotométricas de las absorbancias en relación con el tiempo.

El comportamiento cinético de la peroxidasa es del tipo bisustrato (por tener al peróxido de hidrógeno y el sustrato donador de electrones), a este comportamiento se le ha llamado mecanismo ping-pong.

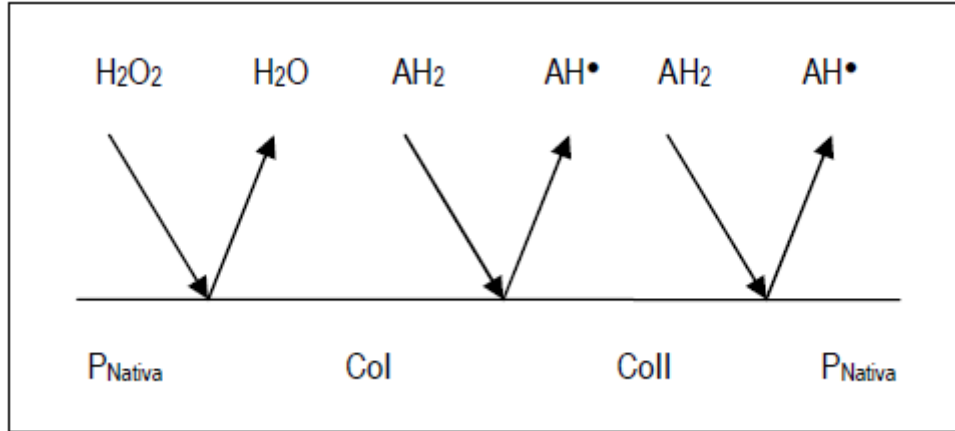


Figura 20. Esquema del mecanismo ping-pong de la peroxidasa.

La manera como funciona este mecanismo es cuando la enzima toma una forma intermediaria (Col y Coll) dando productos en cada una de estas fases. Sólo cuando ha sido liberado el producto de cada una de estas fases puede entrar el próximo sustrato para ser transformado. Y cada uno de los sustratos participa para que la enzima regrese a su estado nativo.

En este trabajo se realizó la medición de la actividad específica de las fuentes vegetales de peroxidasas seleccionadas en las pruebas preliminares. Obteniéndose diferentes comportamientos.

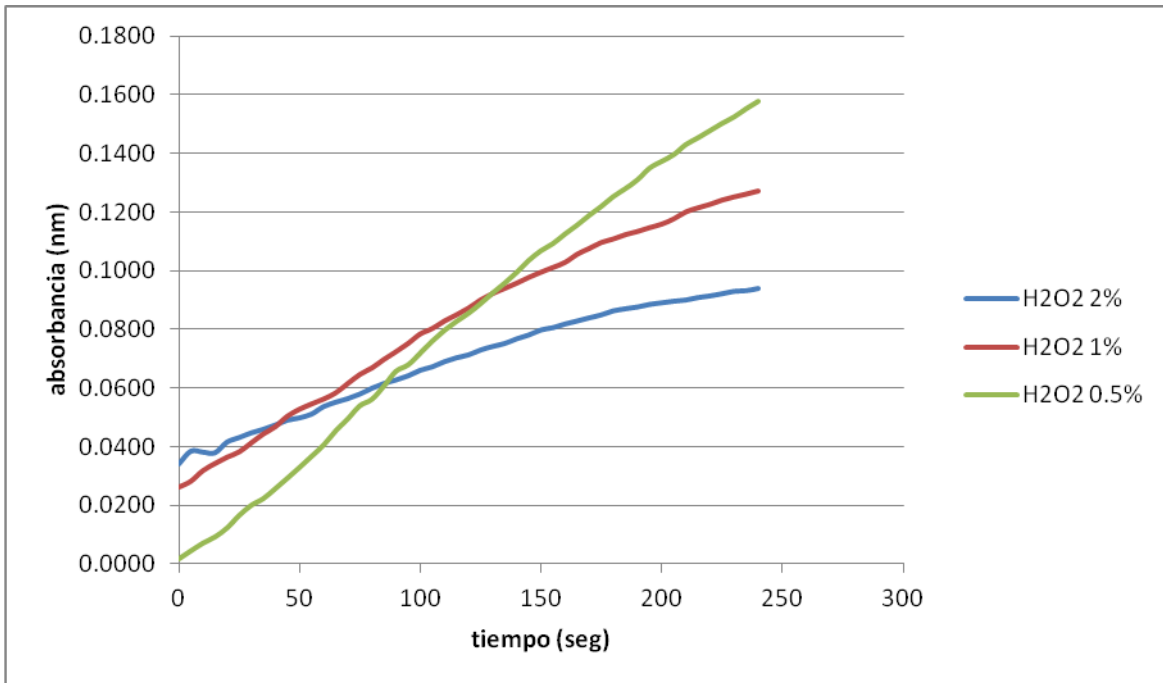


Gráfico 1. Actividad enzimática de peroxidasa en brócoli.

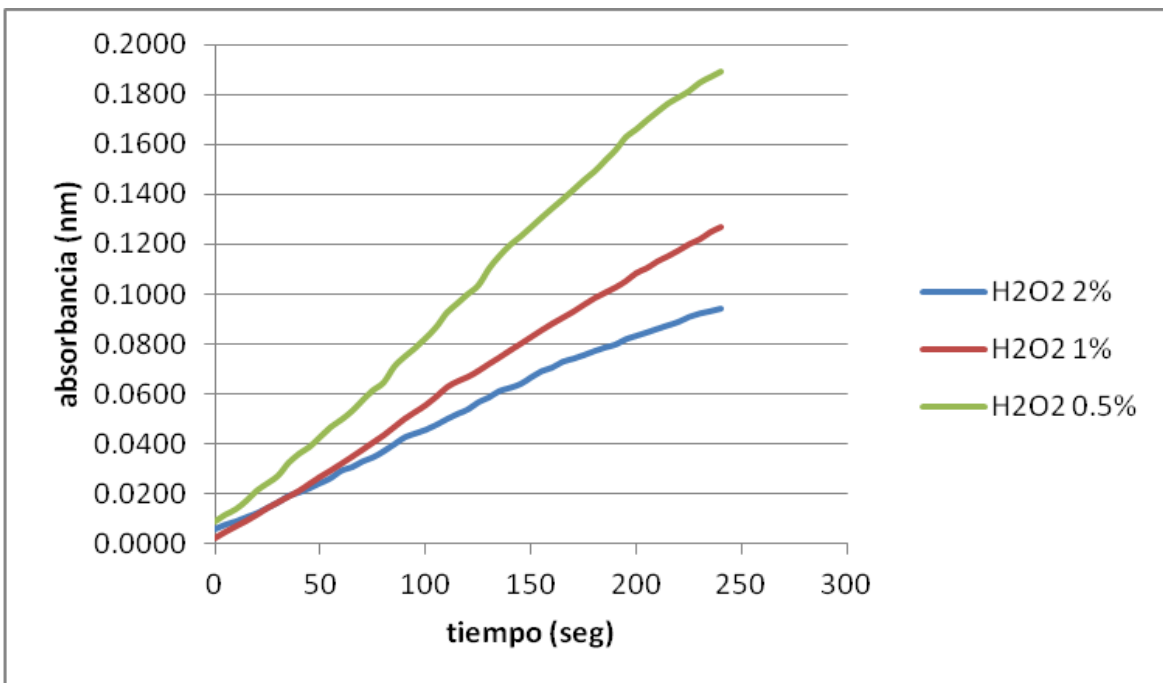


Gráfico 2. Actividad enzimática de peroxidasa en caña de maíz.

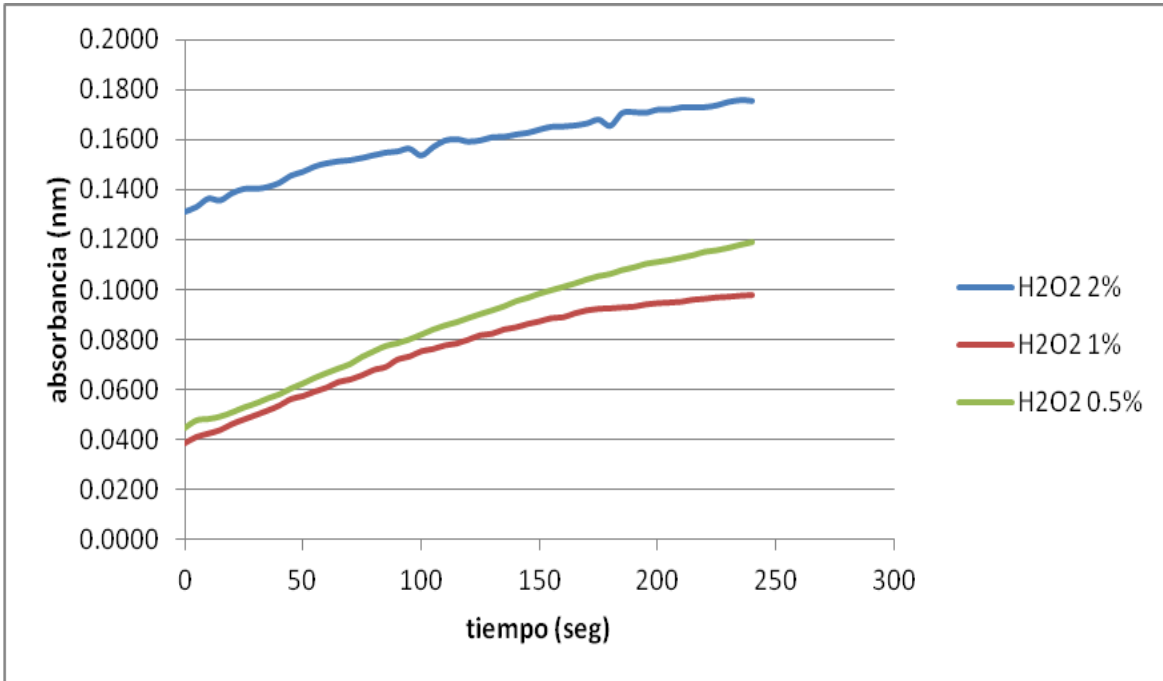


Gráfico 3. Actividad enzimática de peroxidasa en nopal.

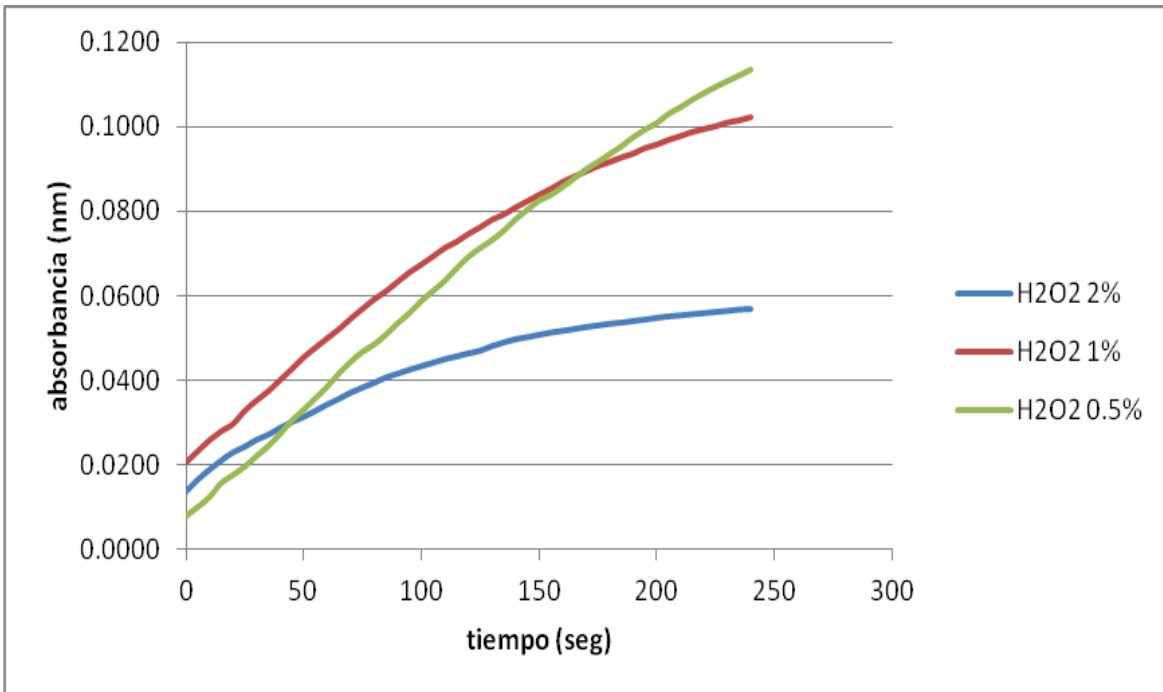


Gráfico 4. Actividad enzimática de peroxidasa en cebollín.

De manera general se observa un comportamiento similar entre las peroxidases provenientes de brócoli, caña de maíz y cebollín, esto es, una disminución en la absorbancia conforme se aumenta la concentración de peróxido de hidrógeno. Este comportamiento ha sido reportado estudiando las vías de inactivación de la enzima (Baynton y col. 1994). Se pueden llevar a cabo dos diferentes rutas, una reversible y otra irreversible. A concentraciones bajas de peróxido (cerca de 1.0mM en ausencia de donador de electrones) se presenta la inactivación reversible donde el equilibrio se inclina hacia la formación de un compuesto III el cual es inerte. A concentraciones mayores a 1.0mM se da la ruta irreversible con la formación del compuesto IV o P670.

Las concentraciones molares usadas para este trabajo fueron mayores a las reportadas para la reacción reversible por lo que se espera que haya cierto grado de conversión de peroxidasa a P670, es por eso que entre mayor sea la concentración de peróxido de hidrógeno usado, este tendrá efecto en la absorbancia registrada para el cálculo de la actividad enzimática. La peroxidasa que no muestra este comportamiento es la peroxidasa de nopal la cual, registra la mayor actividad a una concentración de 2% de peróxido de hidrógeno. Está registrado que el uso de guayacol como indicador de actividad enzimática en nopales no es la mejor opción (Khales y Baaziz. 2005), esto es debido a que la peroxidasa de nopal no muestra tanta afinidad por el guayacol como otras peroxidases de otras fuentes. Un sustrato más adecuado a usar es el 4-cloro-1-naftol.

A partir de la medición de absorbancia se determinó la actividad enzimática y la actividad específica de las peroxidases. La constante de acoplamiento utilizada fue la reportada en Córdoba-Pedregosa y col. 2005 con un valor de $26.6\text{mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. A continuación se muestran los valores de la actividad enzimática.

Tabla 3. Actividad enzimática

Fuente de peroxidasa	Concentración de H ₂ O ₂ (%)		
	0.5 (0.21M)	1 (0.41M)	2 (0.82M)
Brócoli	3.189	0.228	0.136
Caña de maíz	0.364	0.228	0.182
Nopal	0.003	0.003	0.003
Cebollín	0.227	0.227	0.137

(U, μmol de producto formado* min^{-1} * mL extracto de enzima $^{-1}$) para las diferentes peroxidadas.

Los valores de actividad enzimática son diferentes entre cada peroxidasa y entre cada concentración de peróxido de hidrógeno. La concentración usada que presenta cierta similitud es para H₂O₂ al 1% con las peroxidadas de brócoli, caña de maíz y cebollín. El nopal mostró el mismo comportamiento para las tres concentraciones de H₂O₂ usadas. A continuación se presentan los valores de actividad específica.

Tabla 4. Actividad específica

Fuente de peroxidasa	Concentración de H ₂ O ₂ (%)		
	0.5 (0.21M)	1 (0.41M)	2 (0.82M)
Brócoli	16.042	1.146	0.697
Caña de maíz	2.153	1.345	1.076
Nopal	0.004	0.004	0.004
Cebollín	0.512	0.512	0.307

(U/mg proteína) para las diferentes peroxidases.

Como se observa en los valores de actividad de peroxidasa, esta varía de acuerdo con la concentración de peróxido de hidrógeno; por lo que para hacer una comparación exacta de las actividades enzimáticas con las reportadas en la literatura es necesario el uso de las mismas concentraciones de H₂O₂ sin embargo se reportan con guayacol las siguientes actividades:

- Se reporta una actividad de 278.6 μmol/min*100g de peso fresco en los tallos de brócoli usando una concentración de 0.3% de H₂O₂ (Murcia y col. 2000) el valor equivalente en unidades en este trabajo es de 956.76 μmol/min*100g de peso fresco en tallos, con una concentración de 0.5%, se observa una disminución en la actividad teórica como la concentración de peróxido de hidrógeno fue mayor a la reportada teóricamente esta disminución puede deberse al estado de maduración del brócoli sin embargo no fue evaluada en ninguno de los dos trabajos por lo que puede haber otros factores que influyan.

- Se reporta una actividad de 13372nmol/min*g de peso fresco para las raíces del maíz con una concentración usada de 8.8mM de H₂O₂ (Mika y col. 2009) contra un valor de 1092nmol/min*g de peso fresco en la caña de maíz con una concentración de 0.21M. Se observa un mayor valor en el valor teórico reportado atribuyéndose tanto a la concentración de peróxido de hidrógeno usada como al tipo de tejido donde se evaluó la actividad de peroxidasa.
- Se reporta una actividad de 0.71µmol/ min*mg de proteína para nopales usando una concentración de 2% de peróxido de hidrógeno (Sánchez-Carvajal, 2008). La actividad obtenida en este trabajo fue de 0.004 µmol/ min*mg de proteína con una concentración de 2% de H₂O₂. A pesar de usar la misma concentración de peróxido la actividad en este trabajo es menor, es reportado (Sánchez-Carvajal, 2008) que el tipo de nopal influirá en la actividad de peroxidasa.
- Se reporta una actividad de 298.2nmol/min*mg de proteína en raíces de cebollas usando una concentración de 0.3% de peróxido de hidrógeno (Córdoba-Pedregosa y col. 2005) contra un valor equivalente en unidades de 512nmol/min*mg de proteína con una concentración de peróxido de hidrógeno al 0.5%. La actividad de peroxidasa en este caso se hizo en comparación con la cebolla ya que no se cuentan con datos de cinética para el cebollín.

8.4 Etapa 4. Biotransformación de sustratos.

La biotransformación de sustratos se llevo a cabo fijando la concentración de peróxido de hidrógeno a través de reacciones de acoplamiento oxidativo con diferentes concentraciones. Después ser realizó el escalamiento para la obtención del crudo de la reacción el cual fue purificado y analizado a través de resonancia magnética nuclear.

8.4.1 Comportamiento frente a distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno.

Debido al comportamiento mostrado ante las cinéticas con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno se efectuaron las reacciones de biotransformación de sustratos igualmente haciendo una variación en las concentraciones de peróxido. A continuación se muestran los resultados del monitoreo de las reacciones de acoplamiento oxidativo 1 (con ácido ferúlico) a través de cromatoplasmas.



Figura 21. Biotransformación con ácido ferúlico a diferentes concentraciones de H₂O₂.
Donde: C.- Control (sustrato sin biotransformar), 1.- H₂O₂ 0.5%, 2.- H₂O₂ 1%, 3.- H₂O₂ 2%.

Como se puede ver en la figura 21 el ensayo con nopal no se efectuó debido a los problemas que presenta la presencia del mucílago de nopal para efectuar la biotransformación. Se puede observar que el R_f de los productos obtenidos no es diferente para las diferentes concentraciones de H₂O₂ usadas por lo que se decidió seguir usando la misma concentración usada en la preselección de sustratos. A continuación se muestran las cromatoplasmas para las reacciones de acoplamiento oxidativo 2 (ensayo con vainillina).

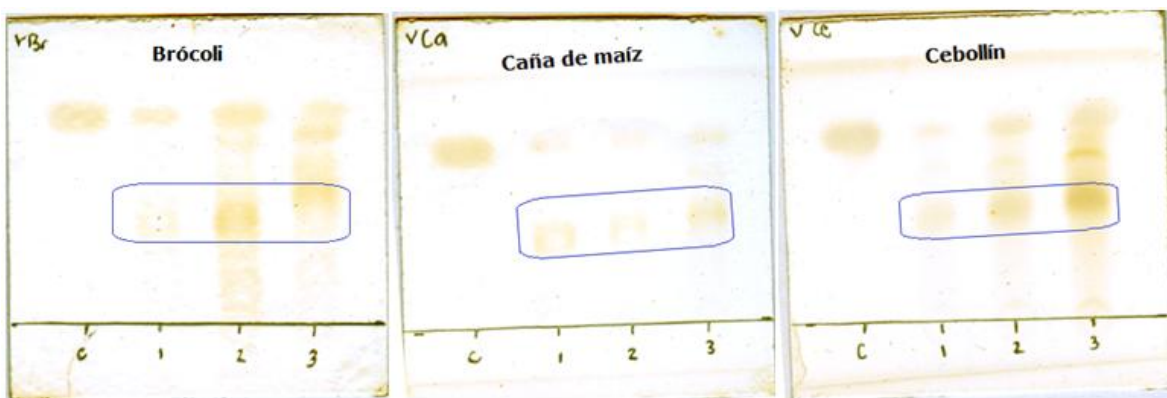


Figura 22. Biotransformación con vainillina a diferentes concentraciones de H_2O_2 . Donde:
 C.- Control (sustrato sin biotransformar), 1.- H_2O_2 0.5%, 2.- H_2O_2 1%, 3.- H_2O_2 2%.

También para este ensayo se decidió omitir la prueba con peroxidasa de nopal. Como se observa en la figura 22 el comportamiento de las peroxidases usando una concentración de peróxido de hidrógeno de 0.5% y 1% es similar sin embargo, el Rf para 2% es ligeramente mayor. Se puede decir que la concentración de peróxido de hidrógeno tiene influencia en el producto obtenido por lo que decidió seguir usando la concentración de 2% para las reacciones posteriores.

8.4.2 Reacciones de acoplamiento oxidativo.

Una vez fijadas las concentraciones de peróxido de hidrógeno a usar. Se realizó el escalamiento de la reacción de acoplamiento oxidativo 1 (con ácido ferúlico). A continuación se muestra la placa cromatográfica con el monitoreo de la reacción.

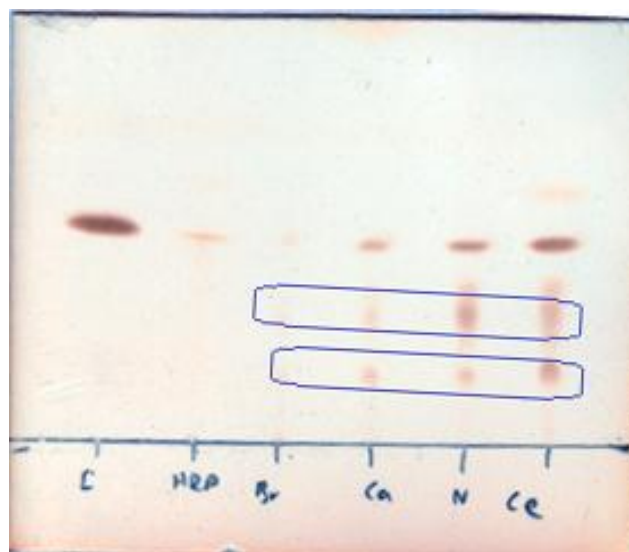


Figura 23. Biotransformaciones con ácido ferúlico, donde C.- control (sustrato sin biotransformación), HRP.- peroxidasa de rábano comercial, Br.- brócoli, Ca.- caña de maíz, N.- nopal, Ce.- cebollín.

La separación del compuesto biotransformado se llevó a cabo con acetato de etilo, con la finalidad separar al producto de interés a la fase no polar para después recuperarlo por evaporación. En la figura 23 se puede ver la formación de dos productos, aunque la afinidad de la peroxidasa de rábano no parece ser igual a las otras peroxidases pues no muestra señal de biotransformación en la cromatografía, como ya se había dicho anteriormente debido a la deslocalización que se da cuando se generan los radicales libres puede haber generación de diferentes productos para el ácido ferúlico. La prueba con nopal se llevo a cabo simplemente para ver si el producto obtenido era análogo a los productos de las demás peroxidases. Los rendimientos obtenidos del crudo para esta reacción fueron:

Tabla 5. Rendimiento de la biotransformación del ácido ferúlico con las diferentes peroxidadas

Fuente de peroxidasa	Rendimiento (%)
Tallos de brócoli	85.14
Caña de maíz	79.06
Nopal	72.11
Tallos de cebollín	92.09

Los rendimientos en crudo son difícilmente reportados, es más común el reporte de los productos purificados, así se reporta un rendimiento del 30% para la obtención de dilactona a partir de ácido ferúlico con peroxidasa de nopal (Sánchez-Carvajal, 2008) y rendimientos del 25% para la obtención de derivados de ésteres de metil ferulato (Rosazza y col. 1995).

Se realizó el escalamiento de la reacción d acoplamiento oxidativo 2 (con vainillina). A continuación se muestra la cromatoplaca con el monitoreo de la reacción.

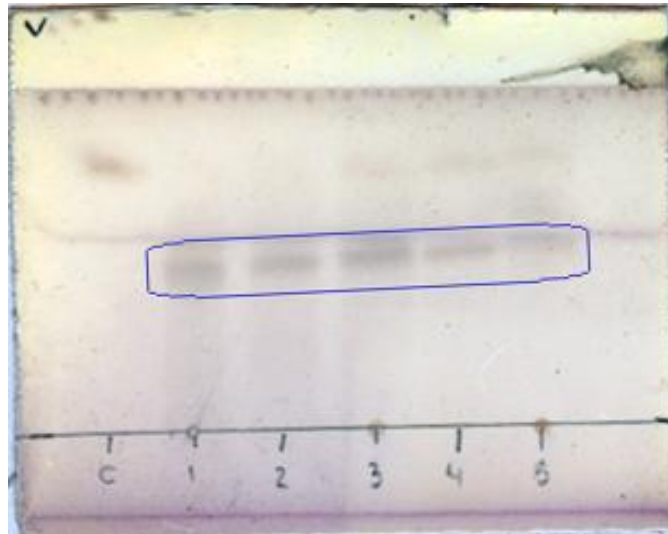


Figura 24. Biotransformaciones con vainillina, donde C.- control (sustrato sin biotransformación), 1.- peroxidasa de rábano comercial, 2.- brócoli, 3.- caña de maíz, 4.- nopal, 5.- cebollín.

Observando la figura 24 se muestra la gran afinidad de las peroxidasas de diferentes fuentes por la vainillina, mostrando la síntesis de un solo producto. Se tomó como referencia el producto dado por la peroxidasa de rábano, se puede ver que existe una gran especificidad al sustrato para todas las peroxidasas incluyendo, igualmente, la peroxidasa de nopal para verificar la afinidad por el sustrato.

Se reportan rendimientos del 80- 95% para la obtención de divainillina (Nishimura y col. 2010). A continuación se presentan los rendimientos obtenidos para las fuentes de peroxidasas usadas.

Tabla 6. Rendimientos para biotransformación de vainillina con peroxidadas.

Fuente de peroxidasa	Rendimiento (%)
Tallos de brócoli	99.46
Caña de maíz	98.39
Nopal	3.09
Tallos de cebollín	99.44

De acuerdo con los rendimientos obtenidos, la única peroxidasa que no obtuvo el rendimiento esperado fue la de nopal. Esto debido a que el tratamiento usado para la obtención del biocatalizador no incluía la eliminación del mucílago. Esto pudo alterar la reacción de las peroxidadas con la vainillina y la obtención del producto. Con los crudos obtenidos se realizó una purificación para su análisis.

8.4.3 Caracterización de los productos purificados de las reacciones de acoplamiento oxidativo.

Para poder ser caracterizados los crudos de las reacciones fueron previamente purificados, para la reacción de acoplamiento oxidativo 1 (con ácido ferúlico) la purificación se hizo mediante una columna cromatográfica con las condiciones previamente descritas en la metodología. En la reacción de acoplamiento oxidativo 2 (con vainillina) la purificación se realizó redisolviendo en metanol ácido para la obtención de la fracción sólida por evaporación.

A partir de la purificación de los productos crudos de las reacciones de acoplamiento oxidativo 1 y 2 fue posible llevar a cabo su análisis mediante resonancia magnética nuclear.

Para la reacción de acoplamiento oxidativo 1 (con ácido ferúlico) se muestra el espectro previamente reportado (Aguilar-Alonso, 2007) con el cual se comparó (figura 25) y el espectro para la purificación del crudo de la biotransformación con peroxidasa de brócoli (figura 26), se realizó sólo la purificación del producto con peroxidasa de brócoli debido al comportamiento mostrado en las cromatoplasmas, teniendo un Rf equivalente con las otras peroxidases por lo que, los compuestos obtenidos en la purificación de peroxidasa de brócoli también serán equivalentes para las peroxidases de caña de maíz y cebollín.

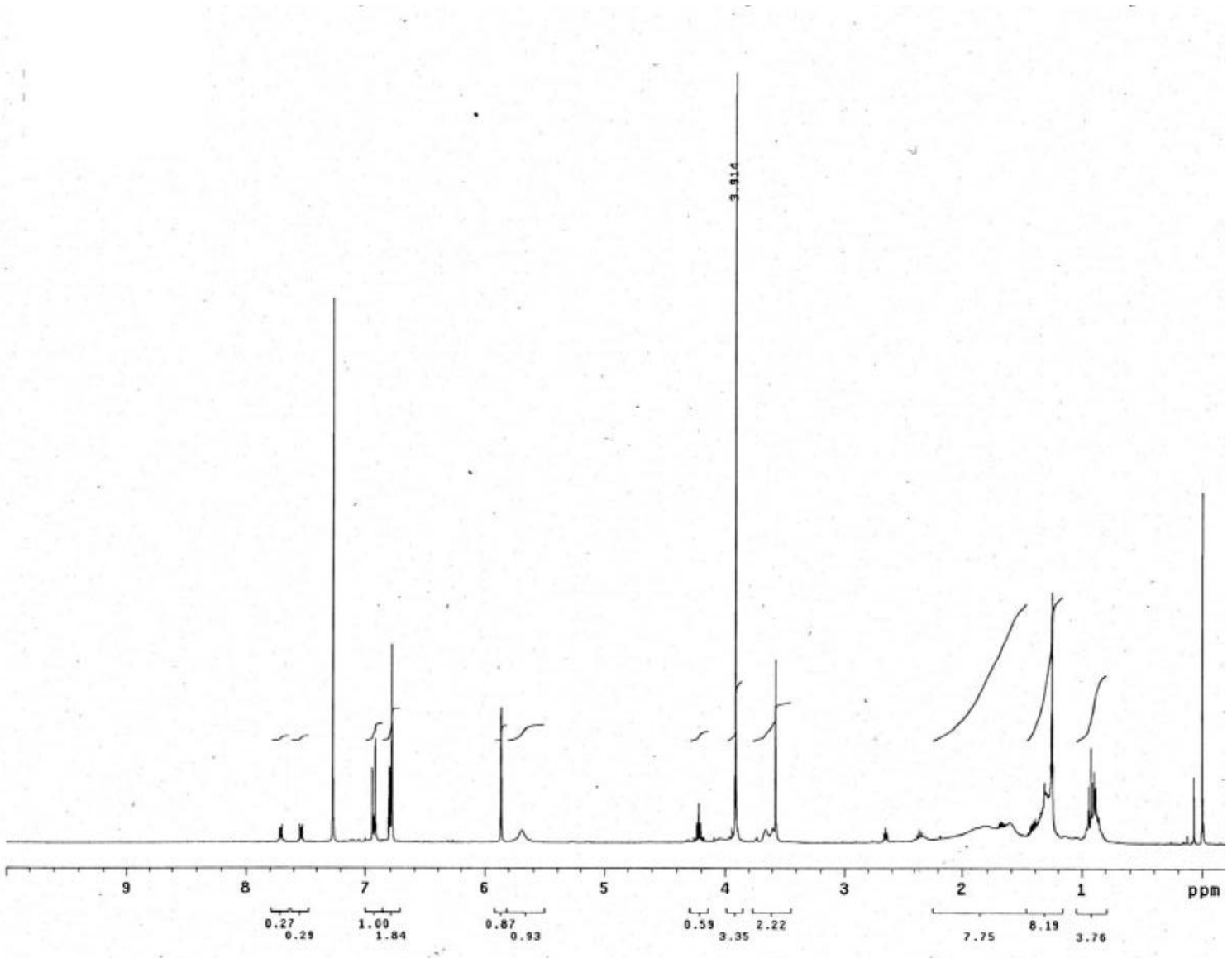


Figura 25. Espectro RMN ácido 8-8' difenilico reportado en Aguilar-Alonso, (2007).

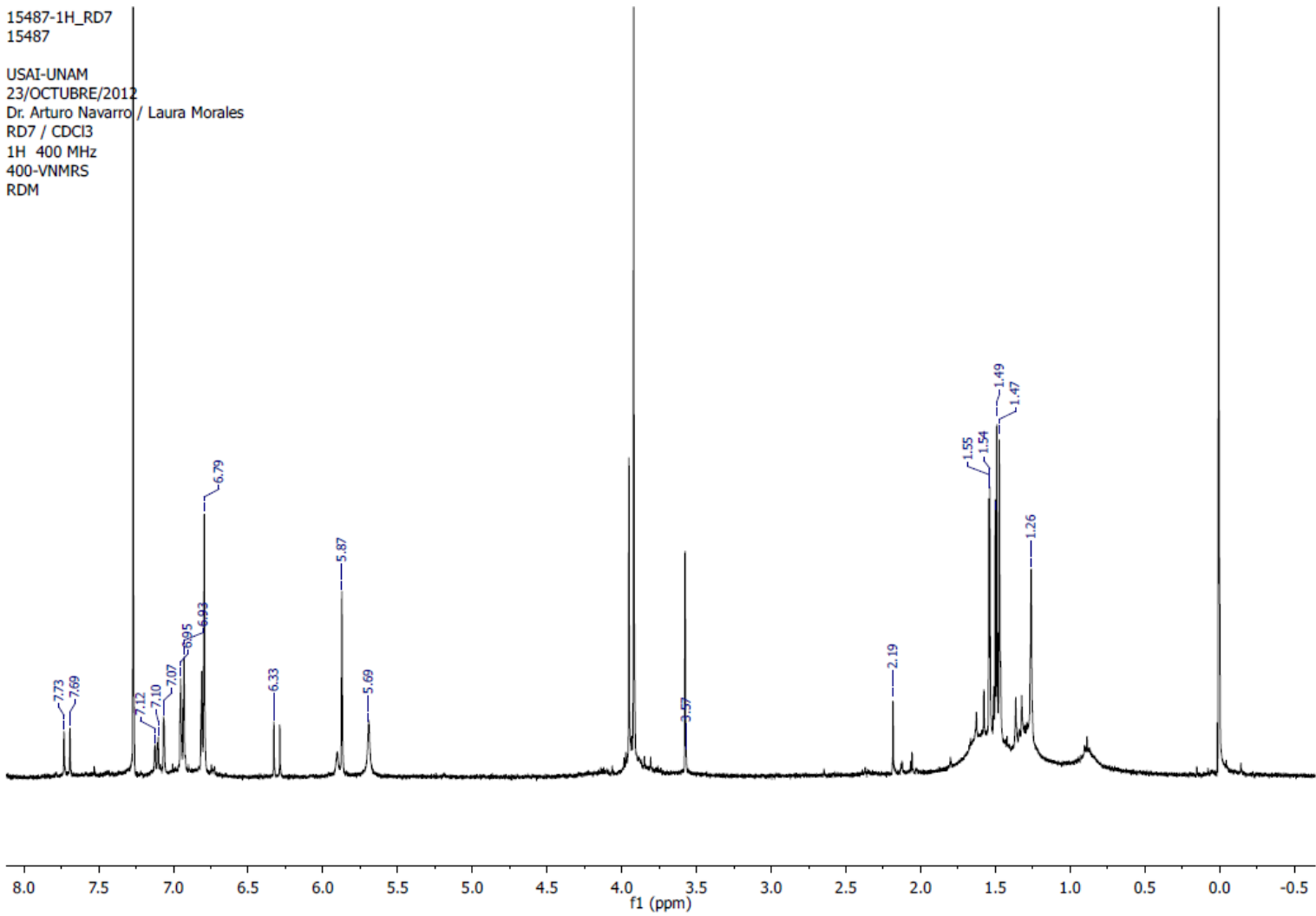


Figura 26. Espectro RMN de purificación del ácido ferúlico

Haciendo una comparación de las señales principales entre el espectro del presente trabajo y con trabajos anteriores (Aguilar-Alonso, 2007) se define como producto obtenido el ácido 8-8' diferúlico, el cual cuenta con la siguiente estructura:

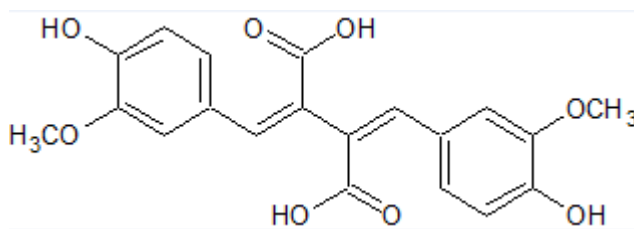


Figura 27. Estructura del ácido 8-8' diferúlico.

También se analizó el crudo obtenido de las reacciones de acoplamiento oxidativo de ácido ferúlico con peroxidasas de brócoli, caña de maíz y cebollín con el objetivo de comparar la tendencia de señales principales en cada uno de los crudos. En los tres espectros se observa una similitud de las señales principales para las tres peroxidasas (anexo 1).

Para la reacción de acoplamiento oxidativo 2 (con vainillina) se analizaron los productos purificados de las tres peroxidasas utilizadas (brócoli, caña de maíz y cebollín). Se realizó la comparación con el espectro que se reporta para la divainillina (JECFA, 2008) observando una concordancia con las señales. A continuación se muestra el espectro de la divainillina sintetizada con peroxidasa de caña de maíz.

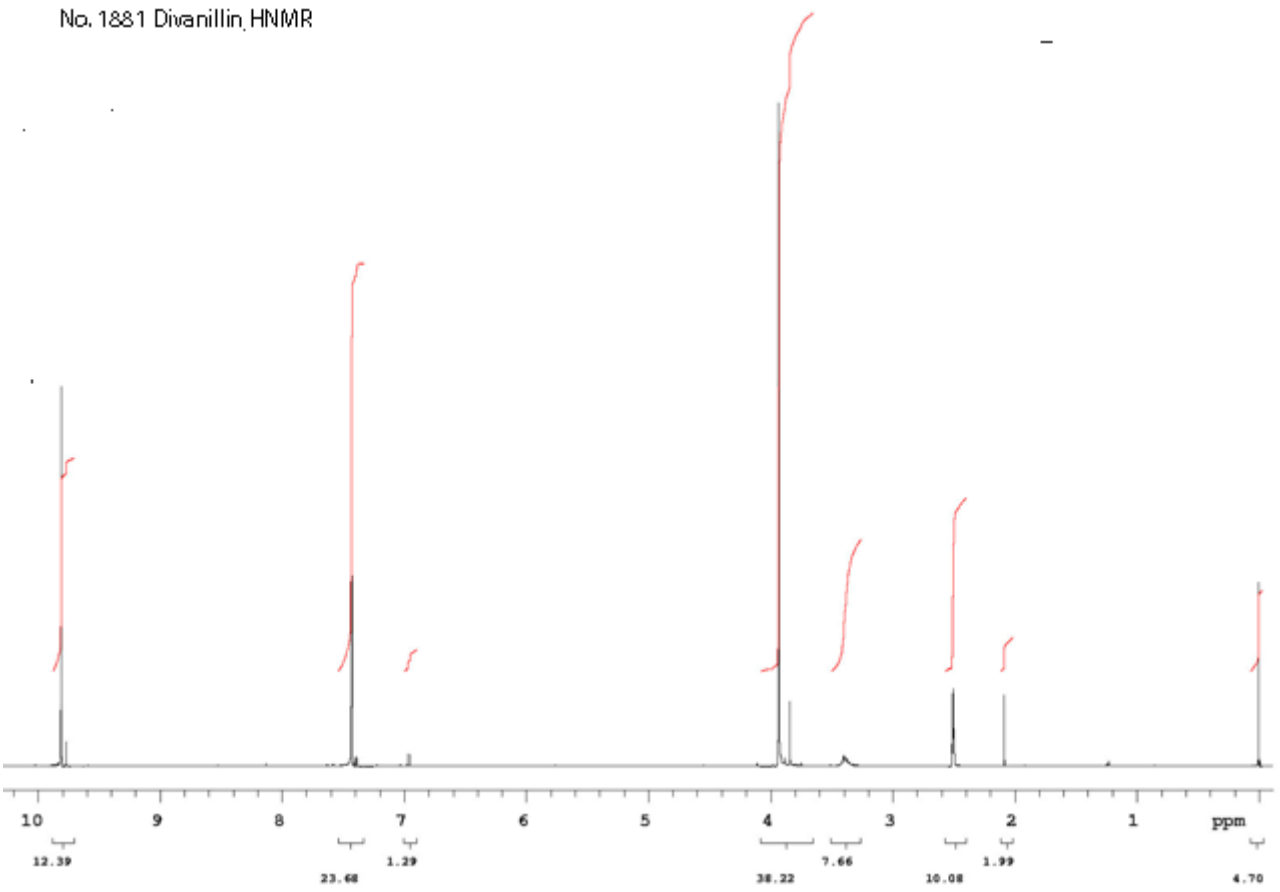


Figura 28. Espectro RMN de divainilina (JECFA, 2008).

15380-1H_RD2
15380

USAI-UNAM
10/OCTUBRE/2012
Dr. Arturo Navarro / Laura Morales
RD2 / DMSO-d6
1H 400 MHz
400-VNMRS
RDM

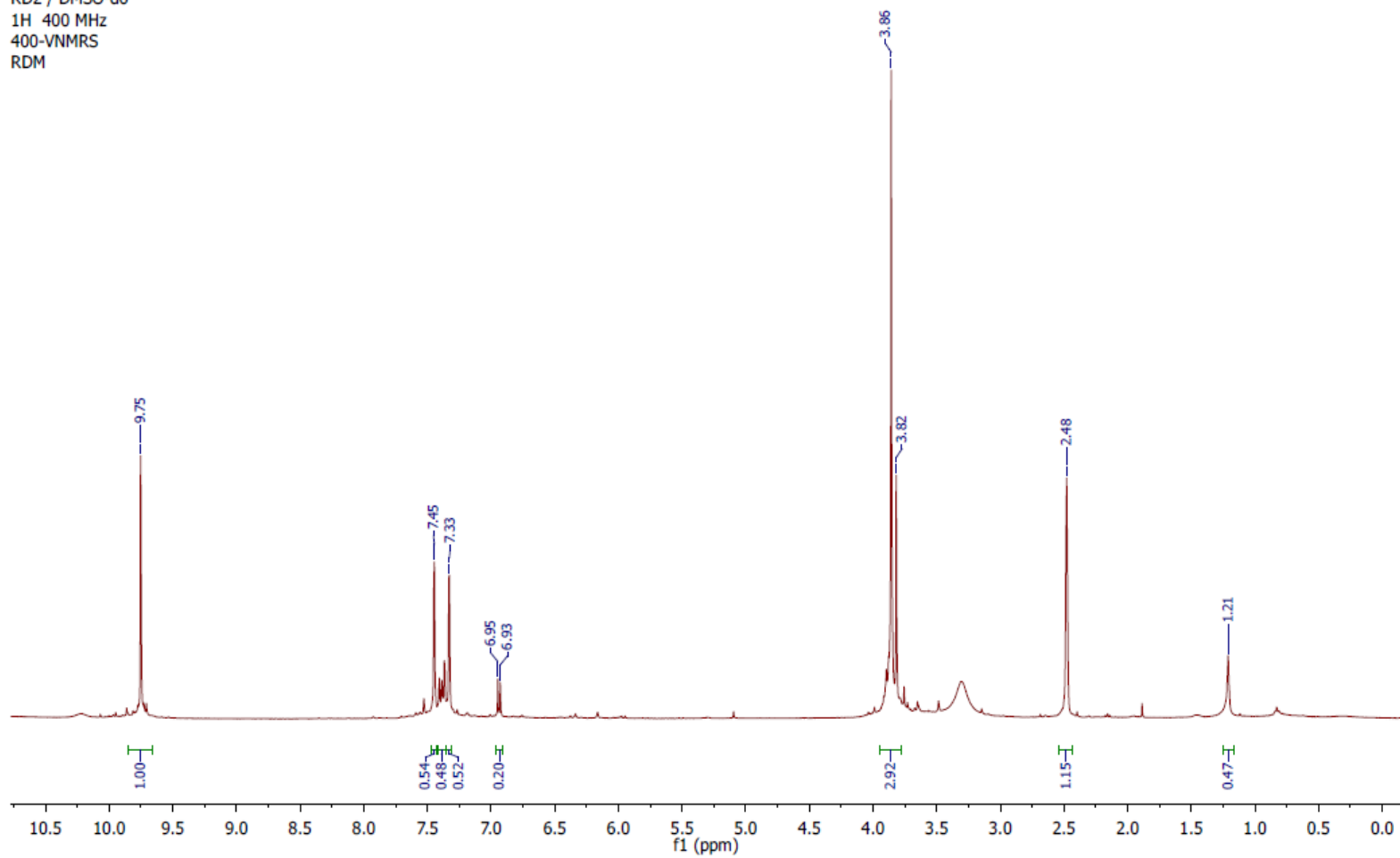


Figura 29. Espectro RMN de purificación de vainillina

El producto sintetizado por la reacción de acoplamiento oxidativo 2 fue la divainillina mostrándose su estructura a continuación.

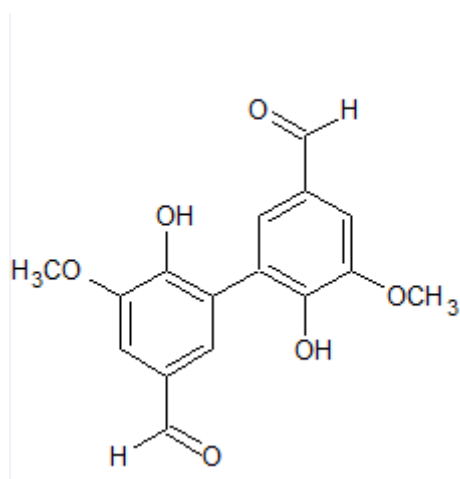


Figura 30. Estructura de la divainillina.

9. Conclusiones

Los extractos de brócoli, caña de maíz, nopal y cebollín fueron los elegidos por su actividad cualitativa de peroxidasa.

A partir de un ensayo de detección de sustratos se determinaron los más adecuados para su uso en el acoplamiento oxidativo: ácido ferúlico y vainillina.

Los valores obtenidos de actividad enzimática específica fueron diferentes para cada una de las peroxidasas. Se observó un comportamiento de reducción en la actividad conforme se aumentaba la concentración de peróxido de hidrógeno.

Se fijó en 1% la concentración de peróxido de hidrógeno para la reacciones de acoplamiento oxidativo con ácido ferúlico y en 2% para la reacción con vainillina.

Los productos obtenidos a partir de las reacciones de acoplamiento oxidativo con las peroxidasas utilizadas provenientes de brócoli, caña de maíz, nopal y cebolla resultaron ser equivalentes.

Los productos obtenidos con las distintas peroxidasas fueron los mismos que los obtenidos a partir de peroxidasa de rábano comercial para la vainillina. Siendo diferente para el ácido ferúlico donde los productos obtenidos con peroxidasa de rábano comercial fueron diferentes.

El producto obtenido en la reacción de acoplamiento oxidativo con ácido ferúlico fue el ácido 8-8' diferulico y en la reacción de acoplamiento oxidativo con vainillina fue la divainillina.

10. Bibliografía

Aguilar-Alonso, F. A., 2007, Purificación, Caracterización y Aplicación de la Peroxidasa Obtenida a Partir de un Residuo Generado Durante el Procesamiento del Nopal, Tesis de licenciatura, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Alonso-Calderón, A. I., Pérez-Curiel, J., Montiel-Salinas, C., Geissler, G., Zayas-Pérez M. T., Villegas-Rosas, M. L., 2008, Eliminación de fenol, 2-clorofenol y colorantes en aguas artificialmente contaminadas y aguas residuales textiles utilizando la peroxidasa de chayote, *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, Vol. 4 (2), p.278 -284.

Amarasekara, A. S., Razzaq, A., 2012, Vanillin-Based Polymers part II: Synthesis of Schiff Base Polymers of Divanillin and Their Chelation with Metal Ions, *Polymer Science*, Vol. 2012, p. 1-5.

Baynton, K. J., Bewtra, J. K., Biswas, Nihar, B., Taylor, K. E., 1994, Inactivation of horseradish peroxidase by phenol and hydrogen peroxide: a kinetic investigation, *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1206, p. 272-278.

Bernards, M. A., López, M., Zajcek, J., Lewis, N. G., 1995, Hydroxycinnamic Acid-derived Polymers Constitute the Polyaromatic Domain of Suberin, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 270 (13), p. 7382-7386.

Burr, S. J., Fry, S. C., 2009, Feruloylated Arabinoxylans Are Oxidatively Cross-Linked by Extracellular Maize Peroxidase but Not by Horseradish Peroxidase, *Molecular Plant*, Vol. 2 (5), p. 883–892.

Córdoba-Pedregosa, M.C., Córdoba, F., Villalba, J. M., González-Reyes, J. A., 2003, Differential distribution of ascorbic acid, peroxidase activity, and hydrogen peroxide along the root axis in *Allium cepa L.* and its possible relationship with cell growth and differentiation, *Protoplasma*, Vol. 221, p. 57–65.

Córdoba-Pedregosa, M.C., Córdoba, F., Villalba, J. M., González-Reyes, J. A., 2005, Changes in intracellular and apoplasmic peroxidase activity, ascorbate redox status, and root elongation induced by enhanced ascorbate content in *Allium cepa* L., *Journal of Experimental Botany*, Vol. 56 (412), p. 685–694.

Dávila, G., Vázquez-Duahlt, R., 2006, Enzimas Ligninolíticas Fúngicas para Fines Ambientales, *Mensaje Bioquímico*, Vol. XXX, p. 29-55.

Delgadillo-López, A. E., González-Ramírez, C. A., Prieto-García, F., Villagómez-Ibarra, J. R., Acevedo-Sandoval, O., 2011, Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación, *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, Vol. 14, p. 597-612.

Duarte-Vázquez, M.A., García-Padilla, S., García-Almendárez, B.E., Whitaker, J.R., Regalado, C., 2007, Broccoli Processing Wastes as a Source of Peroxidase, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 55, p.10396–10404.

Dunford, H.B., 2010, Peroxidases & Catalases: Biochemistry, **En:** *Biophysics, Biotechnology and Physiology*, Canadá, Edt. Wiley.

Egert, M., Tevini, M., 2003, Influence of ultraviolet- β radiation on peroxidase activity of *Allium schoenoprasum* leaves, *Biologia Plantarum*, Vol. 47 (2), p.265-267.

Gamenara, D. 2013. Reactions Involving Oxidases and Peroxidases **En:** *Redox Biocatalysis: Fundamentals and Applications*. Uruguay, Capítulo 5. J. Wiley & sons Inc.

Gaur, M., Lohani, J., Balakrishnan, V. R., Raghunathan, P., Eswaran, S. V., 2009, Dehydrodivanillin: Multi-dimensional NMR Spectral Studies, Surface Morphology and Electrical Characteristics of Thin Films, *Korean Chemical Society*, Vol. 30 (12), p. 2895-2898.

González, A. M., Raisman, J.S., *Peridermis: Corteza y Derivados*. [En línea], (Actualizado al año 2008). Disponible en:

<http://www.biologia.edu.ar/plantas/corteza.htm> [último acceso 4 de noviembre del 2012].

Hamid, M., Khalil-ur-Rehman, 2009, Potential applications of peroxidases, *Food Chemistry*, Vol.115, p.1177–1186.

Hamill, D. E., Brewbaker, J. L., 1969, Isoenzyme Polymorphism in Flowering Plants. IV. The Peroxidase Isoenzymes of Maize (*Zea mays*), *PHYSIOLOGIA PLANTARUM*, Vol. 22, p. 945-958.

Hidalgo-Cuadrado, N., Pérez-Galende, P., Manzano, T., Garcia De Maria, C., Shnyrov, V. L., Roig, M. G., 2012, Screening of Postharvest Agricultural Wastes as Alternative Sources of Peroxidases: Characterization and Kinetics of a Novel Peroxidase from Lentil (*Lens culinaris L.*) Stubble, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 60, p. 4765–4772.

Higara, S., Sasaki, K., Ohashi, Y., Matsui, H., 2001, A large family of class III plant peroxidases, *Plant Cell Physiology*, Vol. 42 (5), p. 462-468.

Hildebrand, D., *Plant Biochemistry*. [En línea], (Actualizado al 12 de abril del 2004). Disponible en: <http://www.uky.edu/~dhild/biochem/18/lect18.html> [último acceso 15 de enero del 2013].

Hollmann, F., Arends, I., Buehler, K., Schallmeyer, A., Bühler, B., 2010, Enzyme-mediated oxidations for the chemist, *Green Chemistry*, Vol. 13, p.226-265.

JECFA, *Edición en línea: “Especificaciones para aromatizantes”*, [En línea]. Actualizado al año 2008, Disponible en: <http://www.fao.org/ag/agn/jecfaflav/details.html?lang=es&flavId=6882> [último acceso 2 de febrero del 2013].

Khales, A., Baaziz, M., 2005, Quantitative and qualitative aspects of peroxidases extracted from cladodes of *Opuntia ficus indica*, *Scientia Horticulturae*, Vol. 103, p.209–218.

Kleinman, R., *Vascular Plants of Gila Wilderness*. [En línea], (Actualizado al 29 de diciembre del 2009). Disponible en: http://www.wnmu.edu/academic/nspages/gilaflora/fraxinus_velutina.html [último acceso 15 de enero de 2013].

Kobayashi, S., Higashimura, H., 2003, Oxidative polymerization of phenols revisited, *Progress in Polymer Science*, Vol. 28, p. 1015–1048.

Martinez, C., Montillet, J., Bresson, E., Agnel, J., Dai, G., Daniel, J., Geiger, J., Nicole, M., 1998, Apoplastic peroxidase generates superoxide anions in cells of cotton cotyledons undergoing the hypersensitive reaction to *Xanthomonas campestris* pv., *Plant-Microbe Interact*, Vol. 11, p.1038-1047.

Mika, A., Boenisch, M.J., Hopff, D., Lühje, S., 2009, Membrane-bound guaiacol peroxidases from maize (*Zea mays* L.) roots are regulated by methyl jasmonate, salicylic acid, and pathogen elicitors, *Journal of Experimental Botany*, Vol. 61 (3), pp. 831–841.

Morrison, R. T., Boyd, R. N., 1987, *Química Orgánica*, 2ª. Edición, Delaware, E.U.A., Edt. Addison-Wesley Iberoamericana.

Moussouni, S., Saru M. L., Ioannou E., Mansour, M., Detsi M., Roussis, V., Kefalas, P., 2011, Crude peroxidase from onion solid waste as a tool for organic synthesis. Part II: oxidative dimerization–cyclization of methyl *p*-coumarate, methyl caffeate and methyl ferulate, *Tetrahedron Letters*, Vol. 52, p. 1165-1168.

Mouterde, L. M., Flourat, A. L., Cannet, M., Ducrot, P., Allais, F., 2012, Chemoenzymatic Total Synthesis of a Naturally Occurring (5-5')/(8'-O-4'') Dehydrotrimer of Ferulic Acid, *European Journal of Organic Chemistry*, sin volumen, p. 173-179.

Murcia, M. A., López- Ayerra, B., Martínez-Tomé, M., Vera, A. M., García-Carmona, F., 2000, Evolution of ascorbic acid and peroxidase during industrial processing of broccoli, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 80, p.1882-1886.

Nardini, M., D'Aquino, M., Tomassi, G., Gentili, V., Felice, M., Scaccini, C., 1995, Inhibition of Human Low-density Lipoprotein Oxidation by Caffeic Acid and other Hydroxycinnamic Acid Derivatives, *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 19 (5), p. 541-552.

Nishimura, R. T., Giammanco, C. H., Vosburg, D. A., 2010, Green, Enzymatic Syntheses of Divanillin and Diapocynin for the Organic, Biochemistry, or Advanced General Chemistry Laboratory, *Journal of Chemical Education*, Vol. 87, No. 5, p. 526- 527.

Peña-García, N., 2003, Biosensores amperométricos compósitos basados en peroxidasa. Aplicación a la determinación de analitos de interés en alimentos mediante electrodos bioenzimáticos y multienzimáticos. Tesis de doctorado. Universidad Complutense de Madrid.

Raseetha, S., Heenan, S. P., Oey, I., Burritt, D. J., Hamid, N., 2011, A new strategy to assess the quality of broccoli (*Brassica oleracea L. italica*) based on enzymatic changes and volatile mass ion profile using Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry (PTR-MS), *Innovative, Food Science and Emerging Technologies*, Vol. 12, p. 197-205.

Rimko, H., Rietjens, I., Hartmans, S., Swarts, H. J., Field, J. A., 2009, Calculated ionization potentials determine the oxidation of vanillin precursors by lignin peroxidase, *FEBS Letters*, Vol. 430 (3), p. 390-392.

Rosazza, J. P. N., Huang, Z., Dostal, L., Volm, T., Rousseau B., 1995, Review: Biocatalytic transformations of ferulic acid: an abundant aromatic natural product, *Journal of Industrial Microbiology*, Vol.15, p.457-471.

Sabeh, F., Wright, T., Norton, S. J., 1993, Purification and characterization of a glutathione peroxidase from the *Aloe vera* plant, *Enzyme & Protein*, Vol. 47(2), p.92-98.

Saliu, F., Tolppa, E. L., Zoia, L., Orlandi, M., 2011, Horseradish peroxidase catalyzed oxidative cross-coupling reactions: the synthesis of 'unnatural' dihydrobenzofuran lignans, *Tetrahedron Letters*, Vol. 52, p. 3856-3860.

Sánchez-Carvajal, A.L., 2008, Obtención de Compuestos Diméricos mediante Acoplamiento Oxidativo de Fenoles Promovido por Peroxidasas de Nopal, Tesis de maestría, Instituto Tecnológico de Veracruz.

Saval, S., 2012, Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, Presente y Futuro, *Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C.*, Vol. 16 (2), p. 14-46.

Shannon, L. M., Kay, E., Lew, J. Y., 1966, Peroxidase Isozymes, Isolation and Physical Properties, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 241 (9), p.2166-2172.

Schomburg, D. y Schomburg, I., 2007, *Peroxidase 1.11.1.7.*, Handbook of Enzymes, Eds. Springer Berlin Heidelberg, Volume 25, 211-226. Berlín.

Sindhu, M., Emilia Abraham, T., 2004, Ferulic Acid: An Antioxidant Found Naturally in Plant Cell Walls and Feruloyl Esterases Involved in its Release and Their Applications, *Critical Reviews in Biotechnology*, Vol. 24(2-3), p.59-83.

Thongsook, T., Barrett, D. M., 2005, Purification and Partial Characterization of Broccoli (*Brassica oleracea* Var. *Italica*) Peroxidases, *Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 53, p. 3206-3214.

Veitch, N. C., 2004, Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme, *Phytochemistry*, Vol. 65, p. 249-259.

Wang, L., Zhang W., Wei L., Xu, C., 2000, A study of peroxidase and amylase isoenzymes in different radish cultivars during winter storage, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol 80, p. 1767-1771.

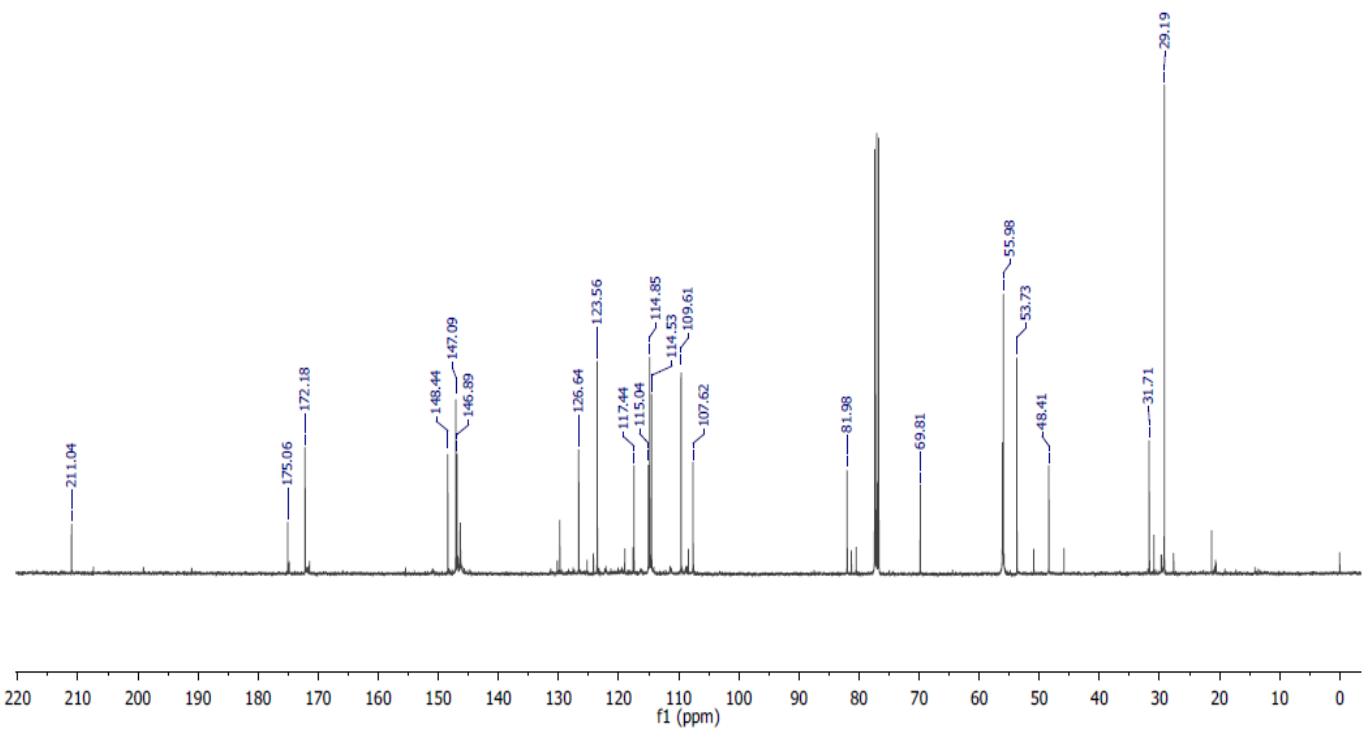
Zaitso, K., Ohkura Y., 1980, New fluorogenic substrates for horseradish peroxidase: rapid and sensitive assays for hydrogen peroxide and the peroxidase, *Analytical Biochemistry*, Vol. 109, p. 109- 113.

11. Anexo I

Espectro RMN C¹³ crudo de reacción de acoplamiento oxidativo 1 con peroxidasa de brócoli.

15457-13C_RD4
15457

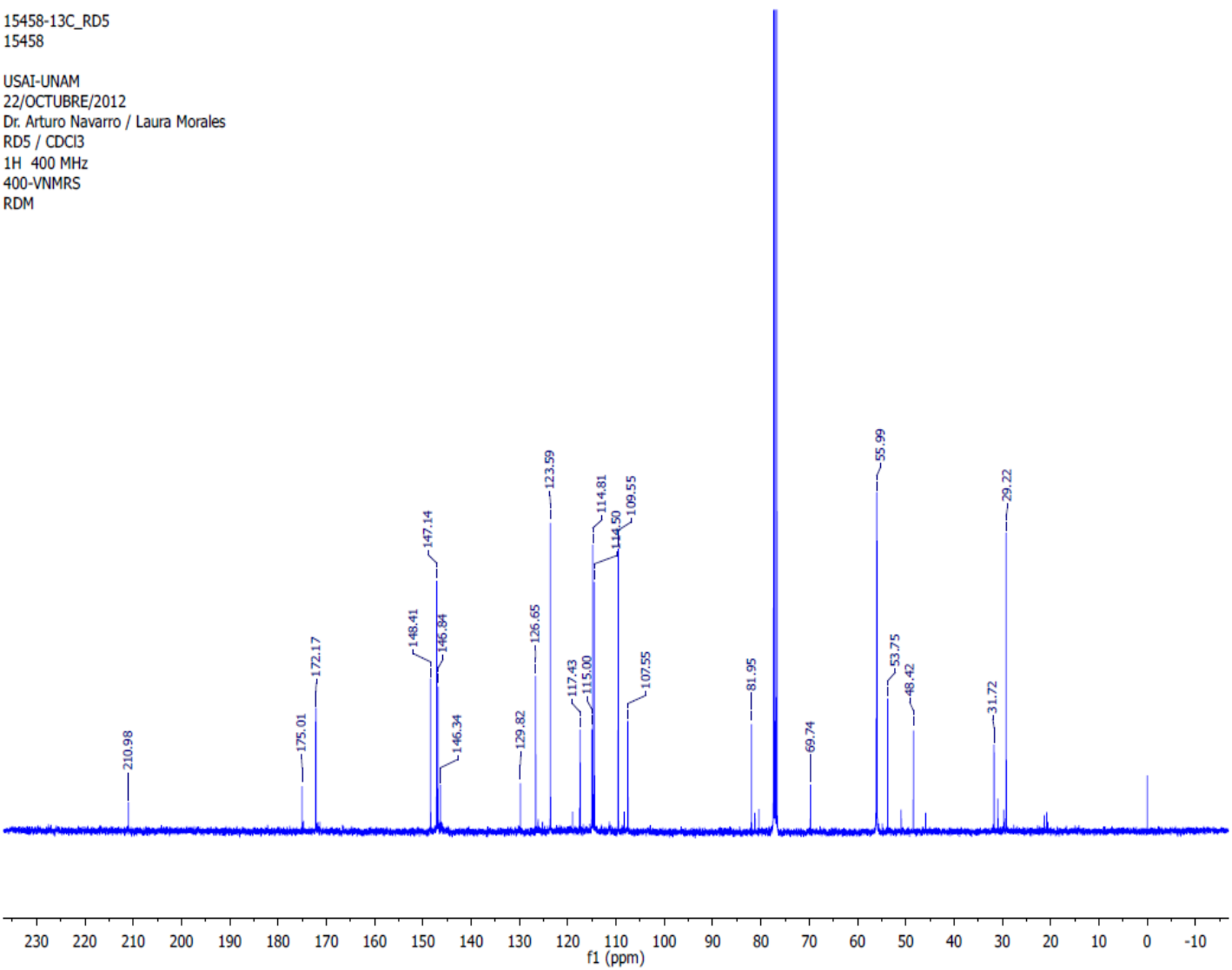
USAI-UNAM
22/OCTUBRE/2012
Dr. Arturo Navarro / Laura Morales
RD4 / CDCl₃
1H 400 MHz
400-VNMRS
RDM



Espectro RMN C¹³ crudo de reacción de acoplamiento oxidativo 1 con peroxidasa de caña de maíz.

15458-13C_RD5
15458

USAI-UNAM
22/OCTUBRE/2012
Dr. Arturo Navarro / Laura Morales
RD5 / CDCl₃
1H 400 MHz
400-VNMRS
RDM



Espectro RMN C¹³ crudo de reacción de acoplamiento oxidativo 1 con peroxidasa de cebollín.

