



FACULTAD DE FARMACIA
ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE BIOPROCESOS

ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE HIDRÓLISIS SOBRE POLISACÁRIDOS PÉCTICOS Y
SU APLICACIÓN EN LA DETERMINACIÓN DE AZÚCARES NEUTROS
POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA

Internado para optar al Título de Químico Farmacéutico

MARÍA JOSÉ OLIVARES DÍAZ

Director de Internado: Jacqueline Concha Olmos
Co- director de Internado: Carmen Soto Maldonado

2017

RESUMEN

La presente investigación se enfocó en estudiar distintas condiciones hidrolíticas ácidas y enzimáticas sobre pectina cítrica comercial con el objetivo de establecer un método de hidrólisis rápido, preciso y cuantitativo para polisacáridos pécticos y su aplicación en la determinación de azúcares neutros por cromatografía líquida.

Para este efecto se evaluaron las condiciones de hidrólisis ácida con los ácidos sulfúrico 0,05 y 1 M, trifluoroacético 1 M, y clorhídrico 2 M, a una temperatura de 100 y 120 °C durante 60 minutos, y enzimática con los preparados multienzimáticos comerciales Viscozyme L, Rohapect DA-6L y Pectinex Ultra SPL, con concentraciones de enzima/sustrato de 2, 4, y 10 % a una temperatura de 45 y 60 °C, durante 3, 24 y 48 horas de incubación.

Las muestras anteriores fueron procesadas a través de tres métodos, primero, por el método de determinación de azúcares reductores de Miller, segundo, a través del método de cromatografía líquida de alta resolución con detector de índice de refracción, y, por último, por cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos previa derivatización con 1-fenil-3-metil-5-pirazolona.

Los resultados obtenidos permitieron concluir que las condiciones de hidrólisis ácidas evaluadas lograron reducción del grado de polimerización de la pectina, pero no fueron suficientes para hidrolizar a monosacáridos. Por otro lado, el mayor grado de hidrólisis a monosacáridos se obtuvo con la condición enzimática Viscozyme 4 % enzima/sustrato a 45 °C.

ABSTRACT

The present investigation focused on studying different acidic and enzymatic hydrolytic conditions on commercial citrus pectin with the objective of establishing a rapid, precise and quantitative hydrolysis method for pectic polysaccharides and its application in the determination of neutral sugars by liquid chromatography.

For this purpose, the acid hydrolysis conditions were evaluated with 0.05 and 1 M sulfuric acid, 1 M trifluoroacetic acid, and 2 M hydrochloric acid, at a temperature of 100 and 120 ° C for 60 minutes, and enzymatic with commercial multienzymatic preparations Viscozyme. L, Rohapect DA-6L and Pectinex Ultra SPL with enzyme / substrate concentrations of 2, 4, and 10% at a temperature of 45 and 60 ° C, for 3, 24 and 48 hours of incubation.

The previous samples were processed through three methods, first, by the method of determination of reducing sugars Miller, second, through the method of high performance liquid chromatography with refractive index detector, and finally, by high performance liquid chromatography with diode array detector prior derivatization with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone.

The results obtained allowed to conclude that the evaluated acid hydrolysis conditions achieved a reduction in the degree of polymerization of pectin, but they were not sufficient to hydrolyze monosaccharides. On the other hand, the highest degree of hydrolysis to monosaccharides was obtained with the enzymatic condition Viscozyme 4 % enzyme / substrate at 45 °C.

ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN.....	6
1.1	Pectina, clasificación y estructura	6
1.2	Determinación de carbohidratos en polisacáridos	9
1.3	Determinación de azúcares mediante HPLC	11
1.4	Hidrólisis de polisacáridos	12
2	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo general	23
2.2	Objetivo específico	23
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
3.1	Materiales, equipos y reactivos	24
3.1.1	Materiales de laboratorio	24
3.1.2	Equipos e instrumental.....	25
3.1.3	Reactivos y soluciones	26
3.2	Métodos de análisis	28
3.2.1	Tratamiento químico ácido de despolimerización de pectina	28
3.2.2	Tratamiento enzimático de despolimerización de pectina	29
3.2.3	Determinación del poder reductor mediante DNS.....	30
3.2.4	HPLC -IR, HPLC-DAD, derivatización.....	31
4	RESULTADOS.....	33
4.1	Determinación de las condiciones de hidrólisis ácida y enzimática a través del método de Miller	33

4.2	Determinación de monosacáridos mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector Índice de Refracción (HPLC- IR)	37
4.3	Determinación de azúcares mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Arreglo de Diodos (HPLC-DAD).....	43
5	DISCUSIÓN.....	48
6	CONCLUSIONES.....	55
7	BIBLIOGRAFÍA	56
8	ANEXOS.....	62
8.1	Curva de calibrado de glucosa para DNS.....	62
8.2	Cromatogramas de estándares de monosacáridos HPLC-IR	62
8.3	Cromatogramas de estándares y curvas de calibrado de monosacáridos HPLC-DAD.	63

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 Métodos de hidrólisis ácida encontrados en la literatura.	17
TABLA 2 Actividad y condiciones óptimas de las mezclas enzimáticas.	21
TABLA 3 Método ácido de hidrólisis de pectina.	28
TABLA 4 Método enzimático de hidrólisis de pectina.	29
TABLA 5 Curva de calibrado de glucosa para DNS	31
TABLA 6 Parámetros de idoneidad y límites propuestos	32
TABLA 7 Resultados de idoneidad obtenidos y límites propuestos.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 Estructura básica de la pectina	8
FIGURA 2 Reacción de óxido-reducción entre DNS y D-glucosa.	10
FIGURA 3 Hidrólisis de cadenas de azúcar neutras de pectina por VL9.	18
FIGURA 4 Hidrólisis ácida de pectina (DNS).	34
FIGURA 5 Hidrólisis enzimática de pectina, 3 horas 45 °C (DNS).....	35
FIGURA 6 Hidrólisis enzimática de pectina, 24 horas 45 °C (DNS).....	35
FIGURA 7 Hidrólisis enzimática de pectina, 3 horas 60 °C (DNS).....	36
FIGURA 8 Hidrólisis enzimática de pectina, 24 horas 60 °C (DNS).....	36
FIGURA 9 Hidrólisis de pectina con H ₂ SO ₄ 0,05 M (HPLC-IR).....	37
FIGURA 10 Hidrólisis de pectina con H ₂ SO ₄ 1M (HPLC-IR).....	38
FIGURA 11 Hidrólisis de pectina con TFA 1 M (HPLC-IR).....	38
FIGURA 12 Hidrólisis de pectina con HCl 2 M (HPLC-IR).....	38
FIGURA 13 Control de pectina en agua sin enzima (HPLC-IR).	39
FIGURA 14 Hidrólisis de pectina con Viscozyme (HPLC-IR).	40
FIGURA 15 Hidrólisis de pectina con Rohapect (HPLC-IR).	41
FIGURA 16 Hidrólisis de pectina con Pectinex (HPLC-IR).	42
FIGURA 17 Hidrólisis de pectina con Viscozyme 4% 24 horas (HPLC-DAD).....	44

FIGURA 18 Hidrólisis de pectina con Viscozyme 4% 48 horas (HPLC-DAD).....	44
FIGURA 19 Hidrólisis de pectina con H ₂ SO ₄ 1M a 100 y 120 °C (HPLC-DAD).	45
FIGURA 20 Hidrólisis de pectina con TFA 1M a 100 y 120 °C (HPLC-DAD).	46
FIGURA 21 Hidrólisis de pectina con H ₂ SO ₄ 0,05 M a 100 y 120 °C (HPLC-DAD).....	46
FIGURA 22 Hidrólisis de pectina con HCl 2M a 100 y 120 °C (HPLC-DAD).	47
FIGURA 23 Reacción de azúcares a furfural en medio ácido.	51
FIGURA 24 Mecanismo de acción de las enzimas PME, PG y PL.	53
FIGURA 25 Mecanismo de acción de enzimas pectinasas.	54

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Pectina, clasificación y estructura

Las pectinas son heteropolisacáridos, ampliamente empleadas en la industria alimentaria como espesante, texturizante y estabilizante (Liu *et al.*, 2006); y en la industria farmacéutica, en la elaboración de productos farmacéuticos y biomédicos, por el atractivo de la pectina como un biopolímero no tóxico, biocompatible y biodegradable (Sriamornsak *et al.*, 2008).

Recientemente ha habido interés en el papel potencial de la pectina en la prevención y reducción de la carcinogénesis. Nuevas investigaciones sobre los efectos de las llamadas “pectinas modificadas” (PM), que corresponden a fragmentos más pequeños de pectina han acaparado el interés científico. Si bien los mecanismos no están claros; hay evidencia que sugiere que estos fragmentos de pectina de peso molecular pequeño, ricos en galactanos, pueden unirse al dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) en la proteína pro-metastásica galectina-3 (GAL-3) (Maxwell *et al.*, 2012).

Estructuralmente las pectinas son polisacáridos complejos que se encuentran en la pared celular de las plantas superiores (Ridley *et al.*, 2001). Se encuentran presentes principalmente en la pared primaria y en los tejidos mesenquimáticos y parenquimáticos de frutos y vegetales (Sothornvit & Pitak, 2007), formando parte de la dieta humana, donde contribuye a la fibra soluble.

Existen distintas clasificaciones para este tipo de polisacáridos, la más tradicional indica que serían ácidos pectínicos que están formados por diecisiete monosacáridos diferentes, organizados en distintos polisacáridos, con más de veinte tipos de enlaces, formando una red que los une. Están agrupados en diferentes tipos de cadena, que incluyen ácido urónico, hexosas, pentosas y metilpentosas. Diversas unidades estructurales pueden estar sustituidas por metanol, ácido acético y

ácidos fenólicos. Los azúcares pueden existir en formas furanosídicas o piranosídicas y con diferentes anómeros (alfa o beta), con diversos tipos de enlaces entre los monómeros (Heredia *et al.*, 2003).

Las pectinas tienen tres dominios principales: homogalacturonanos, ramnogalacturonano I y ramnogalacturonano II (**Figura 1**). Homogalacturonano (HG) y ramnogalacturonano I (RGI) constituyen la columna vertebral de la pectina junto con algunos azúcares frecuentes como galactosa y arabinosa, mientras que el ramnogalacturonano II (RGII) representa cadenas complejas laterales unidas a HG (Caffall & Mohnen, 2009). El constituyente mayoritario de la pectina es HG (65%), el cual está formado por residuos de ácido galacturónico, unidos mediante enlaces α -(1 \rightarrow 4) y cuyos grupos carboxilo están parcialmente metilesterificados en la posición 6 (Ridley *et al.*, 2001; Soria *et al.*, 2015). Además, este dominio puede encontrarse acetilado en la posición 2 ó 3 dependiendo de la procedencia de la pectina (Holck *et al.*, 2014). En el caso de RGI (20-30%), la columna vertebral está integrada por repetidos disacáridos constituidos por ramnosa y ácido galacturónico que también puede encontrarse acetilado en la posición 2 ó 3 (Novosel'skaya *et al.*, 2000; Willats *et al.*, 2006). En muchos casos, a través de los residuos de ramnosa se disponen las cadenas laterales, integradas por distintos azúcares neutros tales como galactosa y arabinosa (Gómez *et al.*, 2013).

El dominio menos predominante y, a la vez, más complejo de la pectina es el RGII (1-8%) (Novosel'skaya *et al.*, 2000; Caffall & Mohnen, 2009). Este está compuesto por una cadena principal similar al HG que se encuentra asociada a una amplia variedad de azúcares tales como ramnosa, fucosa, xilosa o galactosa y otros poco comunes como apiosa, ácido acérico o ácido 3-deoxi-mano-octulosónico (KDO) (Willats *et al.*, 2006; Caffall & Mohnen, 2009; Soria *et al.*, 2015).

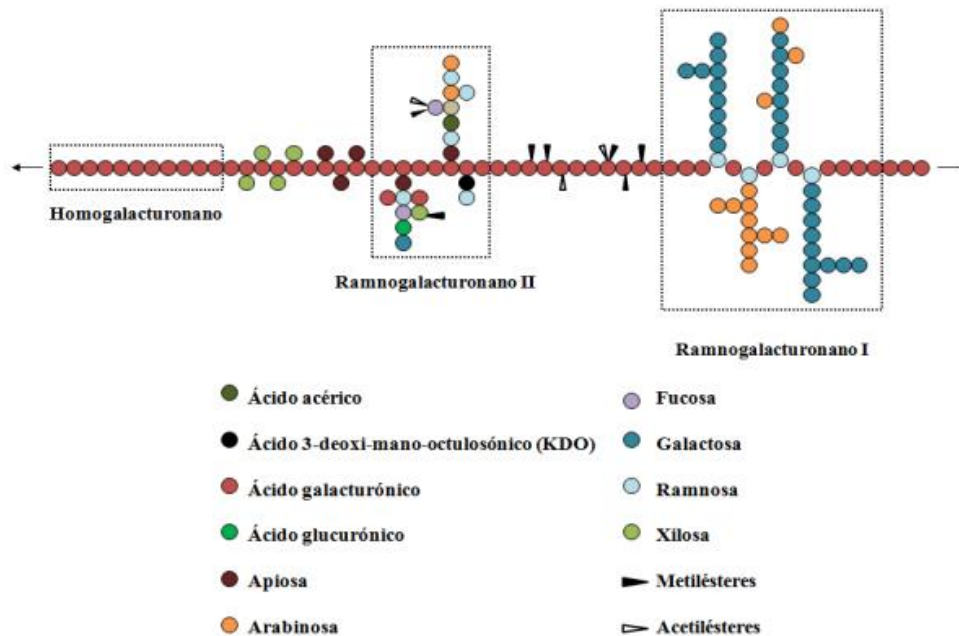


Figura 1 Estructura básica de la pectina (Modificada de Willats *et al.*, 2006)

La complejidad estructural de la pectina se incrementa, ya que puede cambiar durante el almacenamiento de la planta y frutos, y la obtención y procesamiento de este heteropolisacárido, modificando su funcionalidad y dificultando su elucidación estructural (Novosel'skaya *et al.*, 2000). Existe evidencia que demuestra que las variaciones de las longitudes de las cadenas en cada uno de los dominios no son equitativas, sino que HG y RGII presentan una estructura altamente conservada, mientras que RGI exhibe una amplia heterogeneidad en su composición (Zhang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015). Luego, para identificar la estructura de las pectinas, se hace necesario el análisis de su composición química, aspecto que pretende abordar este internado.

1.2 Determinación de carbohidratos en polisacáridos

En los últimos años, la determinación de monosacáridos es uno de los análisis más recurrentes en laboratorios de investigación, teniendo una aplicación considerable en estudios nutricionales y bioquímicos de ingredientes simples, alimentos procesados, complejos y fracciones o componentes aislados. Motivo por el cual el seguimiento de los procesos de fabricación demanda por tanto un análisis rápido; en donde la determinación de mono y disacáridos en alimentos y matrices relacionados requiere una metodología analítica cuantitativa, específica y rápida (Eliasson, 2006).

Como grupo, los carbohidratos son bastante heterogéneos, ya sea en estructura, grado de polimerización, número de isómeros, características macromoleculares, enlaces, y carga eléctrica (Brummer & Cui, 2005). Dada la diversidad de sus orígenes y la gran variabilidad en su composición química, existe en la literatura una amplia variedad de métodos de análisis. Sin embargo, la mayoría de las técnicas tanto cualitativas como cuantitativas de carbohidratos, han sido limitadas a determinaciones de azúcares reductores como el método de Miller (1959) o también conocido como el método DNS (cuya sigla en inglés responde a ácido dinitrosalicílico), y/o no reductores que mide azúcares totales luego de la degradación completa del carbohidrato en medio ácido (Dubois *et al.*, 1956). En ambos casos no se identifica el tipo de monosacárido en específico, lo cual limita su utilización para el análisis de mezclas (Hudson & Bailey, 1980) como hidrolizados de pectina.

Según Miller, 1959, este es un método de screening sencillo, rápido, eficaz y barato capaz de analizar un gran número de muestras y proporcionar resultados meramente cualitativos en un corto periodo de tiempo, reduciendo así los costos y los tiempos de análisis. Este método puede revelar la disminución de masa molecular debido a la eliminación de azúcares neutros manteniendo su columna vertebral de ácido galacturónico prácticamente intacta. Como consecuencia de la

despolimerización puede verse modificado el poder reductor de los polisacáridos. Así, la valoración del poder reductor de las pectinas de manzana y cítricos despolimerizadas se realiza mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), cuyo fundamento se basa en la reducción de este ácido (color amarillo) por un azúcar reductor, pasando a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (color rojo intenso). En la **Figura 2**, se muestra la reacción de óxido-reducción, antes descrita, conversión de los azúcares reductores mediante DNS.

A menudo los métodos se basan en la liberación de monosacáridos a partir de polisacáridos (Wu *et al.*, 2014), después de la hidrólisis química o enzimática, aplicando posteriormente con frecuencia métodos colorimétricos como se mencionó anteriormente, cromatografía de gases (GC) y/o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Tanto la cromatografía de gases como la cromatografía líquida (LC) son ampliamente utilizadas en el análisis de azúcares, pero durante la última década LC ha sido cada vez más preferida. Esto se debe a que la derivatización anterior al análisis no es generalmente requerido en LC, a menos que sea necesario para mejorar la sensibilidad de detección mediante la introducción de un grupo cromóforo o fluorescente.

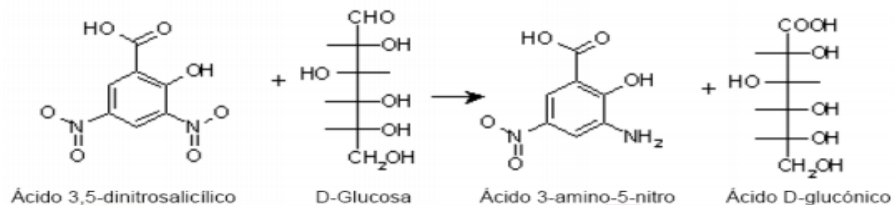


Figura 2 Reacción de óxido-reducción entre DNS y D-glucosa.

A partir de los antecedentes mencionados es que, para el desarrollo de esta investigación, se contempla sólo el método cromatográfico líquido de alta resolución para la determinación y cuantificación de azúcares neutros presentes en pectinas.

1.3 Determinación de azúcares mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución es una técnica cromatográfica que permite tanto la separación como la cuantificación de él o los componentes de una mezcla, que en esta investigación corresponde a los hidrolizados de pectina. El éxito de la técnica depende de la combinación correcta de condiciones de operación, tales como: tipo de columna, fase móvil, longitud y diámetro de la columna, flujo de fase móvil, entre otras. La elución diferencial de los distintos componentes de una mezcla es el resultado del equilibrio de distribución de ellos entre la fase estacionaria y la fase móvil. Esencialmente, un equipo de HPLC consta de un sistema de bombeo que impulsa la fase móvil a través de la columna, de un sistema de inyección que introduce la muestra al sistema, de la columna que es donde se lleva a cabo la separación, de un detector que mide alguna propiedad del soluto y de un registrador de señales que registra la señal provocada por el paso de la muestra por el detector, permitiendo su identificación y cuantificación (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 1994).

En cuanto a la determinación de carbohidratos, el sistema de cromatografía líquida de alta resolución debe ser acoplado, en general, a un detector de índice de refracción (IR), que mide la diferencia de índice de refracción entre el solvente puro y el solvente que contiene la muestra (Quattrochi *et al.*, 1992).

Los monosacáridos u oligosacáridos no pueden ser detectados directamente por absorción, una alternativa es el uso de un detector de arreglo de diodos (DAD), aunque se requiere la derivatización de los monosacáridos. Este proceso facilita la detección cromatográfica continua, aumentando la sensibilidad, disminuyendo los límites de detección del analito, y puede aumentar además la selectividad, introduciendo como factores complementarios a la separación

cromatográfica, la reacción analito – reactivo y las características diferenciales ópticas y electroquímicas de los productos de reacción (Valcárcel & Gómez, 1988).

La derivatización de monosacáridos da lugar a moléculas absorbentes de radiación ultravioleta (UV) que ayudan a la sensibilidad de detección, lo que permite un análisis fiable de tamaños de muestra de carbohidratos pequeños y una separación más fácil debido a cargas dotadas por los reactivos de derivatización (Lamari *et al.*, 2003). Para llevar a cabo el proceso de derivatización existen distintos agentes derivatizantes, el más recurrente en la literatura es el 1-fenil-3-metil-5-pirazolona (PMP) que puede reaccionar cuantitativamente con azúcares reductores en condiciones suaves y de una manera estereoscópica, para producir derivados fuertemente absorbentes y electroquímicamente sensibles, y se ha aplicado con éxito al análisis de la composición de monosacáridos de polisacáridos (Honda *et al.*, 1989).

1.4 Hidrólisis de polisacáridos

Como se mencionó anteriormente, en los últimos años, la determinación de monosacáridos es uno de los análisis más demandantes a nivel de investigación científica, por esta razón contar con un método adecuado de hidrólisis previo al análisis es imprescindible (Eliasson, 2006).

Los métodos disponibles para el análisis de hidratos de carbono de pectina se basan principalmente en la determinación de los residuos de azúcares que los constituyen después de la hidrólisis química o con menor frecuencia después de la hidrólisis enzimática (Matsushashi *et al.*, 1992). La hidrólisis química ácida es la más utilizada para la despolimerización de pectinas (Garna *et al.*, 2004; Yapo *et al.*, 2007; Arnous & Meyer, 2008; Methacanon *et al.*, 2014). En presencia de un ácido fuerte y calor, se escinde el enlace glicosídico entre residuos de monosacáridos en un polisacárido. Durante esta

reacción, se consume una molécula de agua por cada enlace glucosídico escindido (Brummer & Cui, 2005).

En la literatura se citan varios procedimientos químicos para la hidrólisis de las cadenas de azúcar neutras de la pectina los cuales se diferencian por la naturaleza del ácido, su concentración, el tiempo y la temperatura (Dutton, 1973; De Ruiter *et al.*, 1992). Los agentes hidrolíticos comúnmente utilizados son ácido sulfúrico (H_2SO_4) (Saeman *et al.*, 1954; Quemener *et al.*, 1993), ácido trifluoroacético (TFA) (Albersheim *et al.*, 1967; De Ruiter *et al.*, 1992), y ácido clorhídrico (HCl) (Chambers & Clamp, 1971; Quemener & Thibault, 1990).

Dentro de los agentes hidrolíticos, la hidrólisis con TFA se ha aceptado comúnmente como un método de rutina para la liberación de monosacáridos (Honda *et al.*, 1989; Harazono *et al.*, 2011; Stepan & Staudacher, 2011; Wang *et al.*, 2015). Se ha informado que el ácido sulfúrico es superior al ácido trifluoroacético para la hidrólisis de sustratos, sin embargo, el ácido sulfúrico puede ser difícil de eliminar después de la hidrólisis, y su presencia puede interferir con algunos análisis degradando la muestra o dañando los equipos, además podría ser perjudicial para la salud si la muestra está destinada a uso alimentario o farmacéutico. Por otro lado, TFA es volátil y puede eliminarse fácilmente antes de un análisis de HPLC (Brummer & Cui, 2005).

La hidrólisis ácida de pectina se realiza comúnmente con los ácidos mencionados anteriormente, generalmente a concentraciones de 1-2 M, a 100-121 °C durante 1-3 horas (Englyst & Cummings, 1984; Roberts *et al.*, 1987; Quemener & Thibault, 1990; Renard & Thibault, 1996; Thomas & Tibault, 2002; Garna *et al.*, 2004; Methacanon *et al.*, 2014).

Según Brummer & Cui (2005), un procedimiento apropiado para polisacáridos neutros usando ácido trifluoroacético requiere calentar aproximadamente 10 mg de material polisacárido en 1 mL de TFA 1 M a 121 °C durante 1 hora. Posteriormente, después de enfriar a temperatura ambiente el

TFA puede eliminarse bajo una corriente de nitrógeno. Los mismos autores, también describen un procedimiento de hidrólisis que utiliza ácido sulfúrico apropiado para el material de fibra soluble en agua en los alimentos, utilizando ácido sulfúrico 1 M y calentado a 100°C durante 2,5 horas. Otro procedimiento recomendado para polisacáridos neutros implica mezclar de 2 a 5 mg de muestra seca con 0,1 a 0,25 mL de HCl 2 M y calentar a 100 °C durante 2,5 horas.

Por otro lado, los autores Wikiera *et al.*, (2015) utilizaron el método de hidrólisis ácida con TFA 2 M a 100° y 120 °C, y después de la hidrólisis, los contenidos de ácido galacturónico (GalA) y azúcares neutros (NS) se midieron por HPLC. Los autores observaron que la hidrólisis completa del ácido poligalacturónico (PGalA) se produjo después de 2,5 horas de incubación con TFA 2 M a 120 °C, mientras que la hidrólisis eficiente de azúcares neutros en pectinas se realizó con TFA 2 M a 100 °C durante 2,5 horas. La despolimerización de PGalA fue menos eficaz y se obtuvo con TFA 2 M a 100 °C, sin embargo, mencionan que prolongar el tiempo de hidrólisis da como resultado un aumento de liberación de GalA; sin embargo, incluso después de 4 horas, la hidrólisis del PGalA no fue completa. Esto es consistente con los resultados de Emaga *et al.*, (2012), quienes observaron la baja eficiencia de las condiciones antes mencionadas durante la hidrólisis del mucílago de la linaza.

Otros investigadores también indican la alta estabilidad de PGalA en entornos ácidos (Garna *et al.*, 2004; Min *et al.*, 2011; Lim *et al.*, 2012). Como en el caso de GalA, las condiciones de hidrólisis influyeron significativamente en la cantidad y el perfil de azúcares neutros en las muestras analizadas. La mayor proporción de azúcares neutros en pectinas se midió después de la hidrólisis ácida realizada en condiciones suaves (2,5 h a 100 °C). Por el contrario, cuando la hidrólisis se realiza en las condiciones óptimas para la despolimerización de PGalA (120 °C durante 2,5 h), se observa una reducción drástica de los niveles de NS en casi un 50 %. Esto es particularmente interesante, ya que las últimas condiciones son recomendadas por muchos investigadores y se usan comúnmente para la hidrólisis de pectina (Arnous & Meyer, 2008; Fissore *et al.*, 2009; Methacanon

et al., 2014). Los resultados obtenidos en el estudio de Wikiera *et al.*, (2015), indican claramente que incluso un tratamiento breve de pectina con TFA 2 M a 120 °C causa su despolimerización y también la degradación severa de los monosacáridos liberados.

Todo lo anterior sugiere que las condiciones de hidrólisis seleccionadas deben ser drásticas, para escindir, en poco tiempo, los diferentes enlaces glucosídicos, sin embargo, estos enlaces no presentan la misma resistencia hacia el ácido (Biermann, 1988; De Ruyter *et al.*, 1992), y la cinética de liberación y degradación de los azúcares de la cadena lateral de la pectina difiere (Selvendran *et al.*, 1979; Le Goff *et al.*, 2001), y el grado de liberación del monosacárido depende de la segmentación de los enlaces glicosídicos de los polisacáridos en condiciones hidrolíticas (Albersheim *et al.*, 1967; Harazono *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013), por ende el análisis resultante de la composición de monosacáridos puede ser incorrecto si se usa una misma condición hidrolítica para diferentes polisacáridos.

Lo anterior da cuenta de que el proceso de hidrólisis es complicado, porque la cinética de reacción depende del tipo de pectina. La desventaja de este método es que los diferentes enlaces glucosídicos tienen diferentes susceptibilidades a los ácidos, lo que resulta en su hidrólisis gradual (Voragen *et al.*, 2009). Por lo tanto, es necesario explorar condiciones hidrolíticas adecuadas para el análisis de la composición de monosacáridos de polisacáridos con diferentes características estructurales (Wang *et al.*, 2015).

Durante una hidrólisis ácida, los monosacáridos liberados son susceptibles de degradación en presencia de ácido concentrado caliente. Sin embargo, no todos los enlaces glicosídicos se escinden a la misma velocidad y el tiempo de hidrólisis debe ser suficiente para hidrolizar todos los enlaces en la muestra. Estas dos necesidades deben ser equilibradas; la necesidad de hidrólisis de suficiente

resistencia y tiempo para permitir la hidrólisis completa, pero no tanto, como para conducir a la degradación de la muestra (Brummer & Cui, 2005).

Por lo tanto, la elección óptima de las condiciones de hidrólisis ácida es muy importante. Ambas condiciones de hidrólisis incompletas o excesivas dan como resultado errores durante la posterior determinación del ácido galacturónico y el contenido de azúcar neutro. Una temperatura demasiado alta y ácidos concentrados pueden causar la formación de derivados de furfural, lo que hace imposible la determinación precisa de azúcares. En la **Tabla 1**, se resumen los métodos de hidrólisis ácida encontrados en la literatura.

Una alternativa a la hidrólisis ácida es la hidrólisis enzimática de la pectina, que se realiza con enzimas que degradan la pectina de forma específica. Caso de ello es lo publicado por Quemener & Thibault (1990), quienes evaluaron la hidrólisis enzimática de las cadenas de azúcar neutras de pectina por una mezcla que contiene múltiples actividades enzimáticas como arabinasa, RL-arabinofuranosidasa, B-galactosidasa, galactanasa y xilanasa, tal como se observa en la **Figura 3**, donde se muestra la liberación de azúcares neutros en el tiempo. Según los autores, se obtienen diferentes mesetas para el azúcar. Se necesita un total de 18 horas para arabinosa y de 24 horas para galactosa, xilosa y ramnosa. Las concentraciones máximas de galactosa y arabinosa son más altas que las obtenidas por hidrólisis química, al contrario de la xilosa.

Tabla 1 Métodos de hidrólisis ácida encontrados en la literatura.

Ácido	Concentración de pectina en ácido	Concentración del ácido (M)	Temperatura °C	Tiempo de hidrólisis (h)	Bibliografía
TFA	10 mg/ 2 mL	2	100 y 120	2,5	Wikiera <i>et al.</i> , 2015
	10 mg / mL	0,5 - 4	105 – 120	1 – 6	Wang <i>et al.</i> , 2016
	10 mg / mL	1	100 y 121	1	Brummer& Cui, 2005.
	-	4	100	4	Guilloux <i>et al.</i> , 2009
	-	2 y 4	100 y 80	5	Boual <i>et al.</i> , 2012
	25 mg / 2,5 mL	2	100	6	Emaga <i>et al.</i> , 2012
	-	4 -7	100	2-4	Harazono <i>et al.</i> , 2011
	20 mg / 2 mL	2	100	8	You <i>et al.</i> , 2008
	40 mg/ 2,5 mL	1	100	-	Garna <i>et al.</i> , 2004
H₂SO₄	40 mg / 2,5 mL	0,2- 1 y 2	80 y 100	1 – 5	Garna <i>et al.</i> , 2004
	-	2	100	4	Emaga <i>et al.</i> , 2012
	-	1	100	2,5	Brummer& Cui, 2005.
	25 mg / 2,5 mL	0,2 – 1 – 2	80 y 100	1	Emaga <i>et al.</i> , 2012
HCl	2 – 5 mg / 0,1 – 0,25 mL	2	100	2 – 5	Brummer& Cui, 2005.
	40 mg / 2,5 mL	1	100	1 – 5	Garna <i>et al.</i> , 2004

- = no se indica.

Las enzimas pectinolíticas o pectinasas constituyen un complejo sistema de enzimas encargadas de la degradación o modificación de las sustancias pécticas hasta sus azúcares constitutivos. Estas enzimas son utilizadas en la industria de procesamiento de frutas, donde se emplean para aumentar la productividad de los procesos, mejorar la licuefacción, la maceración, la extracción de tejidos vegetales, y la clarificación y filtración de jugos (Demir *et al.*, 2001).

La complejidad estructural de la pectina tiene ciertas implicaciones sobre las enzimas involucradas en su degradación. De esta forma, las pectinasas se clasifican de acuerdo con el modo de ataque a la molécula de pectina, pudiendo ser divididas en dos grupos principales; el grupo de las pectinasas, que actúan sobre la estructura principal de la pectina, y tiene la función de degradarla hasta sus unidades monoméricas básicas, y el grupo constituido por las enzimas accesorias (Martínez, 2009).

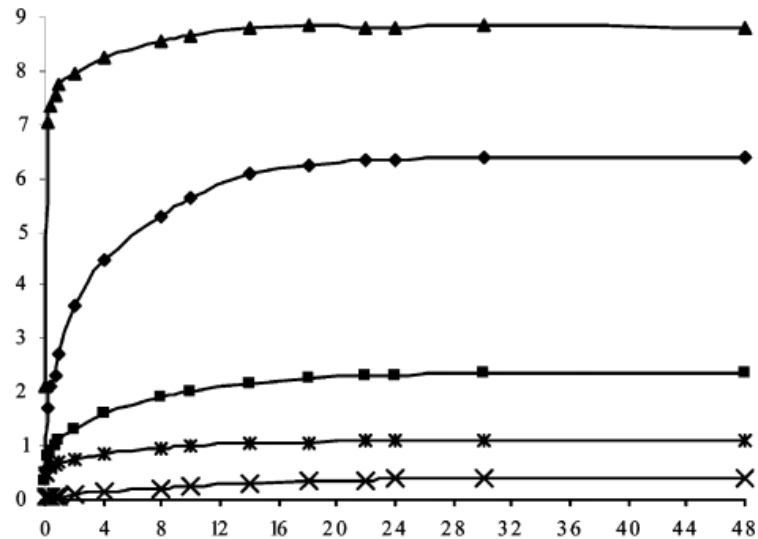


Figura 3 Composición de azúcares neutros (% w/w) v/s tiempo de hidrólisis (h). Hidrólisis enzimática de cadenas de azúcar neutras de pectina por VL9 (pH 5, 50°C): arabinosa (◆), ramnosa(■), galactosa(▲), glucosa (×), xilosa(*) (Quemener & Thibault, 1990).

En el primer grupo, las pectinasas se subclasifican en tres tipos, de acuerdo con el modo de ataque a la parte galacturonada de la molécula de pectina: a) las esterasas, cuya función es catalizar la desesterificación de la pectina mediante la remoción de los grupos metílicos de la cadena principal; b) las despolimerizantes, que mediante dos mecanismos diferentes, hidrólisis (hidrolasas) y transeliminación (liasas), catalizan la división hidrolítica de las conexiones α -1,4 entre los monómeros de ácido D-galacturónico de las sustancias pécticas, y c) las protopectinasas, que degradan la protopectina insoluble para formar una pectina soluble altamente polimerizada (Pedrolli *et al.*, 2009).

Las pectinesterasas (PE) también conocidas como pectinmetilesterasas (PME), catalizan la hidrólisis de los grupos éster carboxílicos metilados de la pectina en ácido péctico y metanol (Kashyap *et al.*, 2001). Actúan preferentemente sobre el éster metílico de la unidad de galacturonato próxima a una unidad de galacturonato no esterificado (Kohli *et al.*, 2015).

Las pectinasas con función despolimerizante pueden clasificarse de acuerdo con la división hidrolítica (hidrolasa) o transeliminativa (liasas) de las conexiones glicosídicas, y subclasificadas según el mecanismo de acción en endo- (randómica) o exo (a partir del final de la molécula), además de la preferencia por ácido péctico o pectina como sustrato (Murad & Azzaz, 2011).

Las hidrolasas incluyen las polimetilgalacturonasas y las poligalacturonasas. Las polimetilgalacturonasas (PMG) catalizan la división hidrolítica de la unión glicosídica de la pectina altamente esterificada, pudiendo ser Endo-PMG o Exo-PMG, catalizando la separación aleatoria de la unión glucosídica α -1,4 y la separación secuencial de la unión glucosídica α -1,4 en el extremo no reductor de la cadena péctica, respectivamente (Jayani *et al.*, 2005); las poligalacturonasas (PG) catalizan la hidrólisis de la unión glucosídica α -1,4 del ácido poligalacturónico por una acción que puede ocurrir tanto en el interior del polímero (endo) como a partir de las extremidades (exo)

(Rehman *et al.*, 2015). Las endo-PG hidrolizan de forma aleatoria las conexiones glucosídicas α -1,4 del ácido péctico, generando mezclas de oligómeros, tri y di galacturonatos y ácido galacturónico, reduciendo la viscosidad de la solución que contiene el sustrato (Contreras, 2003). Las exo-PG catalizan la hidrólisis secuencial de la unión glucosídica α -1,4 del ácido péctico en el extremo no reductor de la cadena, formando mono o dímeros, con una lenta disminución de la viscosidad (Kashyap *et al.*, 2001). Las PG actúan más en pectato que en pectina y resultan en mono o disacáridos. Las liasas son enzimas despolimerizantes que rompen las conexiones glicosídicas α -1,4 por transeliminación de hidrógeno, lo que resulta en galacturónidos con conexión insaturada entre C4 y C5 en el extremo no reductor del ácido galacturónico formado (Kashyap *et al.*, 2001).

Las Pectina liasa (polimetilgalacturonato liasa, PMGL) catalizan el rompimiento de los enlaces glucosídicos α -1,4 por un mecanismo de β -eliminación, y se subdividen en Endo y Exo-PMGL. Las Endo-PMGL realizan una hidrólisis aleatorizada del polímero y las Exo-PMGL actúan secuencialmente por el extremo no reductor (Chaudhri & Suneetha, 2012).

En general, las preparaciones comerciales son multicatalíticas y contienen poligalacturonasas, pectinesterasas, celulasa, xilanasas, β -glucanasas, hemicelulasa y arabanasa (Rumpunen *et al.*, 2002; Garna *et al.*, 2004).

En la **Tabla 2** se muestran tres preparados comerciales que fueron utilizados en esta investigación debido a su disponibilidad en el laboratorio, y sus actividades enzimáticas y condiciones recomendadas por los proveedores.

Tabla 2 Actividad y condiciones de reacción óptimas de las mezclas enzimáticas seleccionadas para este trabajo (datos suministrados por los fabricantes).

Complejo enzimático comercial (solución acuosa)	Actividad	Condiciones óptimas	Actividad
Viscozyme[®] L (Sigma- Aldrich)	arabanasa, celulasa, β -glucanasa, hemicelulasa y xilanasa	pH 3,3-5,5 y 40-50 ° C	100 FBG / g
Pectinex[®] Ultra SP-L (Novozymes)	Pectintranseliminasa Poligalacturonasa Pectinesterasa hemicelulasas y celulasas en pequeñas cantidades	pH 3,5 y 35 ° C	26,000 PG / MI
Rohapect DA6L (Amazon group)	Poligalacturonasa Menor celulasa y xilanasa	pH 3,2 y 50° C	-

FBG - beta-glucanasa fúngica; PG - Poligalacturonasa

Pectinex Ultra SPL es un preparado enzimático comercial de la empresa Novozyme (2008) la cual señala que Pectinex Ultra SPL es una pectinasa, producida por una cepa de *Aspergillus aculeatus*, mediante fermentación sumergida de este microorganismo, se vende principalmente para clarificación de jugos y vinos de manzanas y peras. Dicho preparado consiste en un *pool* de enzimas pectinasas y de ellas esencialmente poligalacturonasas con una actividad de estas de 26,000 u.mL⁻¹, aunque tiene en menor medida otras actividades enzimáticas, pectintranseliminasa, pectinesterasa y hemicelulasa, siendo capaz de romper sustancias pécticas vegetales. Pectinex rompe el enlace glicosídico alfa (1→4) de las pectinas por una acción que se puede llevar a cabo tanto en el interior del polímero (endo) como a partir de los extremos (exo).

Con respecto al preparado comercial Rohapect DA-6L, suministrado por AB enzymes (Alemania), este posee actividad pectinasa y arabanasa, y también se utiliza en la clarificación y extracción de jugos.

De los tres preparados comerciales mencionados, Viscozyme se caracteriza por una actividad pectinolítica muy alta (Brenes *et al.*, 2005), y niveles similares de actividades de celulasa, celobiasa y xilanasa (Kabel *et al.*, 2006).

En base a lo anterior, en este internado se planteó evaluar distintos métodos despolimerización de una pectina cítrica comercial (P 9135) con el objetivo de establecer un método de hidrólisis de polisacáridos óptimo para el análisis de la composición de monosacáridos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Comparar el grado de liberación de monosacáridos en diferentes condiciones hidrolíticas con el fin de establecer un método de hidrólisis de polisacáridos pécticos rápido, preciso y cuantitativo para el análisis de la composición de monosacáridos por cromatografía líquida.

2.2 Objetivo específico

- Establecer las condiciones de hidrólisis ácida (tipo de ácido, concentración, temperatura y tiempo) que generan el mayor grado de hidrólisis de pectina a través del método DNS y HPLC-IR.
- Establecer las condiciones de hidrólisis enzimática (tipo de enzima, concentración E/S, temperatura y tiempo) que generan el mayor grado de hidrólisis de pectina a través del método DNS y HPLC-IR.
- Comparar los perfiles cromatográficos HPLC-IR y HPLC-DAD de los hidrolizados pécticos obtenidos a la condición de mayor grado de hidrólisis.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales, equipos y reactivos

3.1.1 Materiales de laboratorio

- Vasos de precipitado de 50 y 100 mL (Material de vidrio clase A)
- Tubos de ensayo
- Filtros de membrana de acetato de celulosa, tamaño de poro 0,22 y 0,45 μm
- Guantes desechables de nitrilo
- Jeringas de plástico desechables de 5 y 10 mL
- Probeta graduada de 25 y 50 mL
- Micropipetas BioPette Plus 20, 200, 1000, 5000 μL
- Tubos Falcon 14 y 50 mL
- Pipetas Pasteur 3-5 mL
- Matraz de aforo de 10, 25 y 100 mL
- Matraz de Kitasato 1L
- Cubetas de cuarzo 1 x 1 cm

3.1.2 Equipos e instrumental

- Incubador de agitación seco (Lab Tech ®)
- Vortex
- Centrífuga Hermle ® Z300 Laborotechnick GmbH
- Agitador magnético
- Baño de ultrasonido
- Baño termorregulado Arquimed ®
- Balanza analítica Radwag Wagi Elektroniczne $120 \pm 0,0001$ g
- Espectrofotómetro Optizen POP ®
- Estufa a vacío Lab Tech ®
- Autoclave
- Refrigerador Mademsa
- HPLC-IR. Marca Perkin Elmer, ubicado en la Escuela de Ingeniería Bioquímica de la PUCV. Bomba binaria serie 200, detector IR serie 200, temperatura del horno 50° C, temperatura del detector 4° C, flujo 0,4 mL /min, columna BP 100 Ag+, Software Totalchrom 6.2.
- HPLC-DAD. Marca Jasco, ubicado en la Escuela de Química y Farmacia UV, bomba cuaternaria Jasco modelo PU-2089 Plus, detector MD-2010 Plus, interfase LC-NetII/ADC, Horno Jasco CO-2067 Plus, Inyector automático Jasco AS-2055 Plus, columna Kromasil E33168, C18 100 A°, $5,0 \mu\text{m}$ tamaño partícula, 4,6 mm ID, 150 mm largo, Software ChromPass Versión 1.7.403-1.

3.1.3 Reactivos y soluciones

- Pectina sintética comercial P 9135 (Pectin from citrus peel Sigma ® Life Science)
- Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) p.a
- Preparación de solución de DNS. Se pesaron y disolvieron 1,6 g de hidróxido de sodio (NaOH) en 20 mL de agua destilada, luego, se le añadió 1 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), 30 g de tartrato de potasio y sodio tetrahidratado ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$), y 50 mL de agua destilada. Se aforó hasta 100 mL, y la solución final se mantuvo refrigerada y resguardada de la luz.
- Hidróxido de Sodio (NaOH) Vimaroni ® p.a
- Tartrato de potasio y sodio tetrahidratado ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$) p.a
- Agua destilada
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) p.a
- Ácido trifluoroacético (TFA) Merck ® p.a
- Ácido clorhídrico (HCl) 37% Winkler ® p.a
- Preparado comercial enzimático Viscozyme L ®, Rohapect ® Da6L, Pectinex ® Ultra SPL
- Agua ultra pura para cromatografía
- Acetonitrilo para HPLC Merck ®
- Metanol para HPLC Merck ®
- Cloroformo Merck ® p.a
- 1-fenil-3-metil-5-pirazolona (PMP) Aldrich ® Chemistry p.a. Se pesaron en una balanza analítica 870 mg de PMP, y se disolvieron en 10 mL de metanol, la solución de preparó en el momento cada vez que fue utilizada y se resguardó de la luz.

- Buffer 0,04M pH 8, 0 para HPLC. Según la ecuación de Henderson Hasselbach, pesar, disolver y mezclar 6,0266 g de K_2HPO_4 , y 0,7446 g de KH_2PO_4 , y se aforaron a 1 litro con agua ultra pura para cromatografía. Filtrar y desgasificar, la solución resultante es de pH 8,0.
- Solución de NaOH 0,3 M. Se pesaron 120 mg de NaOH en 10 mL de agua destilada.
- Solución de HCl 0,3 M. Se tomaron 2,5 mL de ácido concentrado y se aforaron con agua destilada a 100 mL.
- Estándares de monosacáridos. Se pesaron 12,5 mg de cada monosacárido (D- (+) - Ácido galacturónico 98 % Fluka ®, L-(+) manosa 99 %, D- (+)-Xilosa 99 % Merck ®, L- Ramnosa 99 % Sigma ® Life Science, D- (+)-Glucosa 99,5 % Sigma ® Life Science, D- (+)-Galactosa 99 % Merck ®, DL- Arabinosa 99 % Sigma ® Life Science) y se disolvieron en 25 mL de agua destilada en un matraz de aforo (**Anexo 8.3**).

3.2 Métodos de análisis

3.2.1 Tratamiento químico ácido de despolimerización de pectina

La **Tabla 3** muestra las condiciones hidrolíticas seleccionadas de la literatura mencionada en la introducción, con las que se trabajó en esta investigación.

Tabla 3 Método ácido de hidrólisis de pectina.

Agente hidrolítico	Concentración (M)	Temperatura °C	Tiempo de hidrólisis (h)	Bibliografía
H₂SO₄	0,05; 1	100 y 121	1	Pazur,1986; Garna <i>et al.</i> , 2004; Brummer & Cui, 2005;
TFA	1	100 y 121	1	Emaga <i>et al.</i> , 2012; Mathacanon <i>et al.</i> , 2014
HCl	1	100 y 121	1	

Para llevar a cabo las condiciones mencionadas, se prepararon las soluciones correspondientes con cada ácido. Se disolvió 1 g de pectina cítrica comercial (Sigma P9134) en 200 mL de cada solución de ácido H₂SO₄ 0,05 y 1 M, TFA 1 M y HCl 2 M. Estas soluciones corresponden a los resultados de las hidrólisis en tiempo cero (sin temperatura). Luego, se agregó un volumen de 5 mL de cada solución a tubos Falcon de 15 mL, una vez tapados los tubos se introdujeron en un baño termostático acuoso a 100°C tomando muestras a distintos intervalos de tiempo (15, 30, 60 minutos). Una vez alcanzado el tiempo correspondiente, las muestras se sacaron del baño, y se enfriaron en hielo por unos minutos para detener la reacción, luego, las muestras fueron filtradas con un filtro de membrana de celulosa de 0,45 µm, y llevadas a un frasco con tapa. Este filtrado fue destinado a los diferentes métodos de análisis DNS, HPLC-IR y HPLC-DAD.

Un procedimiento muy similar se llevó a cabo para las muestras tratadas de forma enzimática que se muestran a continuación.

3.2.2 Tratamiento enzimático de despolimerización de pectina

La **Tabla 4** describe las condiciones enzimáticas seleccionadas para trabajar, según la ficha técnica de los preparados comerciales.

Tabla 4 Método enzimático de hidrólisis de pectina.

Enzimas	Viscozyme L Rohapect DA6L Pectinex Ultra SPL
Temperatura	30 – 60 °C
Tiempo de hidrólisis	0 - 48 horas
Concentración E/S	0 – 10%
Razón S/L	1/10 – 1 – 50
Bibliografía	Proveedores

Para llevar a cabo las condiciones mencionadas, se prepararon las soluciones correspondientes con cada enzima. Primero se pesó 1 g del polisacárido péctico y se disolvió en 200 mL de agua, luego, 5 mL de esta solución se introdujeron en tubos Falcon de 50 mL, y se mezclaron con distintos volúmenes y distintas enzimas. Se agregaron 500 uL (2%), 1000 uL (4%), y 2500 uL (10%) de cada una de las enzimas utilizadas (Rohapect DA6L, Pectinex Ultra SPL, Viscozyme L), y se llevaron a un incubador de agitación seco a una temperatura de 45 y 60 °C. Las muestras se midieron a dos tiempos a 3 y 24 horas. Luego de haber cumplido el tiempo de incubación, las muestras se enfriaron en un baño de hielo por unos minutos para detener la reacción, y se filtraron con un filtro de 0,45 µm. El filtrado al igual que en el caso de la hidrólisis ácida se destinó a los distintos métodos de DNS, HPLC – IR, DAD.

Luego de preparadas las soluciones, y haber sido incubadas, se obtuvieron los hidrolizados los cuales fueron analizados en primer lugar por el método de Miller o DNS, debido a que es un método sencillo que permite guiar el posterior proceder de las muestras según sus resultados.

3.2.3 Determinación del poder reductor mediante DNS

El método consta de dos pasos: primero, la determinación de una curva de calibrado de glucosa y el segundo, el análisis de las muestras. En ambos casos, el procedimiento es el mismo.

Procedimiento de muestras para DNS: Las muestras filtradas provenientes de la hidrólisis ácida y enzimática de pectina tratadas en las diferentes condiciones anteriormente mencionadas, fueron destinadas a tubos de ensayo (0,5 mL), y se mezclaron con un volumen suficiente de NaOH para alcalinizar la muestra favoreciendo la reacción, más 1 mL de reactivo de DNS. La mezcla se llevó a ebullición por 5 min para el desarrollo de la reacción, luego se enfriaron por 3 min en baño de hielo, posteriormente se le agregaron 10 mL de agua destilada y se dejó reposar a temperatura ambiente por 15 min. Una vez concluido el tiempo, se mezclaron en un vortex, y un volumen apropiado se vertió a las celdas de cuarzo para ser leído en el espectrofotómetro a 540 nm. En todos los casos se prepararon sus respectivos controles en las mismas condiciones.

Para la estimación del poder reductor de las diferentes muestras de pectinas se construyó previamente una recta de calibrado de 6 puntos a partir de una serie de disoluciones de glucosa (**Anexo 8.1**). Se preparó una solución madre de glucosa en agua destilada con una concentración de 2 g/L de la cual se sacaron volúmenes variables especificados en la **Tabla 5**.

Una vez analizadas las muestras con el método anterior, se procedió a evaluar las mismas muestras en las mismas condiciones, pero a través de la técnica de HPLC-IR, y dependiendo de los resultados de esta técnica, se seleccionaron las muestras de mayor hidrólisis para ser derivatizadas con PMP y analizadas a través de HPLC-DAD. Es importante mencionar que para esta última técnica se disolvieron 500 mg de pectina en 200 mL de cada ácido para hidrólisis ácida, y en 200 mL de agua destilada para hidrólisis enzimática.

Tabla 5 Curva de calibrado de glucosa para DNS

C g/L	uL de solución madre 2 g/L	uL agua destilada	Volumen final
0	0	1000	1
0,2	100	900	1
0,4	200	800	1
0,8	400	600	1
1,2	600	400	1
1,6	800	200	1

3.2.4 HPLC -IR, HPLC-DAD, derivatización

Procedimiento para HPLC- IR. Una vez obtenido los hidrolizados pécticos y estándares, estos fueron filtrados en una jeringa de plástico con un filtro de membrana de celulosa de tamaño de poro 0,45 mm, y llevados a viales de vidrio con tapa, y transportados en un cooler con hielo para mantener la temperatura, hasta la Escuela de Ingeniería Bioquímica de la PUCV para su análisis por HPLC-IR. La muestra transportada (congelada) se llevó directamente a los viales de inyección del equipo HPLC-IR, debido a que este detector no requiere derivatización previa y su fase móvil es agua.

Condiciones del equipo HPLC-IR. Volumen de inyección de las muestras 20 uL, temperatura del horno 50° C, temperatura del detector 4°C, flujo 0,4 mL /min, columna BP 100 Ag+.

Procedimiento de derivatización de azúcares para HPLC-DAD. Según los resultados obtenidos a través del método DNS y HPLC-IR se seleccionaron las condiciones de mayor grado de hidrólisis, ácida y enzimática, para posteriormente ser derivatizadas con PMP, y analizadas y cuantificadas por el equipo HPLC-DAD. En el caso de los estándares de monosacáridos, y de los hidrolizados ácidos y enzimáticos, 2 mL de cada solución se mezclaron en un tubo falcon de 14 mL con 200 uL de solución de PMP 0,5 M, y 100 uL de solución de NaOH 0,3 M, se homogenizó y se mezcló en un vortex. La mezcla se incubó en un baño termostático a 70° C durante 30 minutos, y una vez

concluido el tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente, y posteriormente se le agregó 100 uL de solución acuosa de HCl 0,3 M para su neutralización. La solución resultante se extrajo cinco veces añadiendo 4 mL de cloroformo como disolvente orgánico, seguido de una mezcla vigorosa y centrifugación a 3500 rpm durante 5 minutos con el fin de eliminar el exceso de PMP. La capa orgánica se eliminó cuidadosamente tras cada extracción y la capa acuosa final se filtró a través de un filtro de membrana de celulosa de 0,22 μm . Finalmente, el filtrado se introduce en los viales de inyección del equipo HPLC-DAD para su posterior lectura (Bahamondes, 2018).

Condiciones del equipo HPLC-DAD. Columna Kromasil 100-5C18, 150 X 4,6, fase móvil buffer fosfato: acetonitrilo (79:21) 0,04 M, pH 8,0, temperatura 30°C, longitud de onda 245 nm, velocidad de flujo 0,5 mL/min.

Una vez analizadas las muestras mediante HPLC-DAD se verificará el método validado por Natalia Bahamondes de determinación de azúcares neutros a través de HPLC-DAD, verificando si los resultados correspondientes al número de platos teóricos (NPT) y el factor de asimetría (A_s) cumplen con los límites propuestos en la USP 35, (2012) como se muestra en la **Tabla 6**.

Tabla 6 Parámetros de idoneidad y límites propuestos (USP 35, 2012)

Parámetro	Valor límite
Número de Platos Teóricos (NPT)	$N > 2000 \text{ m}^{-1}$
Factor de asimetría	$A_s \leq 2$

4 RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados (realizados por triplicado) de las muestras hidrolizadas en condiciones ácidas tratadas con ácido sulfúrico, trifluoroacético y ácido clorhídrico, y en condiciones enzimáticas con los preparados enzimáticos Viscozyme L, Rohapect DA6L, y Pectinex Ultra SPL, ambas condiciones ácida y enzimática, fueron analizadas a través de tres métodos, el primero corresponde al poder de azúcares reductores de Miller, el segundo utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución con detector de índice de refracción (HPLC-IR), y finalmente usando cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD). Además, se presentan los resultados que verifican la validación del método analítico HPLC-DAD realizado por Bahamondes (2018).

4.1 Determinación de las condiciones de hidrólisis ácida y enzimática a través del método de Miller

En la **Figura 4** se muestra el resultado del método de determinación del poder reductor de azúcares de Miller, correspondiente a las muestras provenientes de la hidrólisis ácida de pectina cítrica comercial con ácido sulfúrico 0,05 y 1 M, trifluoroacético 1 M, y ácido clorhídrico 2 M incubadas en un baño termorregulado a 100 °C, y analizadas a intervalos de tiempo de 15, 30 y 60 minutos. Se observa que la mayor concentración de azúcares reductores la aporta el H₂SO₄ 0,05 M, le sigue TFA 1 M, y en menor medida H₂SO₄ 1M y HCl 2 M.

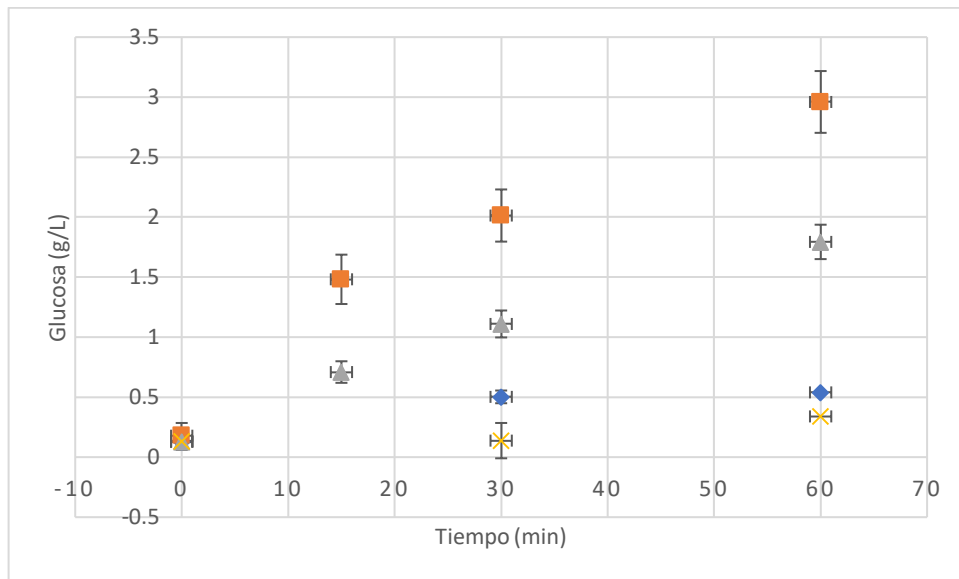


Figura 4 Hidrólisis de pectina cítrica comercial en condiciones ácidas incubadas en baño termostático acuoso a 100 °C a distintos intervalos de tiempo (Media \pm IC 95%). H₂SO₄ 1M (◆), H₂SO₄ 0,05 M (■), TFA 1M (▲), HCl 2M (×).

Al igual que en la hidrólisis de pectina en condiciones ácidas, también se analizó la hidrólisis de pectina en condiciones enzimáticas mediante el método de Miller. En las **Figuras 5, 6, 7, y 8**, se muestran los resultados obtenidos a través de la hidrólisis de pectina en condiciones enzimáticas con tres preparados comerciales Rohapect DA6L, Viscozyme L y Pectinex Ultra SPL a distintas concentraciones enzima/sustrato E/S 2, 4, y 10%, a tiempos de 3 y 24 horas en un incubador de agitación seco, y a dos temperaturas de 45 y 60 °C. Se observa que, en todas las condiciones evaluadas, el preparado comercial con el que se obtuvo la mayor concentración de azúcares reductores fue Viscozyme.

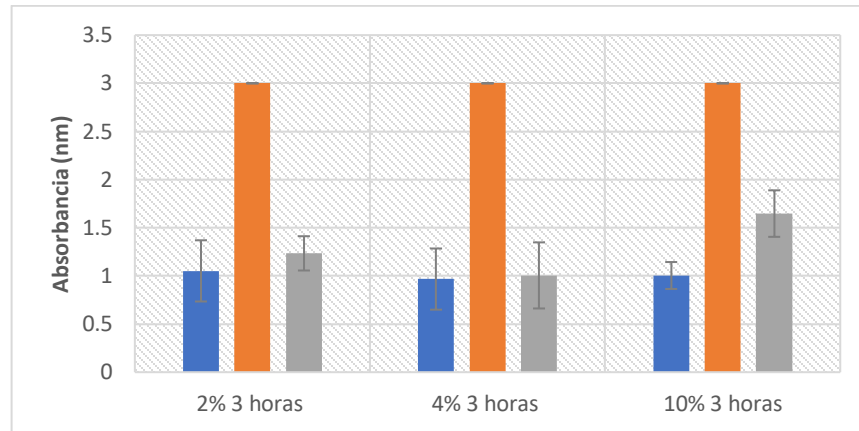


Figura 5 Hidrólisis de pectina cítrica comercial en condiciones enzimáticas con preparados comerciales durante 3 horas en incubador de agitación seco a 45 °C mediante el método DNS (Media \pm IC 95%). Rohapect (■), Viscozyme (■), y Pectinex (■).

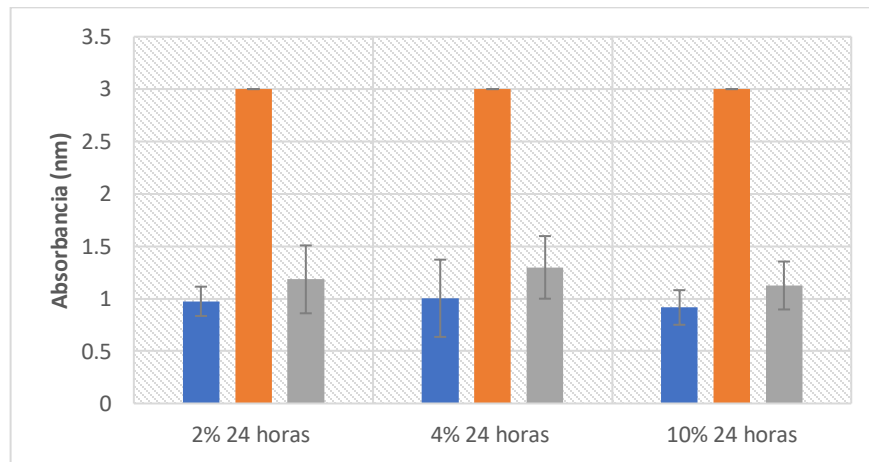


Figura 6 Hidrólisis de pectina cítrica comercial en condiciones enzimáticas con preparados comerciales durante 24 horas en incubador de agitación seco a 45 °C mediante el método DNS (Media \pm IC 95%). Rohapect (■), Viscozyme (■), y Pectinex (■).

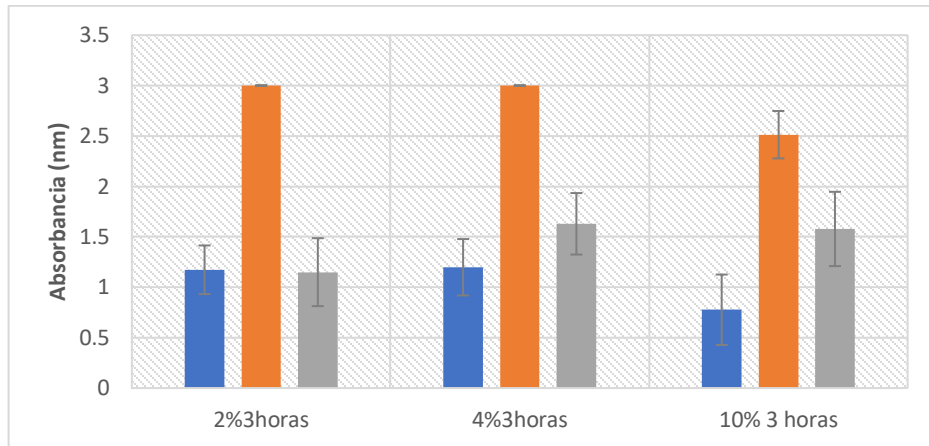


Figura 7 Hidrólisis de pectina cítrica comercial en condiciones enzimáticas con preparados comerciales durante 3 horas en incubador de agitación seco a 60 °C mediante el método DNS (Media \pm IC 95%). Rohapect (■), Viscozyme (■), y Pectinex (■).

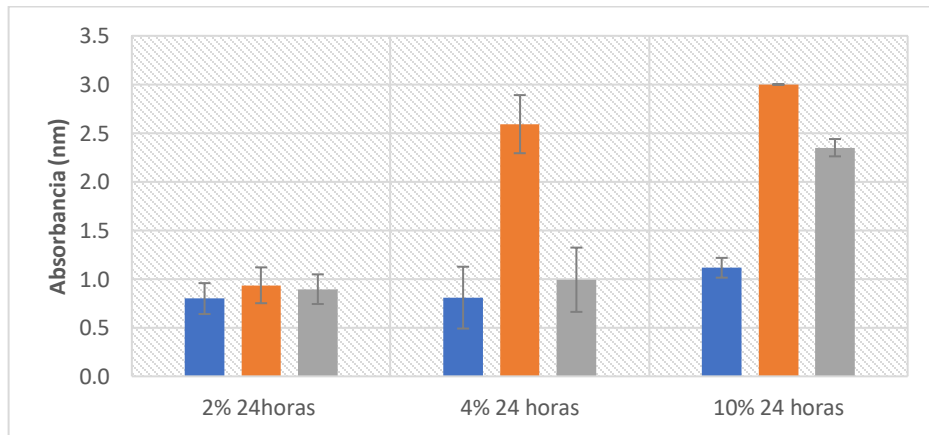


Figura 8 Hidrólisis de pectina cítrica comercial en condiciones enzimáticas con preparados comerciales durante 24 horas en incubador de agitación seco a 60 °C mediante el método DNS (Media \pm IC 95%). Rohapect (■), Viscozyme (■), y Pectinex (■).

Tomando en cuenta que con el preparado Viscozyme se obtuvo la mayor concentración de azúcares reductores en todas las condiciones evaluadas anteriormente, se observó además en este mismo preparado que el efecto de la temperatura a lo largo del tiempo fue más uniforme a 45 °C que a 60 °C, razón por la cual se seleccionó esta temperatura para análisis futuros.

4.2 Determinación de monosacáridos mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector Índice de Refracción (HPLC- IR)

Cabe destacar que las condiciones de operación para los siguientes análisis fueron definidas a partir de los resultados obtenidos por HPLC-IR. Este equipo se encuentra en las dependencias de la Escuela de Ingeniería Bioquímica de la PUCV a cargo de la profesora Carmen Soto Maldonado.

En las **Figuras 9, 10, 11 y 12** se muestran los perfiles cromatográficos de los controles (sin temperatura) y muestras provenientes de la hidrólisis de pectina en condiciones ácidas con ácido sulfúrico 0,05 y 1 M, TFA 1 M, y HCl 2 M incubados en baño termostático acuoso a 100 °C durante 60 minutos. Se observa que no hubo diferencia entre controles y las muestras hidrolizadas. En general, se observa que el tiempo de hidrólisis con los ácidos evaluados no fue suficiente, ya que no aparecen los Peak de grado de Polimerización (DP 1) los cuales corresponden a monosacáridos libres.

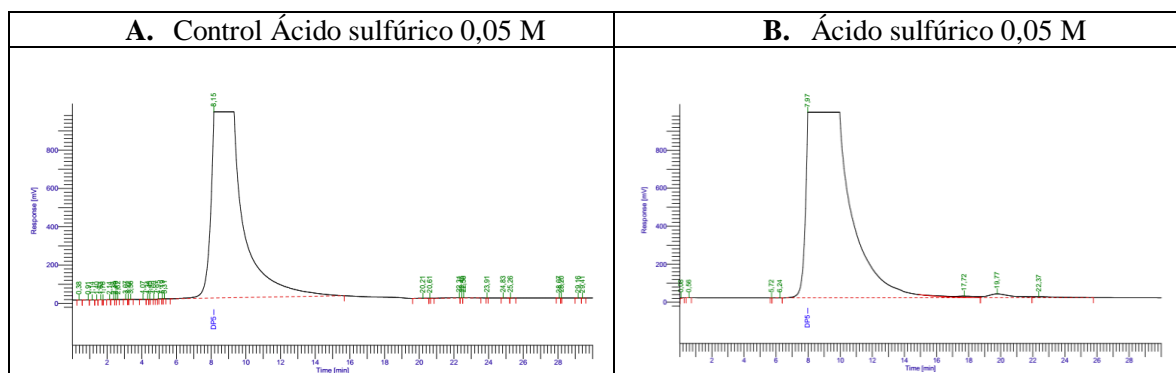


Figura 9 Hidrólisis de pectina cítrica comercial con H₂SO₄ 0,05 M **A.** Control H₂SO₄ 0,05 M sin temperatura **B.** Hidrólisis de pectina cítrica comercial con H₂SO₄ 0,05 M en baño termostático a 100 °C durante 60 minutos.

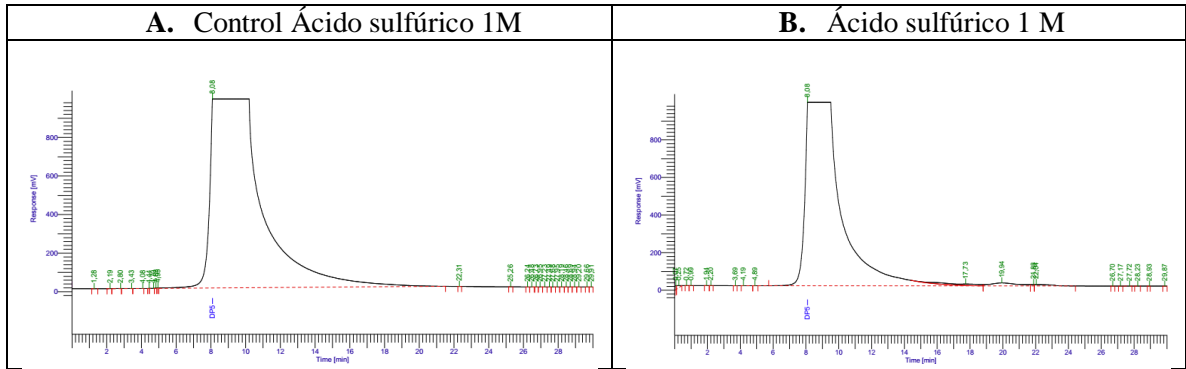


Figura 10 Hidrólisis de pectina cítrica comercial con H_2SO_4 1M. **A.** Control H_2SO_4 1M sin temperatura. **B.** Hidrólisis de pectina cítrica comercial con H_2SO_4 1M en baño termostático a 100°C durante 60 minutos.

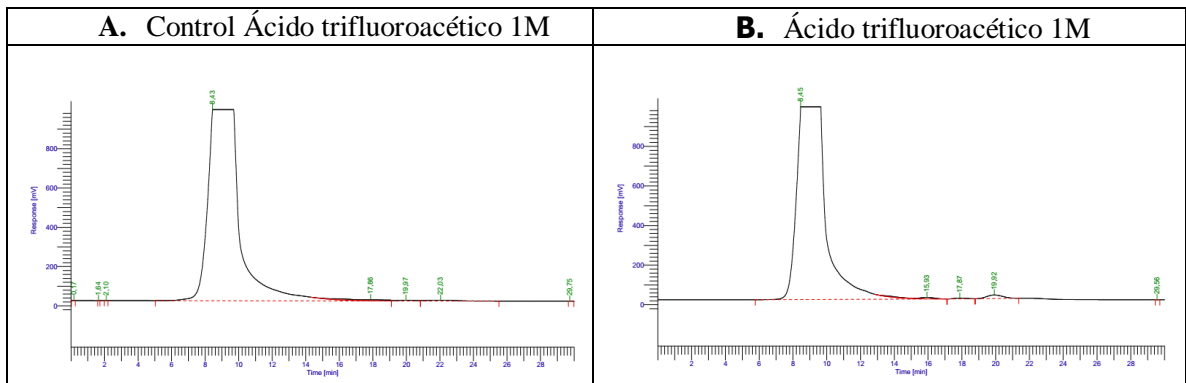


Figura 11 Hidrólisis de pectina cítrica comercial con TFA 1 M **A.** Control TFA 1 M sin temperatura **B.** Hidrólisis de pectina cítrica comercial con TFA 1 M en baño termostático a 100°C durante 60 minutos.

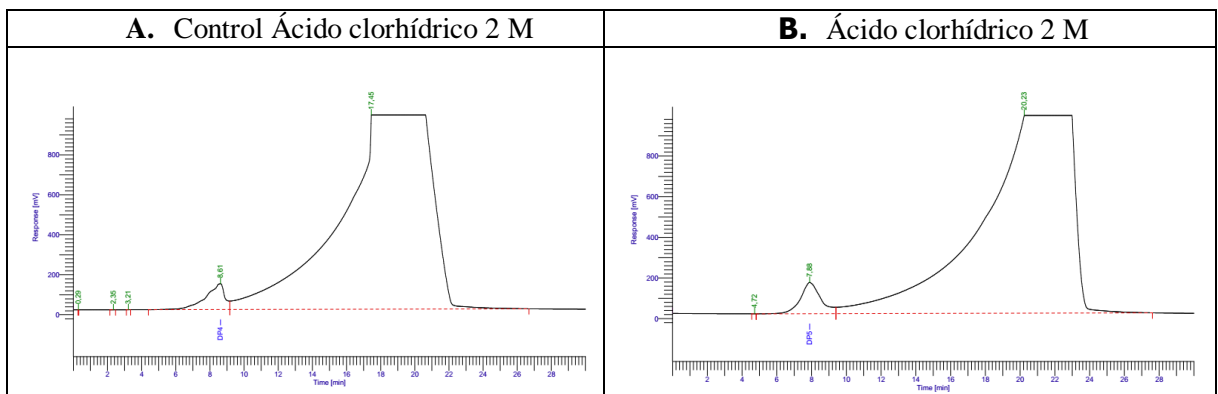


Figura 12 Hidrólisis de pectina cítrica comercial con HCl 2 M **A.** Control HCl 2 M sin temperatura **B.** Hidrólisis de pectina cítrica comercial con HCl 2 M en baño termostático a 100°C durante 60 minutos.

Las **Figuras 13, 14, 15 y 16** muestran los perfiles cromatográficos de hidrólisis de pectina en condiciones enzimáticas. **14. A. Viscozyme, 15. B. Rohapect y 16. C. Pectinex.** Cada multienzima fue evaluada a las condiciones de concentración E/S de 2, 4 y 10% a dos tiempos 3 y 24 horas. Se observa que, en todas las condiciones evaluadas (**A.1-6**) con el preparado enzimático Viscozyme se obtienen cuatro DP1 debido a la despolimerización producto de la hidrólisis de la pectina; también se puede observar un aumento en el área de monosacáridos al aumentar la concentración de la enzima. Con respecto a **B. Rohapect**, se observa en **B.1-4** un solo sacárido DP 1, sin embargo, en la condición **B.5 y 6** que corresponde a la enzima al 10% aparece además otro DP1 con un área muy pequeña. Finalmente con **C. Pectinex**, se observan dos DP1, presentándose uno de ellos con un área muy reducida.

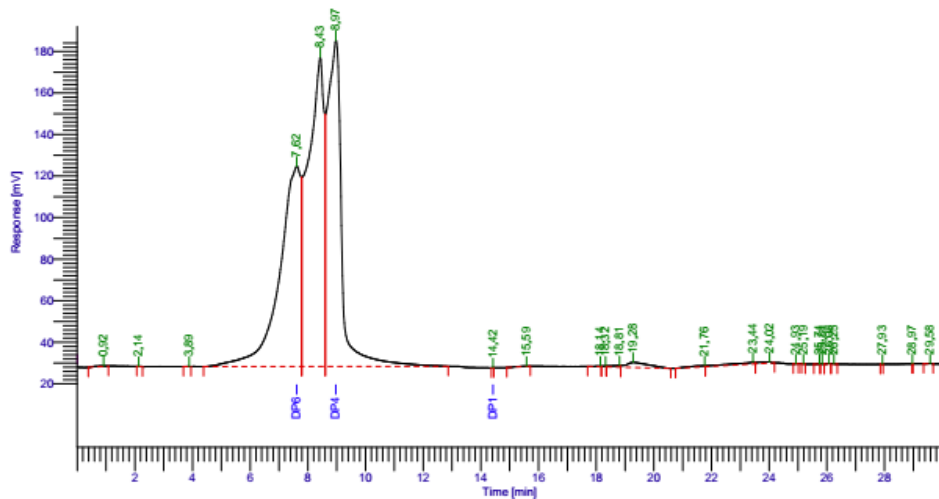


Figura 13 Cromatograma de control, solución de pectina en agua (sin enzima) IR. No se observa despolimerización de la pectina a monómeros significativa.

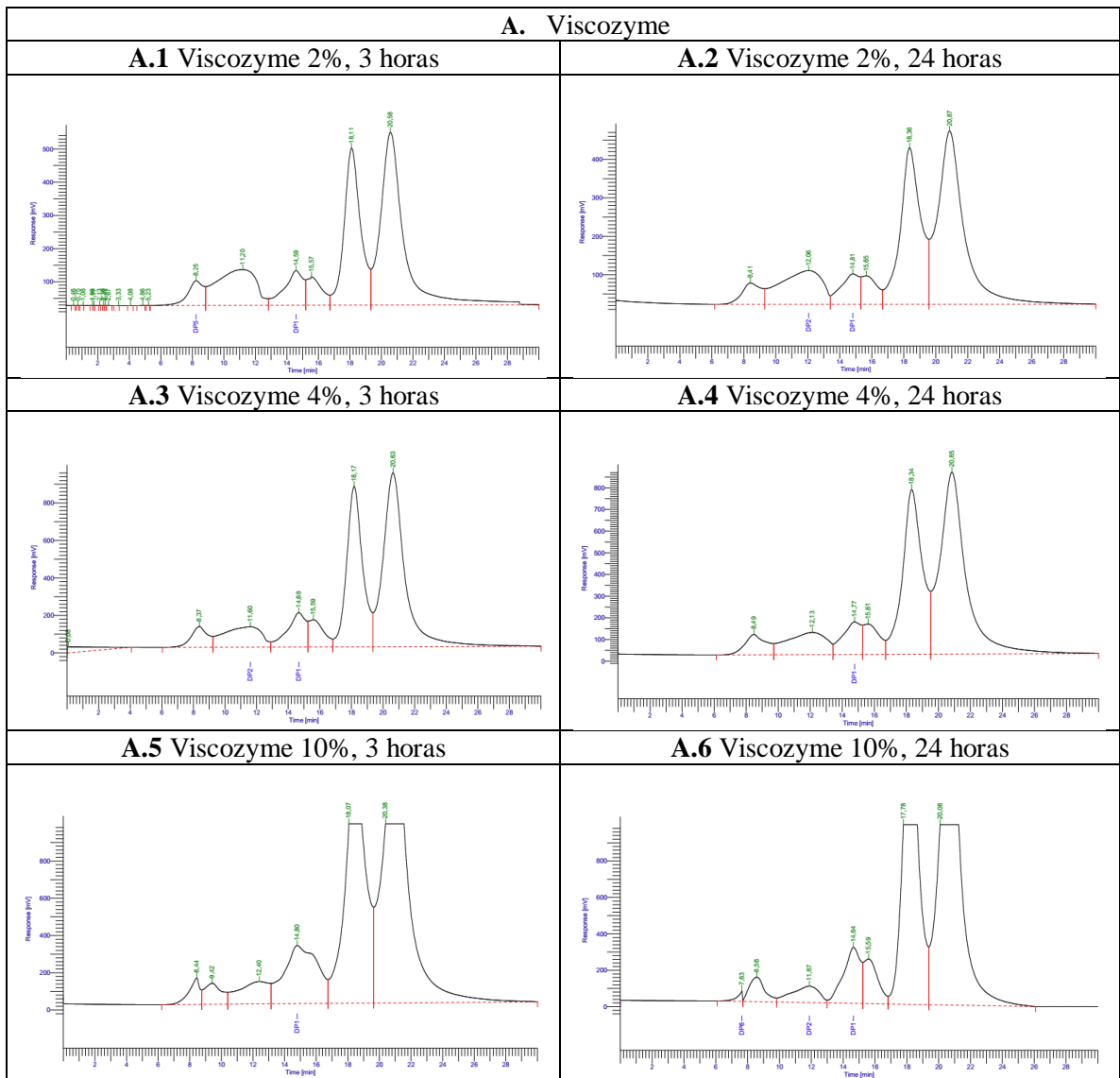


Figura 14 Cromatogramas de hidrólisis de pectina cítrica comercial en condiciones enzimáticas en incubador de agitación seco a 45 °C. **A.1** Viscozyme 2% 3 horas. **A.2** Viscozyme 2% 24 horas. **A.3** Viscozyme 4% 3 horas. **A.4** Viscozyme 4% 24 horas. **A.5** Viscozyme 10% 3 horas. **A.6** Viscozyme 10% 24 horas.

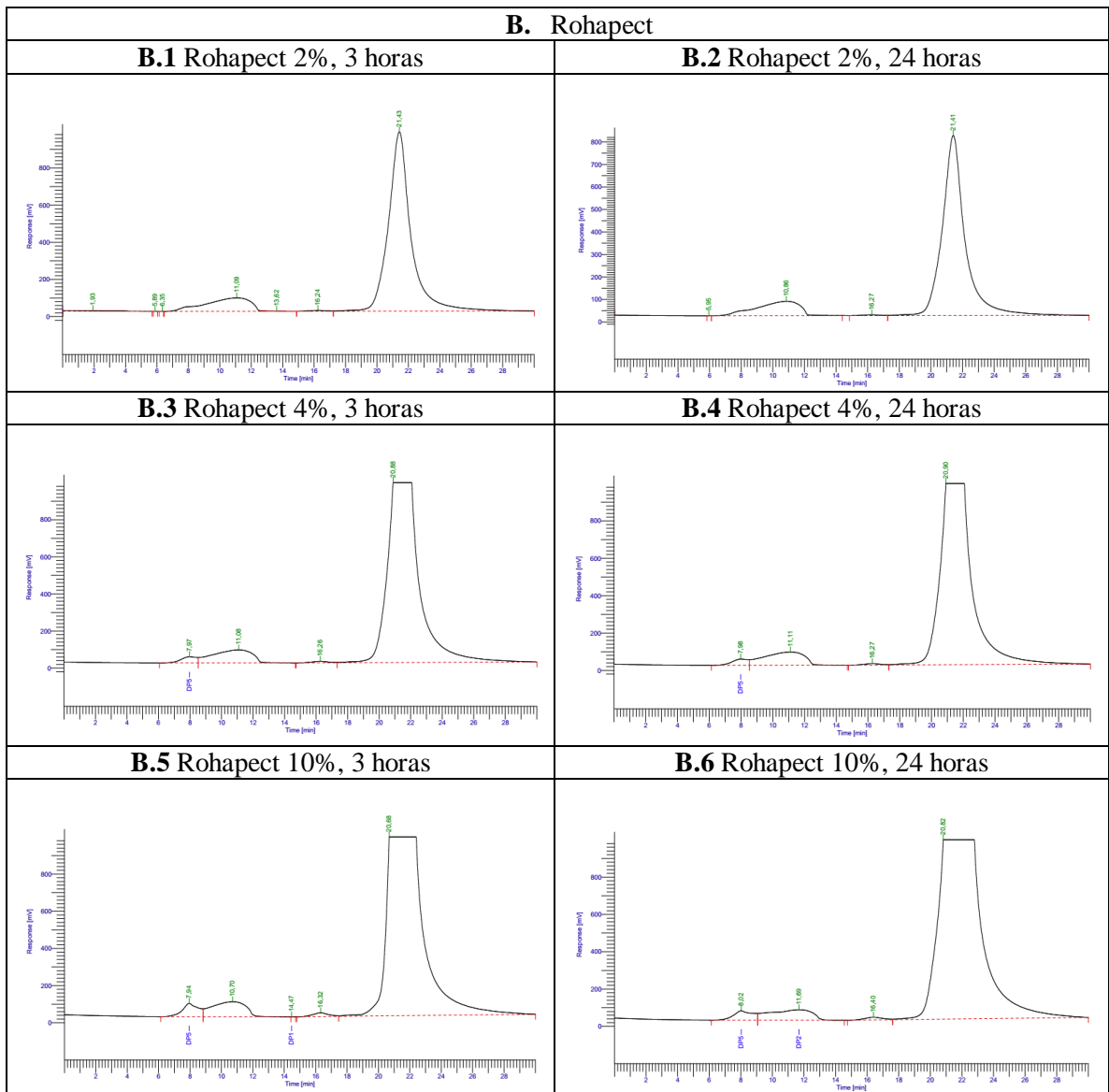


Figura 15 Cromatogramas de hidrólisis de pectina en condiciones enzimáticas en incubador de agitación seco a 45 °C **B.1** Rohapect 2% 3 horas. **B.2** Rohapect 2% 24 horas. **B.3** Rohapect 4% 3 horas. **B.4** Rohapect 4% 24 horas. **B.5** Rohapect 10% 3 horas. **B.6** Rohapect 10% 24 horas.

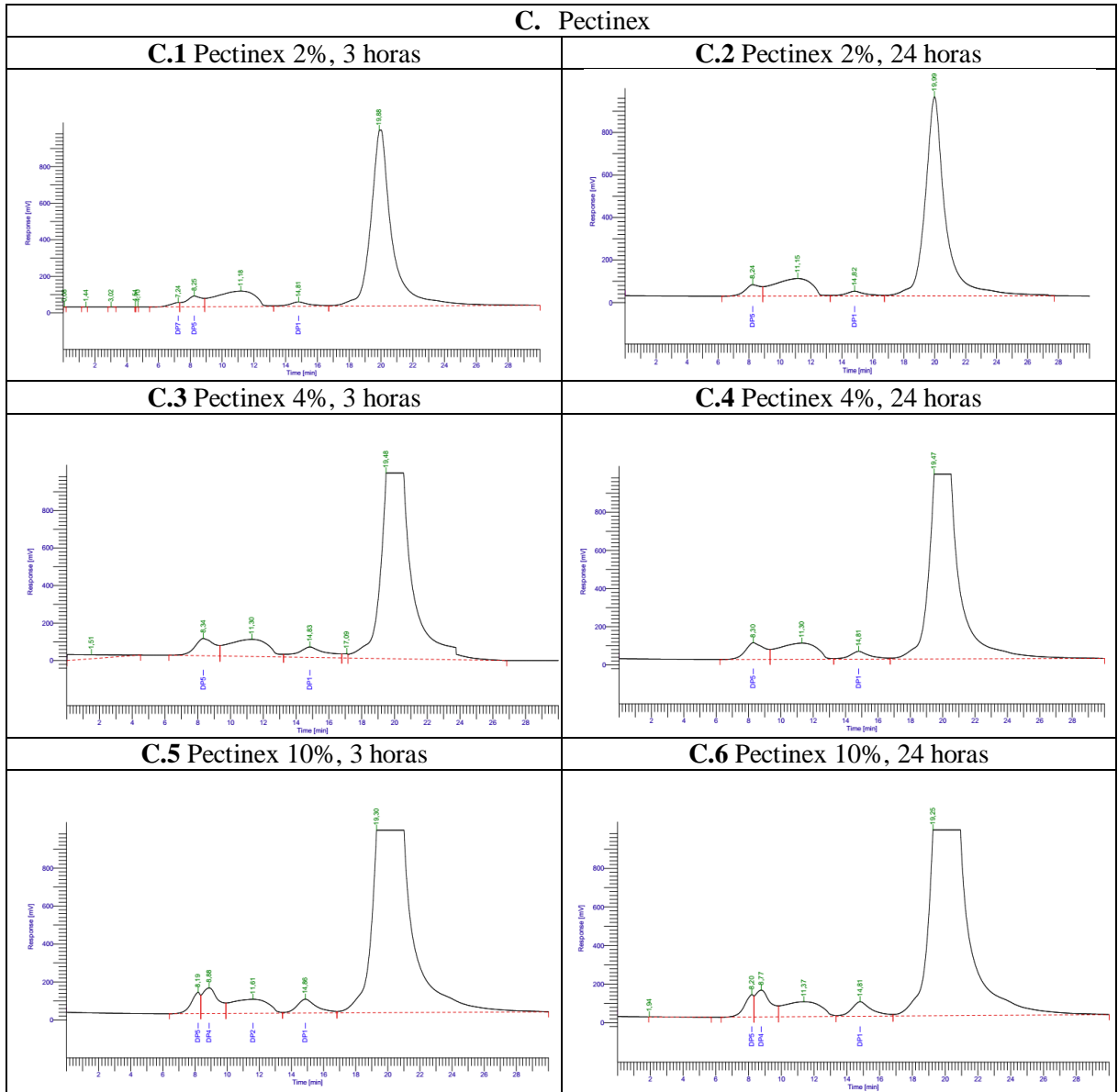


Figura 16 Cromatogramas de hidrólisis de pectina en condiciones enzimáticas en incubador de agitación seco a 45 °C. **C.1** Pectinex 2% 3 horas. **C.2** Pectinex 2% 24 horas. **C.3** Pectinex 4% 3 horas. **C.4** Pectinex 4% 24 horas. **C.5** Pectinex 10% 3 horas. **C.6** Pectinex 10% 24 horas.

Una vez obtenidos los resultados mediante la técnica de Miller y HPLC-IR, se definieron las condiciones de operación para el siguiente análisis, HPLC con detector de arreglo de diodos previa derivatización con PMP.

Como se mostró en los resultados mencionados, se obtuvo la mayor cantidad de monosacáridos con el preparado Viscozyme a 45 °C, es por esta razón, que se procedió a trabajar con esta condición a 24 y 48 horas, seleccionando una concentración E/S de 4 % evitando saturar el detector.

4.3 Determinación de azúcares mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Arreglo de Diodos (HPLC-DAD)

En las **Figuras 17 y 18** se muestran los resultados obtenidos para la hidrólisis de pectina en condiciones enzimáticas con la multienzima Viscozyme al 4% E/S a tiempos de 24 y 48 horas, donde se logra observar una clara hidrólisis a monosacáridos con respecto a los controles. En los cromatogramas de las **Figuras 17. B y 18. B** se observa manosa, ácido galacturónico (AGA), glucosa, y es probable que, como mezcla, xilosa, arabinosa y galactosa en la última señal. Estos fueron identificados a través de los estándares que se hicieron en las mismas condiciones de derivatización con PMP. Como se puede observar, en este tipo de hidrólisis el método analítico no logró separar efectivamente la xilosa, arabinosa y galactosa, en el cual los tiempos de retención (TR) son similares. Además, se observa una similitud al comparar los cromatogramas obtenidos con Viscozyme 4 % 24 horas entre HPLC-IR y DAD.

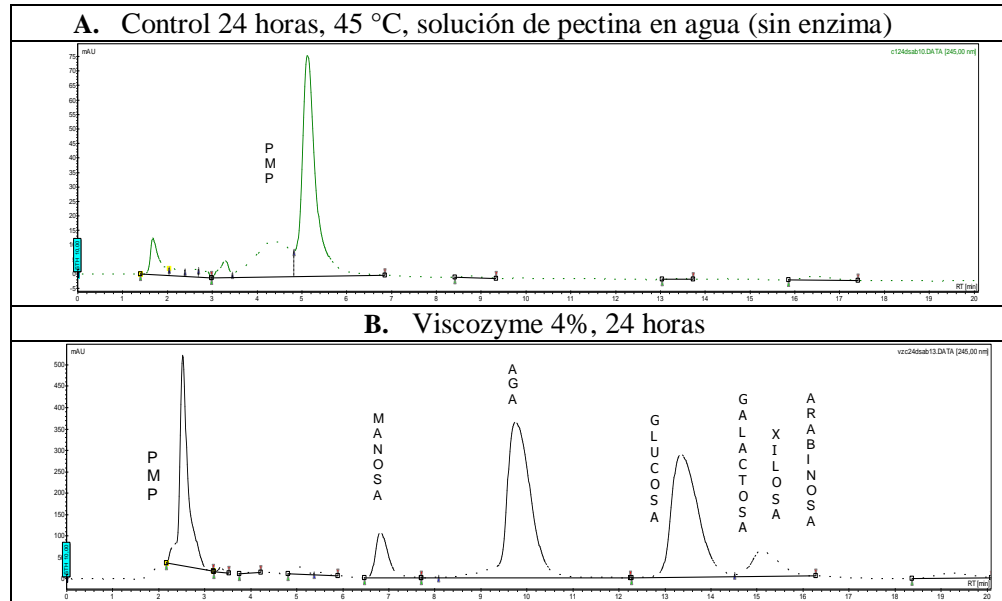


Figura 17 Perfiles cromatográficos de hidrólisis de pectina en condiciones enzimáticas en incubador de agitación seco a 45 °C de muestras derivatizadas con PMP analizadas por HPLC-DAD y seleccionada a través del método IR. **A.** Control 24 horas. **B.** Viscozyme 4%, 24 horas.

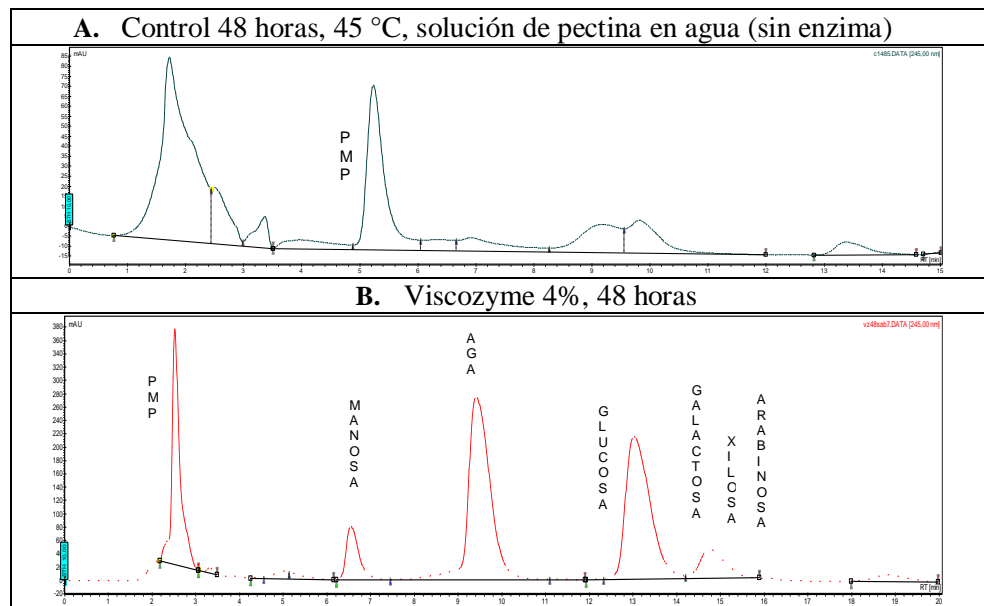


Figura 18 Perfiles cromatográficos de hidrólisis de pectina en condiciones enzimáticas en incubador de agitación seco a 45 °C de muestras derivatizadas con PMP analizadas por HPLC-DAD y seleccionada a través del método IR. **A.** Control 48 horas. **B.** Viscozyme 4% 48 horas.

Para confirmar que los perfiles obtenidos mediante HPLC-IR y DAD son comparables, se decidió analizar hidrolizados de pectina en condiciones ácidas, observándose también un resultado similar.

Los resultados de las **Figuras 19, 20, 21 y 22** fueron realizados por el método de cromatografía líquida HPLC-DAD usando como agente derivatizante PMP. Los resultados fueron muy similares a los obtenidos con un proceso sin derivatización con IR. Además, se observa que no hay diferencia entre incubar las muestras en autoclave (120 °C) y baño termostático (100 °C) y se observa una pequeña señal no significativa desde el punto de vista de la concentración identificado como ácido galacturónico.

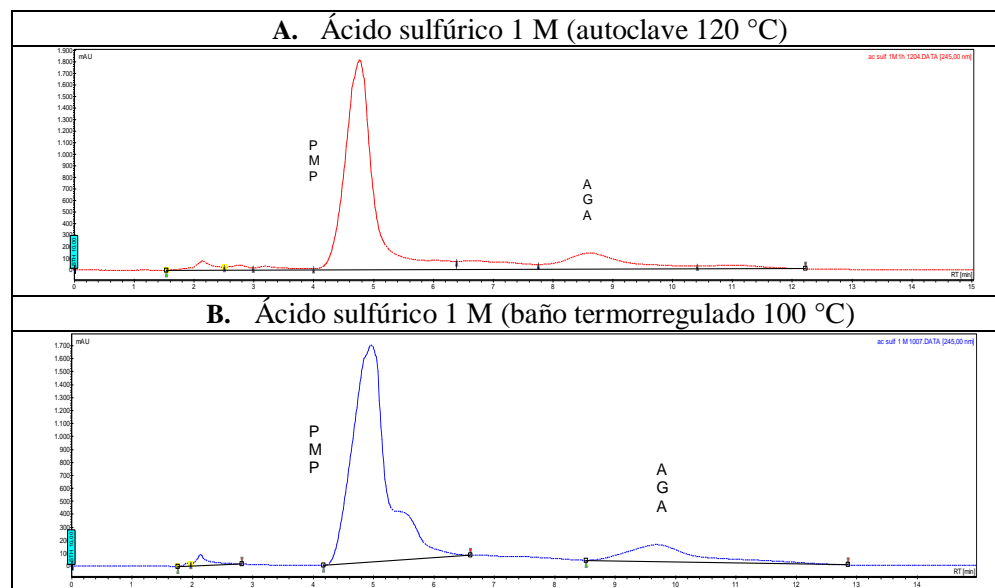


Figura 19 Perfiles cromatográficos de hidrólisis de pectina en condiciones ácidas de muestras derivatizadas con PMP incubadas durante 60 minutos. **A.** Ácido sulfúrico 1M autoclave 120 °C. **B.** Ácido sulfúrico 1 M baño termostático 100 °C.

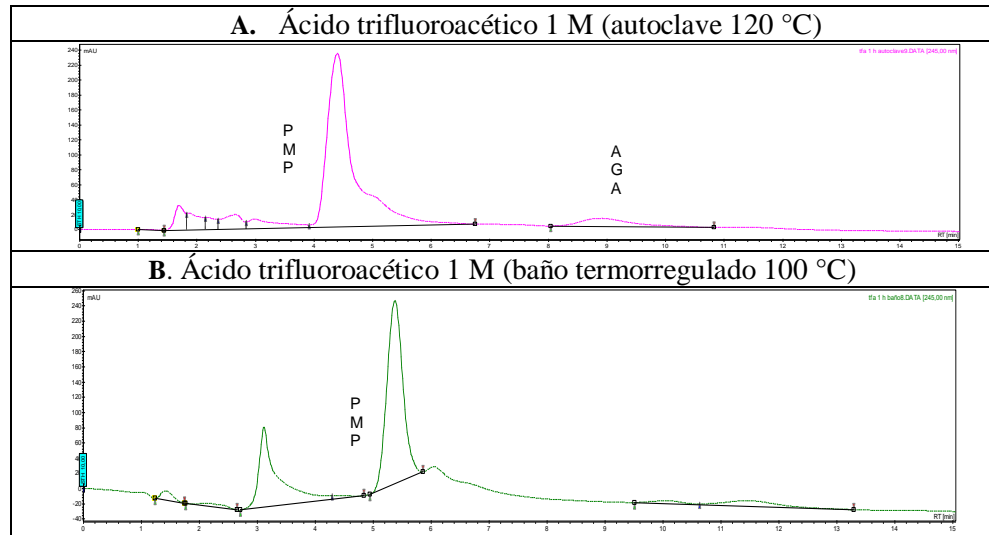


Figura 20 Perfiles cromatográficos de hidrólisis de pectina en condiciones ácidas de muestras derivatizadas con PMP incubadas durante 60 minutos. **A.** Ácido trifluoroacético 1 M autoclave 120 °C. **B.** Ácido trifluoroacético 1 M baño termostático 100 °C.

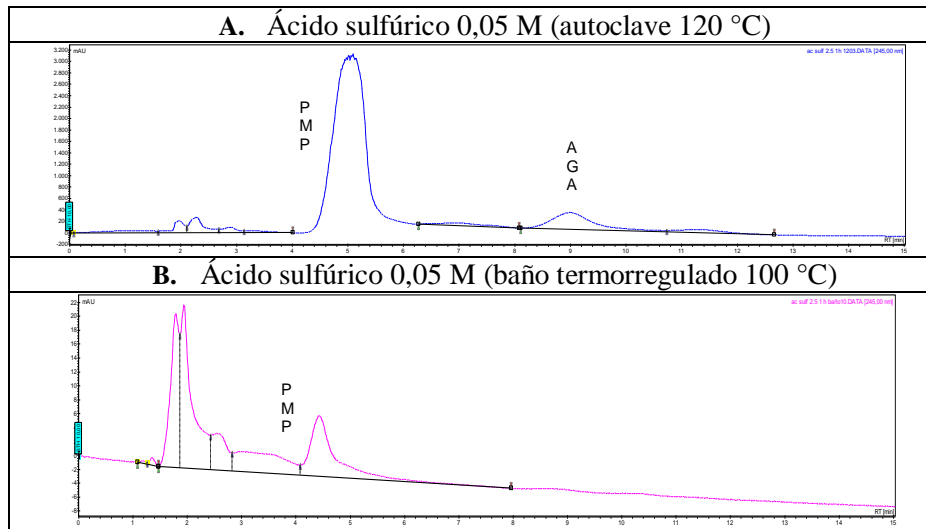


Figura 21 Perfiles cromatográficos de hidrólisis de pectina en condiciones ácidas de muestras derivatizadas con PMP incubadas durante 60 minutos. **A.** Ácido sulfúrico 0,05 M autoclave 120 °C. **B.** Ácido sulfúrico 0,05 M baño termostático 100 °C.

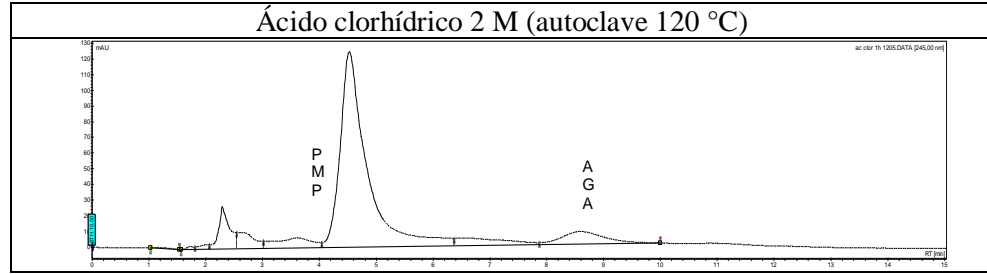


Figura 22 Perfiles cromatográficos de hidrólisis de pectina en condiciones ácidas de muestras derivatizadas con PMP incubadas durante 60 minutos. HCl 2 M 100 °C.

Finalmente, en esta investigación se verificó el método validado por Natalia Bahamondes en su internado de determinación de azúcares neutros a través de HPLC-DAD. En la **Tabla 7** se observa la verificación del método analítico.

Tabla 7 Parámetros de idoneidad obtenidos y límites propuestos (USP 35, 2012)

Parámetro	Resultados	Valor límite	Cumple
Número de Platos Teóricos (NPT)	4,130,89	$N > 2000 \text{ m}^{-1}$	Sí
Factor de asimetría	1,41	$As \leq 2$	Sí

5 DISCUSIÓN

Con el objetivo principal de establecer un método de hidrólisis de polisacáridos pécticos rápido, preciso y cuantitativo para el análisis de la composición de monosacáridos mediante cromatografía líquida de alta resolución, en esta investigación se comparó el grado de liberación de monosacáridos en dos tipos de condiciones hidrolíticas, una con ácidos y la otra con enzimas, evaluando la influencia de ellas en cuanto al tipo de sustancia, la concentración, la temperatura y el tiempo.

Para llevar a cabo el objetivo anterior, en primer lugar, se analizaron las muestras de hidrolizados de pectina cítrica comercial a través de la técnica de Miller (DNS), debido a dos razones: la primera es que esta técnica es un método de screening rápido, eficaz y barato capaz de analizar un gran número de muestras y proporcionar resultados meramente cualitativos en un corto periodo de tiempo, reduciendo así los costos y los tiempos de análisis, guiando en este caso el futuro proceder de las muestras; y, la segunda razón, es por su fundamento, ya que este método revela la disminución de masa molecular del polisacárido debido a la eliminación de azúcares neutros manteniendo su columna vertebral de ácido galacturónico prácticamente intacta, estos azúcares liberados, en un medio alcalino, pueden reducir el ácido 3,5-dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, donde el grupo aldehído libre del azúcar se oxida a ácido aldónico, y el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico es un producto de color naranja, donde la intensidad del color depende de la concentración del azúcar reductor, alcanzando un color rojizo - café en los hidrolizados de pectina cítrica tratados enzimáticamente en este trabajo, en comparación con las muestras tratadas con ácidos en las cuales el color no fue tan intenso.

Como se mencionó anteriormente, la técnica de Miller es un método colorimétrico que permite la cuantificación del poder reductor de azúcares a través de un análisis espectrofotométrico.

Aclarado lo anterior, de acuerdo a los resultados obtenidos a través del método DNS en la **Figura 4**, correspondientes a una muestra de pectina cítrica hidrolizada con diferentes ácidos, entre ellos, ácido sulfúrico 0,05 M y 1 M, ácido trifluoroacético 1 M, y ácido clorhídrico 2 M, la mayor concentración de azúcares reductores se obtuvo cuando se empleó ácido sulfúrico 0,05 M, alcanzando un máximo de 2,951 g/L a los 60 minutos de incubación en un baño termostático acuoso, le sigue el proceso con ácido trifluoroacético 1 M con una concentración máxima a los 60 minutos de 2,066 g/L. A través de este método se podría sugerir trabajar con ácido sulfúrico 0,05M o ácido trifluoroacético 1M para hidrolizar la pectina en estudio, y ser analizada posteriormente por cromatografía líquida de alta resolución.

Si bien los resultados obtenidos por el método de Miller en el caso de hidrólisis ácida evidencian la presencia de azúcares reductores que corresponderían a productos de hidrólisis en la muestra de pectina analizada, los resultados obtenidos de las mismas muestras anteriormente mencionadas, en las mismas condiciones, a través de la técnica HPLC-IR arrojan un resultado diferente. El HPLC-IR es la segunda técnica de selección que se utilizó debido a que una de las ventajas de este método, es que no requiere derivatización previa de los monosacáridos, y de esta forma hace el proceso de análisis más rápido, sin embargo, el equipo es de elevado costo económico en comparación con el análisis HPLC-DAD previa derivatización con PMP.

Como se observó en los cromatogramas de las **Figuras 9, 10, 11 y 12** con H_2SO_4 0,05 y 1 M, TFA 1 M, y HCl 2 M no aparecen DP1, sino que, aparecen sacáridos con grado de polimerización mayor tal como DP4 y DP5, es decir, oligómeros de 4 y 5 unidades de monosacáridos unidos. Por lo tanto, para el caso de HPLC-IR, se puede decir que si hubo reducción del polisacárido péctico, pero no fue suficiente para hidrolizar a monosacáridos. En los marcos de las observaciones anteriores, se puede concluir que el poder reductor entregado por el método de Miller, no se puede atribuir a los monómeros de la pectina, como glucosa, ramnosa, xilosa, arabinosa, entre otros, por sí solos,

debido a que el extremo reductor que participa en la reacción con el ácido dinitrosalicílico puede estar formando parte tanto de un disacárido como de un oligosacárido, razón por la que no serían detectados en HPLC-IR.

Para respaldar los resultados obtenidos por HPLC-IR, se llevaron las muestras de hidrólisis ácida a HPLC-DAD previa derivatización con PMP, en las mismas condiciones mencionadas anteriormente, a una temperatura de 100 °C e incubadas en baño termostático acuoso durante 1 h y, además, a una nueva condición más drástica (en autoclave a 120 °C) durante el mismo tiempo, obteniéndose resultados similares con un leve Peak, no significativo desde el punto de vista de la concentración, identificado como ácido galacturónico (**Figuras 19, 20, 21 y 22**) y sin mayor diferencia entre tratar las muestras con baño termostático acuoso 100 °C y autoclave 120 °C.

A pesar de las condiciones de hidrólisis ácidas evaluadas recomendadas por los autores mencionados en el método, el resultado fue que no hubo despolimerización de la pectina. Esto sugiere que las condiciones de hidrólisis deben ser más drásticas para lograr escindir el enlace glicosídico. Es importante mencionar también que, durante una hidrólisis ácida, los monosacáridos liberados son susceptibles a degradación en presencia de ácido caliente, razón por la cual pudo haber habido degradación de la muestra escapándose del análisis de monosacáridos por HPLC (Brummer & Cui, 2005). Una temperatura demasiado alta y ácidos concentrados pueden causar la formación de derivados del furfural (**Figura 23**), lo que hace imposible la determinación precisa de azúcares. Los derivados de furfural contienen un carbonilo reductor, el cual podría justificar los resultados de hidrólisis ácida obtenidos a través del método DNS, pero sin detección por HPLC. El H₂SO₄ al ser un ácido fuerte, produce destrucción de la muestra, explicando las diferencias existentes entre usar una concentración de ácido de 0,05 M en comparación a una de 1 M.

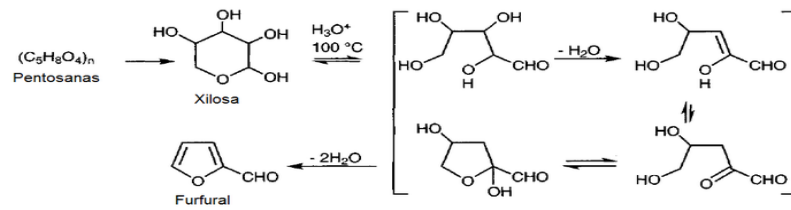


Figura 23 Reacción de transformación de azúcares a furfural en medio ácido.

Los autores Boual *et al.*, (2012), concluyeron que el uso de TFA 4 M a $80\text{ }^\circ\text{C}$ durante 4 horas es el reactivo de elección para liberar monosacáridos de polisacáridos, de manera efectiva y menos destructivo, debido a que una ventaja del TFA con respecto a los otros ácidos es que es fácil de eliminar antes de un análisis HPLC por ser un ácido volátil, sin embargo, la desventaja es que se debe contar con una corriente de nitrógeno. El ácido remanente es importante desde el punto de vista de la toxicidad, ya que si se requiere la modificación de la pectina para ser ingerida por el ser humano, debería el resultado ser inocuo sin restos de ácidos. Además, Biermann (1988); De Ruiter *et al.*, (1992); y el estudio de Wikiera *et al.*, (2015), concuerdan y afirman que los enlaces glicosídicos no presentan la misma resistencia y susceptibilidad al ácido, siendo esta una desventaja del método ácido, lo que resulta en una hidrólisis gradual y no completa y específica como en el caso de las enzimas.

Por las razones anteriores, la hidrólisis con enzimas representa una alternativa interesante a recomendar debido a que se utilizan condiciones suaves y controladas de temperatura, pH y presión, y poseen una alta especificidad de sustrato y gran actividad catalítica. Las acciones enzimáticas no son tóxicas para la salud, y una vez realizada su labor, las enzimas pueden ser inactivadas y formar parte de la muestra sin causar alteración alguna, ni hacer daño. Por otra parte, una de sus limitaciones es que son caras. Sin embargo, es conveniente hacer un balance de las ventajas y

desventajas que trae consigo llevar a cabo una determinada reacción con enzimas o con métodos químicos.

De manera semejante a las muestras provenientes de la hidrólisis ácida, las muestras de solución de pectina en agua tratadas en condición enzimática también fueron analizadas por la técnica de Miller, y posteriormente llevadas a HPLC-IR y DAD. En esta investigación se trabajó con tres tipos de preparados enzimáticos comerciales Viscozyme L, Rohapect Da6L, y Pectinex Ultra SPL, evaluados a una concentración de 2, 4, y 10 % enzima/sustrato E/S, durante dos intervalos de tiempo, a las 3 horas y a las 24 horas, y a dos temperaturas diferentes, 45 y 60 °C.

Si se observan los resultados de las **Figuras 5, 6, 7, y 8** la mayor hidrólisis se obtuvo con el preparado enzimático Viscozyme en la mayoría de las condiciones evaluadas, obteniéndose en varias oportunidades el valor máximo de absorbancia entregado por el espectrofotómetro, es por esta razón que los valores no fueron transformados a concentración porque es probable que en algunos casos la concentración sea mucho mayor que el valor calculado, sumado a que la finalidad de la técnica de Miller en esta investigación es solo para definir y seleccionar en qué condición está más hidrolizada la pectina. Además, se obtuvo un comportamiento uniforme y máxima hidrólisis de azúcares a los 45 °C a diferencia de 60 °C, lo que concuerda con las recomendaciones del proveedor Sigma-Aldrich que recomienda una temperatura de trabajo entre 40 y 55 °C. Por lo tanto, a través de los resultados obtenidos de la técnica de Miller de hidrólisis de pectina cítrica comercial en condiciones enzimáticas, se podría sugerir trabajar con esta multienzima a 45 °C para hidrolizar de manera eficiente la pectina. Por otro lado, en el caso de la hidrólisis de pectina en condiciones enzimáticas obtenidas por el método HPLC-IR, sí se observó hidrólisis a monosacáridos, a diferencia de esta técnica con la hidrolisis de pectina en condiciones ácidas. El método enzimático evidenció DP1 con los tres preparados enzimáticos utilizados, obteniéndose un máximo de cuatro DP1 con Viscozyme (**Figura 14.A**). Los resultados obtenidos concuerdan con el análisis DAD del

preparado Viscozyme 4 % E/S a 24 y 48 horas (**Figuras 17 y 18**) donde se obtuvieron también cuatro señales de monosacáridos identificados a través de los estándares como manosa, AGA, glucosa, galactosa, xilosa y arabinosa, apareciendo estos últimos tres con tiempos de retención similares, lo cual sugiere la necesidad de una futura mejora del método cromatográfico para su separación.

Según la actividad de cada preparado enzimático comercial se puede justificar su comportamiento y los resultados obtenidos. Novozyme (2008) señala que, “Pectinex Ultra SPL es una pectinasa, y contiene principalmente poligalacturonasa, pectintranseliminasa, pectinesterasa y hemicelulasas, siendo capaz de romper sustancias pécticas vegetales”, por lo tanto, Pectinex rompe el enlace glucosídico alfa (1,4) de las pectinas (**Figura 24**).



Figura 24 Mecanismo de acción de las enzimas PME, PG y PL.

Según lo señalado respecto a Pectinex, el resultado esperable sería obtener ácido galacturónico. Sin embargo, en la **Figura 16.C** no pudieron ser identificadas las dos señales obtenidas de DP1 debido a un problema técnico con la columna lo cual no permitió obtener los estándares de ácido galacturónico, xilosa, manosa, y arabinosa. Por otro lado, el preparado comercial Rohapect DA-6L (**Figura 15.B**), es una pectinasa con actividad poligalacturonasa y arabinasa (**Figura 25**). Tomando en cuenta su acción, se esperaría encontrar principalmente ácido galacturónico y arabinosa, sin

embargo, al igual que con Pectinex, fue imposible identificar la única señal obtenida de DP1 por la misma razón.

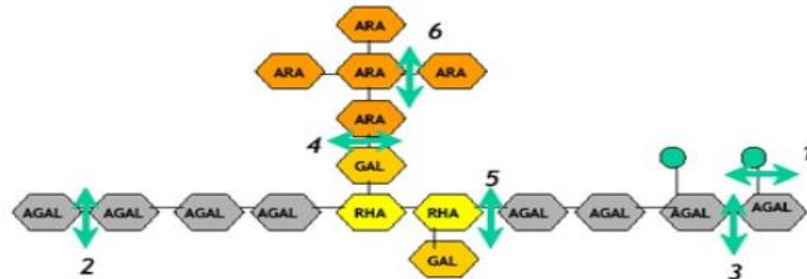


Figura 25 Mecanismo de acción de 1. Pectina esterasa 2. Poligalacturonasa 3. Pectina liasa 4. Arabinogalactanasa 5. Ramnoglucuronasa 6. Arabinasa.

Según el proveedor, Viscozyme L es un preparado líquido comercial que se caracteriza por una actividad pectinolítica muy alta (Brenes *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2005), contiene una amplia gama de carbohidrasas, incluidas la arabinasa, la celulasa, la B-glucanasa, la hemicelulasa y la xilanas, lo cual justifica su mayor actividad ante las otras enzimas. Con este preparado fue con el que se obtuvieron el mayor número de monosacáridos identificados en HPLC-DAD: manosa, ácido galacturónico, glucosa, galactosa, xilosa, y arabinosa.

A pesar de que no se pudieron identificar los monosacáridos obtenidos mediante el método HPLC-IR, no fue necesario para poder seleccionar el grado de mayor hidrólisis debido a que con Pectinex y Rohapect se obtuvieron menos DP1 que con Viscozyme, pudiendo precisar este último preparado como el que obtuvo el mayor grado de hidrólisis.

6 CONCLUSIONES

Las condiciones ácidas de hidrólisis de pectina con H_2SO_4 0,05 y 1 M, TFA 1 M, y HCl 2 M, no fueron suficientes para hidrolizar la pectina a monosacáridos, y que estos pudieran ser determinados por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

Las condiciones enzimáticas de hidrólisis de pectina fueron suficientes para hidrolizar a monosacáridos, permitiendo su identificación a través de Cromatografía Líquida de Alta Resolución, donde el mayor grado de hidrólisis lo entregó el preparado comercial Viscozyme.

Los perfiles cromatográficos de los hidrolizados pécticos fueron similares con HPLC-IR y DAD para la hidrólisis ácida y enzimática de pectina.

El método establecido y recomendado en esta investigación de hidrólisis de polisacáridos pécticos corresponde al enzimático con el preparado comercial Viscozyme 4% E/S a 45 °C durante 24 horas.

7 BIBLIOGRAFÍA

Albersheim, P., Nevins, D. J., English, P. D., & Karr, A. (1967). A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydrate Research*, 5(3), 340–345.

Arnous, A., Meyer, A. S. (2008). Comparison of methods for compositional characterization of grape (*Vitis vinifera* L.) and apple (*Malus domestica*) skins. *Food and Bioproducts Processing*, 86 (2), 79–86.

Bahamondes, N., (2018). Desarrollo de un método cromatográfico para la determinación del contenido de azúcares neutros y ácidos en polisacáridos pécticos obtenidos a partir de cáscara de plátano (*Musa Cavendish*). Universidad de Valparaíso, Chile.

Biermann, C. J. (1988). Hydrolysis and other Cleavages of Glycosidic Linkages in Polysaccharides. *Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, (46) 251-271

Boual, Zakaria & Kemassi, Abdellah & Aminata, Khelil & Michaud, Philippe & DidiOuld El Hadj, Mohammed. (2012). Partial Characterization and Hydrolysis Procedure of Water Soluble Polysaccharides Extracted from Onosaharian Medicinal Plant: *Malvaegyptiaca* L. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, (2) 100-103.

Brenes, A., Marquardt, R. R., Muzquiz, M., Guenter, W., Viveros, A., & Arija, I. (2005). Effect of enzyme addition on the nutritive value of six lupin cultivars with different alkaloid content. *Spanish Journal of Agricultural Research*, (3) 203–208.

Brunner, Y., Cui, S.W., (ed.) 2005. Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties, and applications. Taylor & Francis Group, LLC, New York. 75-78.

Caffall, K. H. & Mohnen, D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*. (344) 1879-1900.

Chambers, R. E.; Clamp, J. R. (1971). An assessment of methanolysis and other factors used in the analysis of carbohydrate-containing materials. *Biochem. J.*, (125) 1009-1018.

Chaudhri, A.; Suneetha, V. (2012). Microbially Derived Pectinases: A Review, *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 2 (2)1-5.

Contreras, J. (2003). Purificación y caracterización de poligalacturonasas de *Aspergillus Kwachii*, Tese (Doutorado em Ciências Exatas) – Universidad Nacional de la Plata, Argentina.

Demir, N. Jale Acar, Kemal Sarioğlu, Mehmet Mutlu, (2001). The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part 3: Immobilized pectinase for mash treatment, *Journal of Food Engineering*. 47 (4), 275- 280.

De Ruiter, G. A.; Schols, H. A.; Voragen, A. G. J.; Rombouts, F. M. (1992). Carbohydrate analysis of water-soluble uronic acid containing polysaccharides with high-performance anionexchange chromatography using methanolysis combined with TFA hydrolysis is superior to four other methods. *Anal. Biochem.* (207) 176-185.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P. A ; Smith, E., (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3): 350 -356.

Dutton, G. G. S. Ad V. (1973). *Carbohydr. Chem. Biochem.* (28) 11-160.

Eliasson, A.C. (ed). 2006. Carbohydrates in food. 2nd ed. Taylor & Francis Group, LLC, New York.

Emaga, T. H., Rabetafika, N., Blecker, C. S., & Paquot, M. (2012). Kinetics of the hydrolysis of polysaccharide galacturonic acid and neutral sugars chains from flaxseed mucilage. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, (16) 139–147.

Englyst, H. N.; Cummings, J. H. (1984). Simplified method for the measurement of total non-starch polysaccharides by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. *Analyst* 109, 937-942.

Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 1994. Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Salud. 6° Edición. México. 101 -102 pp.

Fissore, E. N., Ponce, N. M., Wider, E. A., Stortz, C. A., Gerschenson, L. N., & Rojas, A. M. (2009). Commercial cell 57urf hydrolytic enzymes for producing pectinenriched products from butternut (*Cucurbita moschata*, Duchesne ex Poiret). *Journal of Food Engineering*. (93) 293–301.

Garna H., Nicolás Mabon, Bernard Wathelet, and Michel Paquot, (2004). New method for a two-step hydrolysis and chromatographic analysis of pectin neutral sugar chains. *J. agric. Food chem.* (52) 4652–4659.

Gómez, B., Gullon, B., Yanez, R., Parajo, J. C. & Alonso, J. L. (2013). Pectic Oligosaccharides from Lemon Peel Wastes: Production, Purification, and Chemical Characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (61) 10043-10053.

Guilloux K, Gaillard I, Courtois J, Courtois B, Petit E. (2009). Production of arabinoxylan-oligosaccharides from flaxseed (*Linum usitatissimum*). *J Agric Food Chem.* Dec 9; 57 (23):11308-13.

Harazono, A., Kobayashi, T., Kawasaki, N., Itoh, S., Tada, M., Hashii, N., et al. (2011). A comparative study of monosaccharide composition analysis as a carbohydrate test for biopharmaceuticals. *Biologicals*, 39(3), 171–180.

Heredia A., J. Jiménez, J. Fernandez, R. Guillén y R. Rodriguez. (2003). «Fibra Alimentaria.» de Consejo Superior de Investigaciones Científicas., España., pp. 33-36.

Holck, J., Hotchkiss, A., Meyer, A., Mikkelsen, Jorn. & Rastall, R. (2014). Production and bioactivity of pectin oligosaccharides from fruit and vegetable biomass in Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity. Ed. Moreno, F.J. & Sanz, M.L. John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex, United Kingdom

Honda, S., Akao, E., Suzuki, S., Okuda, M., Kakehi, K., & Nakamura, J. (1989). High-performance Liquid Chromatography of Reducing Carbohydrates as Strongly UV Absorbing and Electrochemically Sensitive 1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolone Derivatives. *Analytical Biochemistry*, 180(2), 351–357.

Hudson, G.J., Bailey, B.S. (1980). Mutual interference effects in the colorimetric methods used to determine the sugar composition of dietary fibre. *Food Chemistry*, S. 201-2016 pp.

Jayani, R.; Saxena, S.; Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: a review, *Process Biochemistry*, (40)2931–2944.

Kabel, M. A., van der Maarel, M. J., Klip, G., Voragen, A. G., & Schols, H. A. (2006). Standard assays do not predict the efficiency of commercial cellulase preparations towards plant materials. *Biotechnology and Bioengineering*, (93) 56–63.

Kashyap, D.; Vohra, P.; Tewari, R. (2001). Application of pectinases in the commercial sector: a review, *Bioresource Technology*. (77)215-227

Kohli, P.; Kalia, M.; Gupta, R. (2015). Pectin Methylsterases: A Review, *Bioprocessing & Biotechniques*.5(5)1-7.

Lamari, F.N., Kuhn, R., Karamanos, N.K. (2003). Derivatization of carbohydrates for chromatographic, electrophoretic and mass spectrometric structure analysis. *Journal of Chromatography B.*, (793) 15 -36.

Le Goff, A.; Renard, C. M. G. C.; Bonnin, E.; Thibault, J.-F. (2001). Extraction, purification and chemical characterization of xylogalacturonans from peal hulls. *Carbohydr. Polym.* (45) 325-334

Lim, J., Yoo, J., Ko, S., & Lee, S. (2012). Extraction and characterization of pectin from Yuza (*Citrus junos*) pomace: A comparison of conventional-chemical and combined physical-enzymatic extractions. *Food Hydrocolloids*. (29) 160–165.

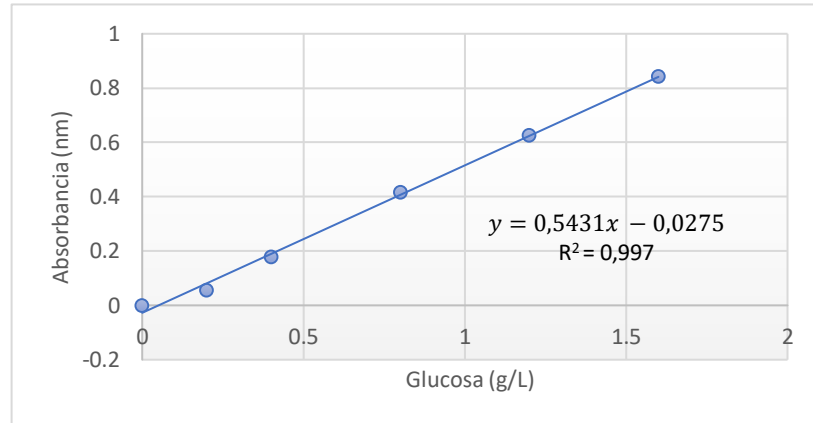
- Liu, Y., J. Shi, Langrish, T.A.G. (2006).** Water-based extraction of pectin from flavedo and albedo of orange peels. *Chemical Engineering Journal*. (120) 203-209.
- Martínez, M. (2009).** Estudio cinético de la producción secuenciada de pectinasas en *Aspergillus flavipes* FP-500. Tese (Doutorado em Ciência em Bioprocessos) - Instituto Politécnico Nacional – México, México D.F.
- Matsushashi S., Inouse S.I. & Hatanaka C., (1992).** Simultaneous measurement of the galacturonate and neutral sugar contents of pectic substance by an enzymatic- HPLC method. *Biochnol.Biochem.* (56) 1053-1057.
- Maxwell, Ellen G. and Belshaw, Nigel J. and Waldron, Keith W. and Morris, Victor J. (2012).** Pectin – An emerging new bioactive food polysaccharide. *Trends in Food Science & Technology*. (24) 64-73.
- Methacanon, P., Kongsin, J., & Gamonpilas, Ch. (2014).** Pomelo (*Citrus 59urfac*) pectin: Effects of extraction parameters and its properties. *Food Hydrocolloids*. (35) 383–391
- Miller, G. (1959).** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal.Chem.* (31) 426-428.
- Min, B., Lim, J., Ko, S., Lee, K. G., Lee, S. H., & Lee, S. (2011).** Environmentally friendly preparation of pectins from agricultural byproducts and their structural/ rheological characterization. *Bioresource Technology*, (102) 3855–3860.
- Murad, H.; Azzaz, H. (2011).** Microbial pectinases and Rumiand Nutrition. *Research Journal of Microbiology*. 6(3)246-269.
- Novosel'skaya, I. L., Voropaeva, N. L., Semenova, L. N. & Rashidova, S. S. (2000).** Trends in the surface and applications of pectins. *Chemistry of Natural Compounds* (36) 1-10.
- Pazur, J. H. Chaplin, M. F. and Kennedy, J. F., Eds. (1986).** Neutral polysachharides Carbohydrate Analysis: A Practical Approach. 55-96. Oxford, IRL Press
- Pedrolli, D. Alexandre Costa Monteiro, Eleni Gomes, Eleonora Cano Carmona (2009).** Pectin and pectinases: Production. characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes, *The Open Biotechnology Journal*. (3)9– 18.
- Quattrochi, O.A., Abelaira de Andrizzi, S.I., Laba, R.F. (1992).** Introducción a HPLC “Aplicación y práctica”. Buenos Aires, Argentina. 301-381.
- Quemener, B.; Thibault, J.-F. (1990).** Assessment of methanolysis for the determination of sugars in pectins. *Carbohydr. Res.* (206) 277-287.

- Quemener, B.;** Lahaye, M.; Thibault, J.-F. (1993). Studies on the simultaneous determination of acid and neutral sugars of plant cell wall materials by HPLC of their methyl glycosides after combined methanolysis and enzymatic pre-hydrolysis. *Carbohydr. Polym.* (20) 87-94.
- Rehman, H., A. Aman, Mohammad Asif Nawaz, Shah Ali Ul Qader . (2015).** Characterization of pectin degrading polygalacturonase produced by *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21, *Food Hydrocolloids.* (43)819–824.
- Renard, C. M. G. C.;** Thibault, J.-F. (1996). Degradation of pectins in surface conditions kinetics of demethylation. *Carbohydr. Res.* 286, 139-150.
- Ridley, B.L., O’Neill, M.A. & Mohnen, D. (2001).** Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry.* (57) 929-967.
- Roberts, E. J.;** Godshall, M. A.; Clarke, M. A.; Tsang, W. S.C.; Parrish, F. W. (1987). Methanolysis of polysaccharides: a new method. *Carbohydr. Res.* (168) 103-109.
- Rumpunen, K., Thomas, M., Badilas, N., & Thibault, J. F. (2002).** Validation of combined enzymatic and HPLC method for screening of pectins in fruits of Japanese quince (*Chaenomeles* surface). *LWT – Food Science and Technology,* (35) 490–496.
- Saeman, J. F.;** Moore, W. E.; Mitchell, R. L.; Millett, M. A. (1954). Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. *Tappi* (37) 336-43.
- Selvendran, R.;** March, J. F.; Ring, S. (1979). Determination of aldose and uronic content of vegetable fiber. *Anal. Biochem.* (18) 282-292
- Soria, A.C., Villamiel, M. & Montilla, A. (2015).** Ultrasound effects on processes/reactions involving carbohydrates in Ultrasound in Food Processing: Recent Advances. Ed. M. Villamiel, J.V. García-Pérez, J. Cárcel and J.J. Benedito. John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex, United Kingdom. (en prensa)
- Sothornvit, R. & Pitak, N. (2007).** Oxygen permeability and mechanical properties of banana films. *Food Research International.* 40(3). 365-370.
- Sriamornsak, P., N. Thirawong, J. Nunthanid, S. Puttipitkhachorn, J. Thongborisute, y H. Akeuchi. (2008).** Atomic force microscopy imaging of novel self-assembling pectinliposome nanocomplexes. *Carbohydrate Polymers.* (71) 324-329.
- Stepan, H., & Staudacher, E. (2011).** Optimization of monosaccharide determination using anthranilic acid and 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone for gastropod analysis. *Analytical Biochemistry,* (418) 24–29.

- Sun, T., Tang, J., & Powers, J. R. (2005).** Effect of pectolytic enzyme preparations on the phenolic composition and antioxidant activity of asparagus juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (53) 42–48.
- Thomas, M.; Tibault, J.-F. (2002).** Cell-wall polysaccharides in the fruits of Japanese quince (*Chaenomeles surface*): extraction and surface on characterization. *Carbohydr. Polym.* (49) 345-355.
- USP 35.** Farmacopea de los Estados Unidos de América. Formulario nacional. NF 30.2012. The United States Pharmacopeia Convention, Estados Unidos. 856-861.
- Valcárcel, M., Gómez, A., (1988).** Técnicas Analíticas de Separación. Editorial Reverté, S.A. Barcelona, España. 682 – 683
- Voragen, A. G., Coenen, G. J., Verhoef, R. P., & Schols, H. A. (2009).** Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry*, (20) 263–275.
- Wang, H. X., Zhao, J., Li, D. M., Song, S., Song, L., Fu, Y. H., et al. (2015).** Structural investigation of a uronic acid-containing polysaccharide from abalone by graded acid hydrolysis followed by PMP-HPLC–MSn and NMR analysis. *Carbohydrate Research*, (402) 95–101.
- Wikiera Agnieszka, Mika Magdalena, Starzyńska-Janiszewska, A., Bożena Stodolak. (2015).** Development of complete hydrolysis of pectins from apple pomace. *Food Chemistry*. (172) 675-680.
- Willats, W.G.T., Knox, P. & Mikkelsen, J.D. (2006).** Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology*. (17) 97-104.
- Wu, X. D., Jiang, Wei, Lu, J. J., Yu, Y., & Wu, B. (2014).** Analysis of the monosaccharide composition of water-soluble polysaccharides from *Sargassum fusiforme* by high performance liquid chromatography/electrospray surface on mass spectrometry. *Food Chemistry*, (145) 976–983.
- Yapo, B. M., Robert, C., Etienne, I., Wathelet, B., & Paquot, M. (2007).** Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts. *Food Chemistry*, (100) 1356–1364.
- You Lv, Xingbin Yang, Yan Zhao, Yun Ruan, Ying Yang, Zhezhi Wang. (2009).** Separation and quantification of component monosaccharides of the tea polysaccharides from *Gynostemma pentaphyllum* by HPLC with indirect UV detection, *Food Chemistry*, 112 (3)742-746,
- Zhang, L., Ye, X., Ding, T., Sun, X., Xu, Y. & Liu, D. (2013).** Ultrasound effects on the degradation kinetics, structure and rheological properties of apple pectin. *Ultrasonics Sonochemistry* (20), 222-231
- Zhang, L. F., Zhang, X. Z., Liu, D. H., Ding, T. & Ye, X. Q. (2015).** Effect of degradation methods on the structural properties of citrus pectin. *Food Science and Technology* (61) 630-637.

8 ANEXOS

8.1 Curva de calibrado de glucosa para DNS

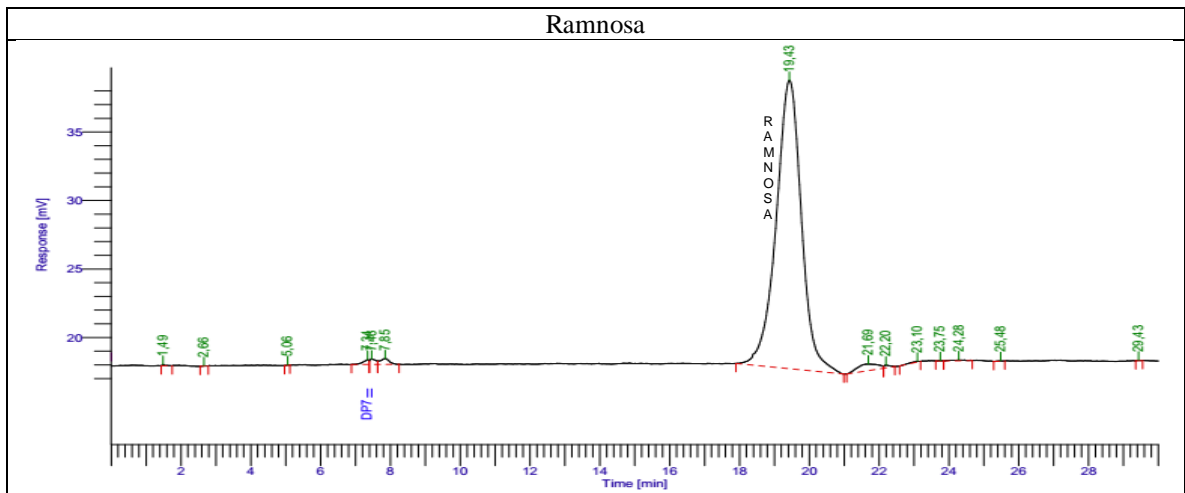


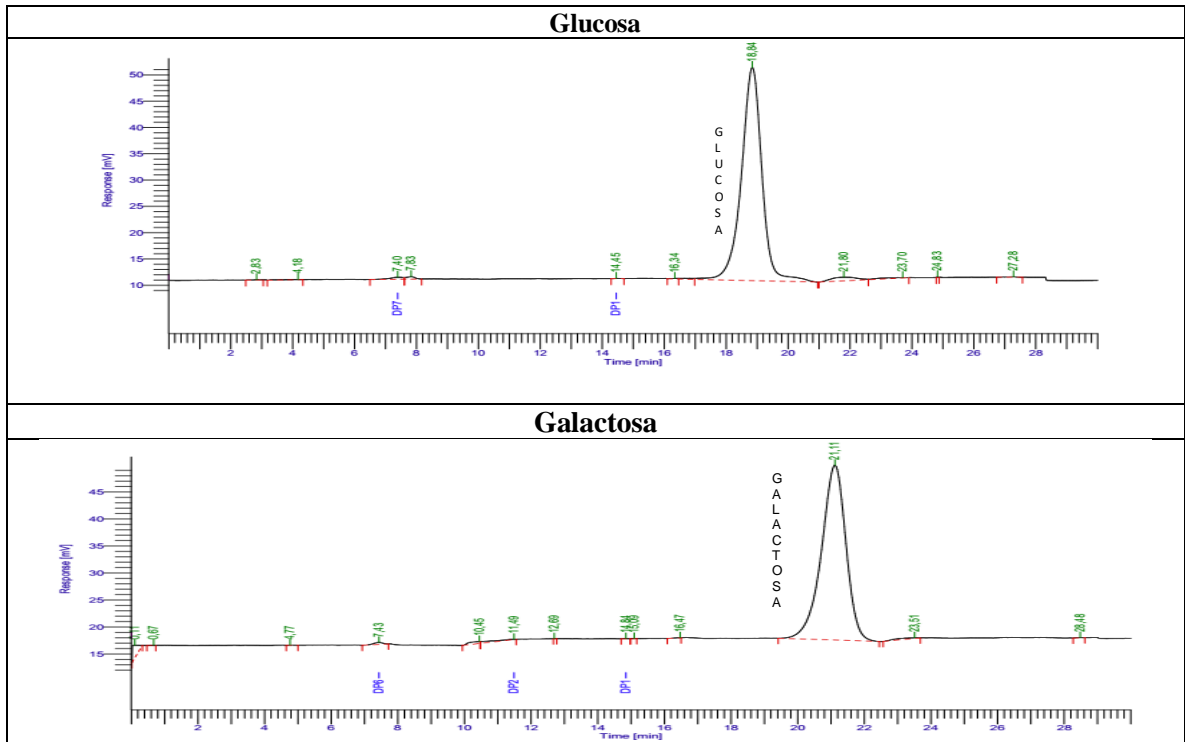
8.2 Cromatogramas de estándares de monosacáridos obtenidos por HPLC-IR en la Escuela de Ingeniería Bioquímica PUCV

Tiempos de retención

AGA	*	Ramnosa	19,43 min	Arabinosa	*
Xilosa	*	Glucosa	18,84 min	Galactosa	21,11 min
Manosa	*				

*No fue posible su determinación debido a problemas técnicos con la columna del equipo.





8.3 Cromatogramas de estándares y curvas de calibrado de monosacáridos obtenidos por HPLC-DAD en el laboratorio de Bioprocesos de la Facultad de Farmacia UV.

AGA	9,853 min	Ramnosa	8,7065 min	Arabinosa	16,0855 min
Xilosa	15,699 min	Glucosa	13,536 min	Galactosa	15,559 min
Manosa	4,183 min				

