

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**“PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA HIDROPERÓXIDO LIASA Y
PRODUCCIÓN DEL SUSTRATO, UTILIZANDO *Amaranthus
hybridus* L.”**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS: PRODUCTOS NATURALES Y
ALIMENTOS**

PRESENTA:

I.A. ANTONIO MORENO NIÑO

DIRECTORA:

DRA. MIRNA PATRICIA SANTIAGO GÓMEZ

CODIRECTORA:

M.C. ALMA YADIRA SALAZAR GOVEA

H. CIUDAD DE HUAJUAPAN DE LEÓN, OAXACA. MÉXICO. ABRIL, 2018

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Ciencia y Tecnología de Alimentos, del edificio de Productos Naturales y Alimentos de la Universidad Tecnológica de la Mixteca.

Parte del trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Alimentos del Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica del Instituto Tecnológico de Oaxaca, bajo la dirección del Dr. Marco Antonio Sánchez Medina y en el Centro de Investigación Facultad de Medicina UNAM-UABJO, bajo la dirección de la Dra. María del Socorro Pina Canseco.

El análisis de la enzima HPL parcialmente purificada con el equipo de UPLC-MS (INFRA-2015-01-252013) se realizó en el Laboratorio de Espectrometría de Masas de la Universidad del Papaloapan (UNPA), Campus Tuxtepec, con la colaboración del Dr. Adolfo López Torres.

El tesista contó con el apoyo de beca de manutención número 735368/599446, otorgada por Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Parte de los resultados de este trabajo se presentaron en el 52° Congreso Mexicano de Química, organizado por la Sociedad Química de México, A.C, en la modalidad de Cartel Profesional, realizado del 27 al 29 de septiembre de 2017, en Puerto Vallarta, Jalisco, México.

Así mismo, algunos resultados de este trabajo se presentaron en la Feria de Posgrados de Calidad 2017, organizado por CONACYT, realizado en la Ciudad de México.

DEDICATORIA

A mis padres Antonio y Luminosa, porque aún con sus limitaciones, se esforzaron al máximo para brindarme algo tan preciado y tan increíble que es la oportunidad de estudiar. Por brindarme su apoyo incondicional, por enseñarme que nunca hay que desistir ante las adversidades y que mis sueños pueden ser posibles con esfuerzo y con dedicación, “LOS QUIERO MUCHO”.

A mis hermanos: Claudia, Adalberto y Eva, por compartir momentos inolvidables, por estar siempre conmigo y motivarme a lo largo de este proceso.

A mis abuelos por brindarme su cariño incondicional. Veci, tú me enseñaste que el entusiasmo y las ganas por aprender lo supera todo (te quiero mucho).

A mis sobrinos Johana, Daniela, Luis, Alejandro, por la felicidad y alegría que me han brindado siempre.

En general a mi familia, porque lo que soy y lo que he logrado hasta ahorita se lo debo a ustedes.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis la Dra. Mirna Patricia Santiago Gómez, por brindarme su apoyo, por sus consejos y por el esfuerzo dedicado a este proyecto.

A mi codirectora la Maestra Alma Yadira Salazar Govea, por su invaluable apoyo y por los consejos transmitidos durante la tesis.

A mis evaluadores la Dra. Edith G. Gózales Mondragón, Dra. Beatriz Hernández Carlos, Dr. Rogelio Valadez Blando y al Dr. Marco Antonio Medina Sánchez por el tiempo que invirtieron en la revisión de este proyecto.

A la Dra. Emma Cristina Mapes Sánchez del departamento de Zoología del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por haber realizado la identificación taxonómica de la planta *Amaranthus hybridus* L.

A la QFB. Elvira Ríos Leal, del Laboratorio de la Central Analítica del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del IPN, por haber realizado el análisis de los ácidos grasos por cromatografía de gases.

A Jonas Manuel Jiménez Rodríguez por haber colaborado en este proyecto en su estancia profesional realizada en la UTM.

A Mis compañeros de maestría Yesica y Francisco, por hacer más amena mi estancia en el área de posgrado, porque con ustedes pase momentos increíbles, gracias por brindarme su amistad. A una persona muy especial para mí, siempre estuvo en todo momento, cuando más te requería me brindaste tu apoyo incondicional, muchas gracias Mary. A mis amigos Yaz, Erika, Magda, Rocío, Irmita y Ulises, por sus palabras de aliento y por brindarme la mejor vibra durante esta etapa de mi vida. A todos mis amigos que durante este tiempo me brindaron su apoyo, de corazón, muchas gracias.

RESUMEN

En el presente trabajo la enzima hidroperóxido liasa (HPL) fue extraída a partir de las hojas de quintoniles (*Amaranthus hybridus* L.) y se purificó evaluando tres etapas cromatográficas; cromatografía de intercambio iónico (TOYOPEARL DEAE-650M), de interacción hidrofóbica (fenil sefarosa) y de hidroxapatita. Se determinó la actividad enzimática, concentración de proteína por el método de Bradford, el peso molecular aproximado de la enzima HPL por electroforesis SDS-PAGE y se evaluó la utilización de la técnica de UPLC-QToF para determinar el peso molecular exacto de la enzima. Se realizó la obtención de extractos de ácidos grasos mediante la extracción con fluidos supercríticos (EFS) estos ácidos grasos se utilizaron para obtener el sustrato de la enzima HPL. Finalmente, se implementó la técnica de PCR en el material genético obtenido de las hojas de los quintoniles. Se encontró que la enzima se purificó 61.8 veces en una sola etapa de purificación, presentando una actividad enzimática específica de 2045.26 U/mg de proteína y un peso molecular aproximado de 59 kDa. Con el método de UPLC-QToF no se logró determinar el peso molecular exacto debido a las interferencias del detergente, Tritón X-100, presente en las muestras. La actividad enzimática incrementó 21.2 % al utilizar el sustrato obtenido a partir de los extractos de EFS. La extracción de ADN obtenido de las hojas frescas de quintoniles fue de 6656.5 ng/ μ L. Al introducir el diseño de oligonucleótidos obtenido a partir del material genético de la enzima HPL reportado en la literatura, en el programa Primers-BLAST, alinearon de forma correcta. En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir que la enzima HPL extraída de las hojas de quintoniles se puede purificar parcialmente con la primera etapa de purificación, además, los sustratos obtenidos a partir de la oxidación de los extractos de EFS son adecuados para la enzima HPL.

ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMEN	V
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABLAS	XII
ABREVIATURAS	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1. Enzima hidropéroxido liasa (HPL)	2
2.1.1. Mecanismo de reacción de la enzima HPL.....	4
2.1.2. Condiciones óptimas para la actividad de la enzima HPL.....	5
2.2. Uso de la enzima HPL en los alimentos	6
2.2.1. Aromas y notas verdes	6
2.2.2. Fuentes de obtención de notas verdes	6
2.3. Métodos de purificación de proteínas por cromatografía	7
2.3.1. Cromatografía de intercambio iónico	7
2.3.2. Cromatografía de interacción hidrofóbica	8
2.3.3. Cromatografía de hidroxapatita	8
2.4. UPLC-QToF	9
2.5. Electroforesis	10
2.5.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)	11
2.5.1.1. Electroforesis desnaturizante	11
2.5.1.2. Electroforesis nativa	12

2.6.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	12
2.6.1.	Métodos de extracción de ADN.....	12
2.6.2.	Diseño de oligonucleótidos.....	13
2.6.3.	Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa.....	14
2.7.	Fluidos supercríticos	16
2.7.1.	Aplicación de extracción con fluidos supercríticos en productos naturales	17
2.8.	Quintoniles (<i>Amaranthus hybridus</i> L.)	19
3.	ANTECEDENTES	22
3.1.	Fuentes para la extracción de la enzima HPL.....	22
3.2.	Métodos de purificación de la enzima HPL.....	24
3.3.	Uso de la técnica de PCR para la identificación de la enzima HPL	25
3.4.	Fuentes y métodos de obtención del sustrato para la enzima HPL.....	26
3.5.	Extracción supercrítica de aceites esenciales.....	27
4.	JUSTIFICACIÓN.....	28
5.	OBJETIVOS	30
5.1.	Objetivo general.....	30
5.1.1.	Objetivos específicos	30
6.	METODOLOGÍA.....	31
6.1.	Adquisición e identificación de la planta.....	32
6.2.	Producción del sustrato para la enzima HPL a partir de ácidos grasos puros	32
6.3.	Extracción de la enzima HPL de los quintoniles	33
6.4.	Purificación de la enzima HPL	33
6.4.1.	Precipitación de la enzima con sulfato de amonio.....	33
6.4.2.	Primera etapa de purificación	34

6.4.2.1.	Preparación de la resina y equilibrio de la columna	34
6.4.2.2.	Cromatografía de intercambio iónico	35
6.4.3.	Segunda etapa de purificación	35
6.4.3.1.	Preparación de la resina y equilibrio de la columna	35
6.4.3.2.	Cromatografía de interacción hidrofóbica	36
6.4.4.	Tercera etapa de purificación: cromatografía de hidroxiapatita	36
6.5.	Caracterización de la enzima HPL.....	36
6.5.1.	Determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford.....	36
6.5.2.	Actividad enzimática total y específica de la enzima HPL.....	37
6.5.3.	Electroforesis SDS-PAGE	38
6.5.4.	Determinación del peso molecular de la enzima por UPLC-QToF.....	39
6.6.	Amplificación del ADN de las hojas de los quintoniles por PCR	40
6.6.1.	Diseño de oligonucleótidos.....	40
6.6.2.	Extracción de ADN.....	41
6.6.3.	Técnica de PCR	42
6.7.	Producción del sustrato para la actividad enzimática de la HPL a partir de ácidos grasos obtenidos mediante extracción con fluidos supercríticos.....	42
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
7.1.	Identificación de la planta.....	46
7.2.	Producción del sustrato para la enzima HPL a partir de ácido linolénico puro.....	46
7.3.	Extracción de la enzima HPL	47
7.4.	Purificación y caracterización de la enzima HPL.....	48
7.4.1.	Determinación del peso molecular de la enzima HPL.....	53

7.5.	Diseño de oligonucleótidos y extracción del ADN de las hojas de los quintoniles para su aplicación en PCR	56
7.5.1.	Diseño de oligonucleótidos.....	56
7.5.2.	Aplicación de la técnica de PCR.....	61
7.6.	Producción del sustrato para la enzima HPL a partir de extractos obtenidos por extracción con fluidos supercríticos	63
7.6.1.	Identificación de los ácidos grasos obtenidos por extracción con fluidos supercríticos.....	63
7.6.2.	Caracterización del sustrato producido con ácidos grasos obtenidos por extracción con fluidos supercríticos	66
7.6.3.	Comparación de la actividad enzimática con sustratos puros y compuestos.....	67
8.	CONCLUSIONES	70
9.	PERSPECTIVAS.....	71
10.	BIBLIOGRAFÍA	72
11.	ANEXOS	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Síntesis de notas verdes en plantas por la enzima HPL	3
2	Mecanismo propuesto para la enzima HPL	4
3	Unión de la proteína a la hidroxiapatita. A: proteína básica. B: proteína ácida.....	9
4	Etapas de la PCR.....	16
5	Diagrama del equipo de extracción supercrítica.	19
6	Quintoniles (<i>Amaranthus hybridus</i> L.).	20
7	Gel de electroforesis SDS-PAGE, bandas identificadas en a) quintoniles, b) hierbabuena, c) té limón y d) orégano.....	24
8	Metodología para la purificación y caracterización de la enzima HPL a partir de quintoniles (<i>Amaranthus hybridus</i> L.).	31
9	Curva estándar de calibración con ASB.	37
10	Barrido de los hidroperóxidos de ácidos grasos producidos a partir de ácido linolénico.....	46
11	Espectrograma de la primera etapa de purificación de la enzima HPL de hojas de quintoniles.	48
12	Espectrograma de la segunda etapa de purificación de la enzima HPL extraída de hojas de quintoniles.	49
13	Espectrograma de la tercera etapa de purificación de la enzima HPL extraída de hojas de quintoniles.	50
14	Gel de electroforesis SDS-PAGE; a) Quintoniles (<i>Amaranthus hybridus</i> L.) y b) Amaranto tricolor (<i>Amaranthus mangostanus</i> L.)	54
15	Cromatograma obtenido del extracto de la primera etapa de purificación de quintoniles (<i>Amaranthus hybridus</i> L.).	55
16	Espectro de masas obtenido del extracto de la primera etapa de purificación de quintoniles (<i>Amaranthus hybridus</i> L.).	55
17	Alineamiento de oligonucleótidos diseñados a partir del ADN de tomate. (Datos obtenidos de https://www.ncbi.nlm.nih.gov).	58

18	Alineamiento de oligonucleótidos diseñados a partir del ADN de arabidopsis. (Datos obtenidos de https://www.ncbi.nlm.nih.gov).	59
19	Alineamiento de oligonucleótidos diseñados a partir del ADN de sandía. (Datos obtenidos de https://www.ncbi.nlm.nih.gov).	60
20	Gel de electroforesis de agarosa al 2 %; 1) quintoniles, 2) tomate y 3) sandía.	62
21	Productos de PCR con oligonucleótidos de actina; carril 1) marcador de pesos moleculares, 2) tomate, 3) sandía y 4) quintoniles.	62
22	Barrido de los hidroperóxidos de ácidos grasos producidos a partir de EFS	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Valores de pH y temperatura óptimos para la enzima HPL.....	5
2	Aplicación de la EFS para la extracción de productos naturales comerciales	18
3	Valores reportados de actividad enzimática específica de extracto crudo y enzima HPL purificada.....	22
4	Actividad enzimática de extractos crudos de once plantas cultivadas en el estado de Oaxaca.....	23
5	Métodos de purificación utilizados para la enzima HPL.	24
6	Extracción de compuestos bioactivos a partir de diferentes matrices por extracción con CO ₂ supercrítico.	27
7	Concentración de proteína y actividad enzimática en el precipitado y en el sobrenadante de quintoniles.	47
8	Etapas de la purificación de la enzima HPL extraída de las hojas de quintoniles (<i>Amaranthus hybridus</i> L.) y hojas de amaranto tricolor (<i>Amaranthus mangostanus</i> L.).....	51
9	Actividad enzimática total y específica de extractos crudos de quintoniles en dos diferentes etapas fenológicas de crecimiento.....	52
10	Características de los oligonucleótidos diseñados para la enzima HPL.	56
11	Concentraciones de ADN.....	61
12	Composición de ácidos grasos en hojas, semilla, cascarilla y mezcla de quintoniles (<i>Amaranthus hybridus</i> L.), obtenidos por el método de Soxhlet.	64
13	Composición de ácidos grasos en cascarilla, semilla y mezcla de semilla y cascarilla de quintoniles (<i>Amaranthus hybridus</i> L.), obtenidos por extracción con fluidos supercríticos.	65
14	Comparación de la actividad enzimática HPL con diferentes sustratos, obtenidos con ácido linolénico puro y por EFS.....	67

ABREVIATURAS

HPL	Hidroperóxido liasa
13-HPOD	Ácido 13(S)-hidroperoxi-(9Z,11E)-octadecadienoico
9-HPOD	Ácido 9(S)-hidroperoxi-(10E,12Z)-octadecadienoico
13-HPOT	Ácido 13(S)-hidroperoxi-(9Z,11E,15Z)-octadecatrienoico
9-HPOT	Ácido 9(S)-hidroperoxi-(10E,12Z,15Z)-octadecatrienoico
EFS	Extracción con fluidos supercríticos
FSC	Fluido supercrítico
CG	Cromatografía de gases
DTT	Ditiotreitol
SDS	Dodecilsulfato sódico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
MPa	Megapascal

1. INTRODUCCIÓN

Los aromas son sustancias químicas que se utilizan en la elaboración de alimentos ya que les imparten propiedades organolépticas y son responsables de que éstos sean aceptados o no por los consumidores. Las “notas verdes” son compuestos que se incluyen en la clasificación de aromas, son ampliamente utilizadas para impartir olores de carácter verde y fresco en alimentos procesados [1].

Las notas verdes son obtenidas a partir de métodos químicos, sin embargo, utilizando estos métodos es necesario eliminar impurezas y sustancias residuales antes de incorporarlas a los alimentos. En este sentido, existe una motivación para buscar alternativas de producción de estos compuestos de manera natural y que puedan satisfacer la demanda creciente del mercado [2]. En la industria de alimentos se han realizado investigaciones para la producción enzimática de notas verdes de manera eficiente y a un bajo costo. A través del uso de enzimas como la hidropéroxido liasa (HPL) se ofrece como una alternativa para la obtención de notas verdes, esta enzima ha sido extraída y purificada a partir de girasol, chícharos, guayaba, caña, pepino, amaranto tricolor, hojas de olivo y tomate [3].

En este contexto, en trabajos previos en el grupo de investigación se observó la presencia de la enzima HPL en extractos crudos de quintoniles (*Amaranthus hybridus* L.), con un peso molecular estimado de 64 kDa [4]. Los quintoniles son plantas herbáceas de las cuales se consumen las hojas tiernas. El uso y conocimiento de los quintoniles continúa solo de manera local, en zonas donde las personas nativas mantienen todavía sus recursos y medicinas tradicionales.

En el presente trabajo, las hojas frescas de *Amaranthus hybridus* L. se utilizaron para la extracción y purificación de la enzima HPL. Por otro lado, a partir de las hojas frescas, la semilla y la cascarilla se obtuvieron los ácidos grasos (linoleico y linolénico) mediante extracción con dióxido de carbono supercrítico, los cuales sirven para la producción del sustrato para la enzima. De este modo, se pretende dar un valor agregado al cultivo de esta planta tradicional. Finalmente, se realizó la extracción de ADN de las hojas frescas de la planta y el diseño de oligonucleótidos para su amplificación por PCR.

2. MARCO TEÓRICO

En esta sección se describen las características de la enzima hidroperóxido liasa. Asimismo, se describe el fundamento de los métodos de purificación y caracterización que se utilizaron para la enzima HPL, así como el fundamento de extracción mediante fluidos supercríticos, también se describe de manera general a la planta de los quintoniles, la cual fue utilizada como materia prima en este trabajo.

2.1. Enzima hidroperóxido liasa (HPL)

La enzima HPL fue descrita por primera vez en 1973 como un aldehído liasa, a la cual se le adjudicó la ruptura de hidroperóxidos de ácidos grasos en la fruta del plátano. Sin embargo, fue hasta 1976 que Vick *et al.* [5] llamaron a esta enzima hidroperóxido liasa, extrayéndola de la planta de la sandía.

Hasta el momento no se conoce la estructura de la enzima HPL, sin embargo, basándose en la homología de las secuencias reportadas para la enzima HPL, esta enzima ha sido clasificada como una familia del citocromo P450 por varias razones, dentro de las cuales se encuentran las siguientes:

- Se conoce el sitio activo de la enzima, el cual está constituido por un sitio protohemo IX (hemo *b*), el cual se encuentra localizado dentro de la proteína, por lo cual se denomina proteína hemínica, y está enlazado por residuos de cisteína, este sitio hemo *b* es característico de la familia del citocromo P450.
- El espectro de la enzima alfa HPL muestra que la enzima contiene un porcentaje alto de alfa hélices, similares a los cristalizados de las enzimas P450.
- La masa molecular de las enzimas HPL encontradas presentan una similitud con las de la familia de citocromo P450.

Sin embargo, la enzima HPL presenta una baja afinidad por el monóxido de carbono y no necesita una molécula de oxígeno para su actividad, como en el caso de la mayoría de las enzimas de la familia de citocromo P450 [6].

La enzima HPL participa en la vía de la lipoxigenasa (Figura 1), cataliza la ruptura de 9 y 13 hidroperóxidos, obtenidos a partir del ácido linoleico y el ácido linolénico, en compuestos volátiles, aldehídos de 6 y 9 carbonos y oxoácidos de 9 y 12 carbonos [3]. En la Figura 1 se muestra el mecanismo propuesto de la reacción para la formación de estos compuestos volátiles. Estas reacciones inician con la hidroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados por la enzima lipoxigenasa, la cual los transforma en sus correspondientes hidroperóxidos. Estos hidroperóxidos son metabolizados por la enzima HPL, la cual rompe y transforma la estructura de los hidroperóxidos a sus correspondientes aldehídos y ω -oxo ácidos [7].

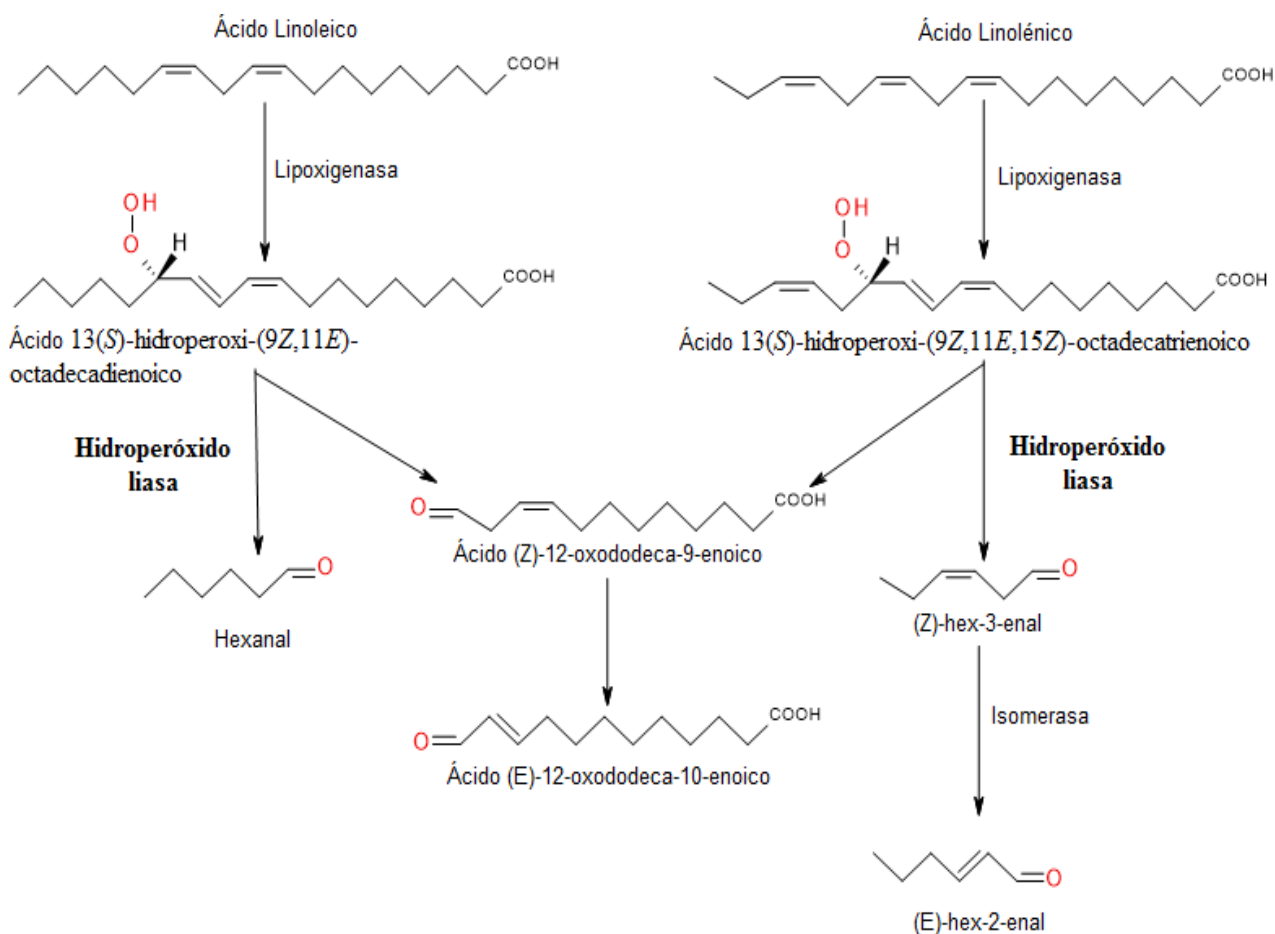


Figura 1. Síntesis de notas verdes en plantas por la enzima HPL [7].

2.1.1. Mecanismo de reacción de la enzima HPL

Noordermeer *et al.* [6] propusieron el mecanismo mostrado en la Figura 2, para explicar la formación de aldehídos y ω -oxo ácidos a partir de sustratos de hidroperóxidos. Este mecanismo fue basado en el conocimiento del citocromo P450 y considerando que la enzima HPL pertenece a esta familia.

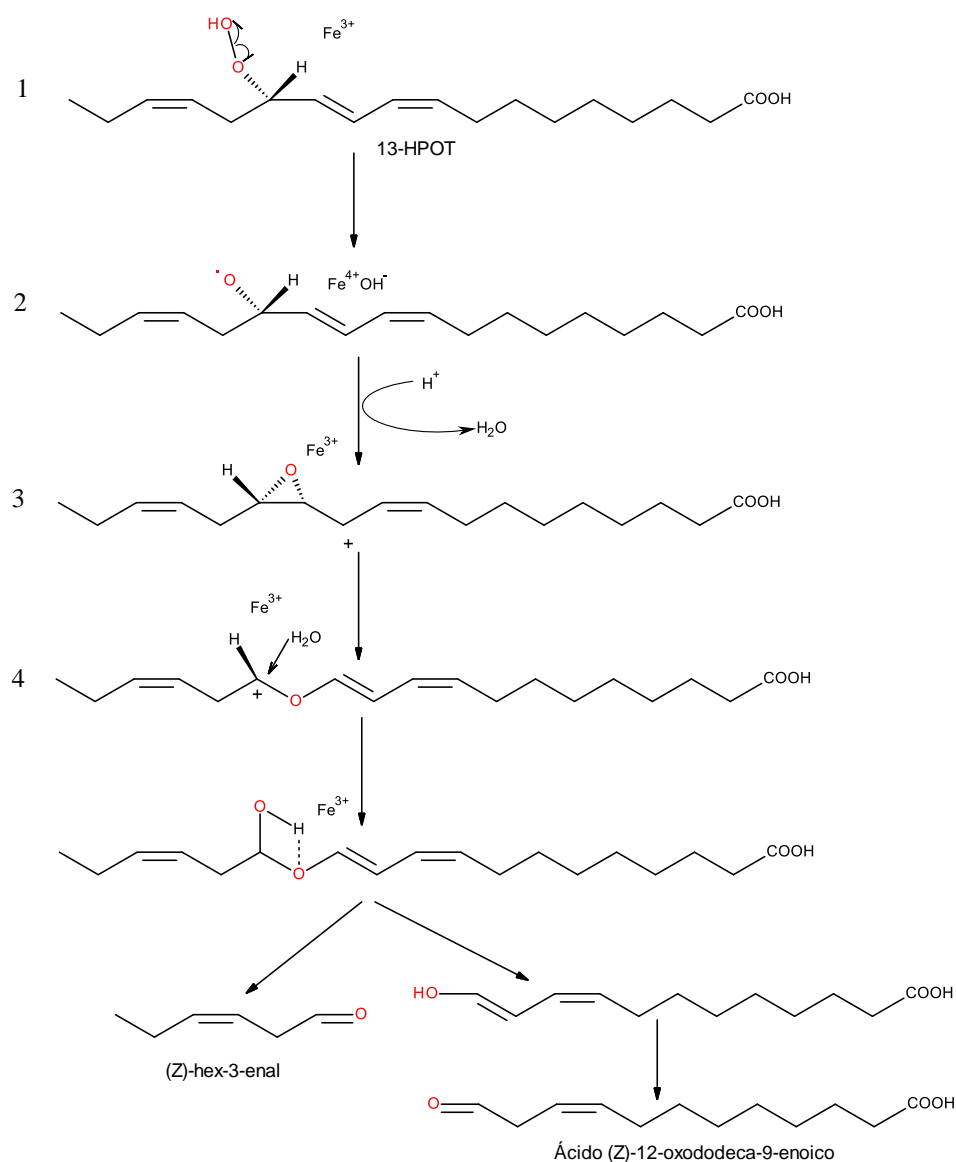


Figura 2. Mecanismo propuesto para la enzima HPL [6].

En el primer paso se presenta una ruptura homolítica del enlace oxígeno-oxígeno, el cual da como resultado un radical alcoxi y un complejo hidroxil-ferril. La formación del complejo hidroxil-ferril es resultado de la interacción entre el Fe^{III}-porfirina y un peróxido. En el segundo paso la enzima HPL dona protones al anión hidroxilo del complejo hidroxil-ferril, se pierde una molécula de agua, y posteriormente se lleva a cabo el atrapamiento del radical alcoxi (paso 3). Lo anterior, genera la formación de un catión de éter alílico como intermediario. En el paso 4, se produce la adición de agua al carbocatión y reordenamientos espontáneos generan la formación de un aldehído de 6 carbonos y un enol de 12 carbonos. Finalmente, un ω -oxoácido se forma por la tautomerización ceto-enol del enol del carbono 12.

2.1.2. Condiciones óptimas para la actividad de la enzima HPL

La enzima HPL es una proteína hemínica que consta de tres unidades de entre 55-60 kDa. El pH óptimo de la actividad de la enzima está en un intervalo de 6.0 a 8.0, y una temperatura óptima de 15 a 25 °C [8]. En la Tabla 1, se muestran las condiciones óptimas de pH y temperatura para la enzima HPL extraída de diferentes especies vegetales.

Tabla 1. Valores de pH y temperatura óptimos para la enzima HPL.

Materia prima	pH	Temperatura, °C
Aceitunas (<i>Olea europaea</i>) [9]	6.0	NI
Girasol (<i>Helianthus annuus</i> L.) [10]	6.0-7.0	25
Pepinos (<i>Cucumis sativus</i>) [11]	6.0	20-40
Tomate (variedad <i>trust</i>) [12]	6.5	NI
Chícharo (<i>Pisum sativum</i> L.) [1]	6.0-7.0	NI
Remolacha azucarera (<i>Beta vulgaris</i> L.) [13]	6.7	22
Amaranto tricolor (<i>Amaranthus mangostanus</i> L.) [14]	6.0	25

NI: No Indicado

2.2. Uso de la enzima HPL en los alimentos

2.2.1. Aromas y notas verdes

Los aromas son compuestos volátiles responsables de las propiedades organolépticas de un alimento, no tienen ningún valor nutricional. Sin embargo, son esenciales para determinar la aceptación de los alimentos y estimular el apetito de los consumidores. Las principales moléculas responsables del aroma están formadas por una cadena principal de hidrocarburo, la cual puede ser lineal, cíclica o aromática. Los grupos funcionales presentes en estas moléculas aromáticas son: alcoholes, aldehídos, ésteres, éteres, fenoles y derivados de azufre [15].

Las notas verdes son compuestos clasificados como aromas, las cuales son sintetizadas por las plantas superiores en respuesta a heridas mecánicas y actúan como mecanismos de defensa contra el ataque de insectos y hongos. Los principales contribuyentes a las notas verdes son compuestos volátiles de seis carbonos, aldehídos (hexanal y hexenal), alcoholes (hexanol y hexenol) y algunas veces, compuestos de nueve carbonos, nonenal y nonadienal [7]. Las notas verdes son atractivas en la industria de alimentos por conferir frescura y naturalidad a los productos procesados [13].

2.2.2. Fuentes de obtención de notas verdes

Las notas verdes se encuentran en una amplia variedad de hojas frescas, verduras y frutas. Estos compuestos están presentes en los aceites esenciales de plantas los cuales se han obtenido por diferentes métodos, uno de los más utilizados es la destilación con vapor, seguido por la destilación fraccionada. La producción de notas verdes en la actualidad se basa en procesos bioquímicos, químicos y biotecnológicos [16]. Sin embargo, los procesos biotecnológicos son los más utilizados para la producción de estas sustancias aromáticas, en estos procesos se utilizan precursores que se transforman por vía enzimática [3]. La vía de la

lipoxigenasa, hidroperóxido liasa y alcohol deshidrogenasa representan las rutas enzimáticas más aceptadas para la conversión de los ácidos grasos insaturados, ácidos linoleico (18:2) y linolénico (18:3), en notas verdes [2].

2.3. Métodos de purificación de proteínas por cromatografía

2.3.1. Cromatografía de intercambio iónico

Los procedimientos cromatográficos se usan comúnmente para purificar productos biológicos de mezclas complejas. La cromatografía de intercambio iónico es un método que se ha utilizado en la purificación de proteínas debido a que las condiciones de proceso son no agresivas con estas biomoléculas, además, las proteínas presentan altas capacidades de unión con las resinas [17].

El intercambiador iónico es una matriz sólida que tiene enlazados grupos cargados, a los que se unen aniones por fuerzas electrostáticas, estos aniones se pueden intercambiar por iones de una solución de sales. Las resinas o fases estacionarias iónicas suelen utilizarse en columnas para separar moléculas de acuerdo a su carga [18].

El principio básico de la cromatografía de intercambio iónico es que las moléculas cargadas se adsorben en los intercambiadores de forma reversible, de modo que dichas moléculas se pueden unir o separar cambiando el ambiente iónico. La separación mediante intercambiadores iónicos se realiza, por lo general, en dos etapas:

- Las sustancias por separar se unen al intercambiador utilizando condiciones que originan una unión fuerte y estable.
- En la segunda etapa la columna se eluye con un amortiguador de diferente pH o diferentes fuerzas iónicas, los cuales compiten con los analitos para unirse a la resina de la columna y de esta forma se eluye la muestra.

La afinidad de los analitos por la fase estacionaria depende en gran medida de su carga neta y del cambio de su pH. En este tipo de separación también se puede cambiar o eliminar la carga neta, de modo que un analito determinado se puede intercambiar en una resina mediante el control del pH de la solución, de esta forma se puede mejorar el aislamiento de moléculas biológicas [19].

2.3.2. Cromatografía de interacción hidrofóbica

Es una técnica para el aislamiento de proteínas a escala analítica y preparativa. La cromatografía de interacción hidrofóbica, separa las proteínas con base a su tendencia a asociarse a una resina cubierta con grupos hidrofóbicos. Dado que la fase móvil es completamente acuosa, la retención de las biomoléculas está controlada por la concentración de sales agregadas, tales como sulfato de amonio o surfactantes. Las altas concentraciones de sales favorecen la retención de las proteínas. Las sales tienen alta polaridad y se unen fuertemente al agua, lo cual promueve la exclusión del agua sobre la proteína y la superficie del ligando, lo que promueve las interacciones hidrofóbicas entre la proteína y la columna. Para la elución de los analitos, se disminuye la polaridad de la fase móvil con la disminución de la concentración de la sal [20].

2.3.3. Cromatografía de hidroxiapatita

La hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), es un fosfato de calcio utilizado en cromatografía para la separación de proteínas y ADN. Dentro de sus ventajas están la velocidad de flujo, la estabilidad y la reproducibilidad a lo largo de varios ciclos de uso. La adsorción de proteínas a la hidroxiapatita implica tanto el intercambio aniónico como el catiónico. El grupo funcional Ca^{2+} puede interactuar con los residuos de carboxilato en la superficie de la proteína, mientras que el grupo funcional PO_4^{2-} puede interactuar con las proteínas básicas (punto isoeléctrico superior a 7). Las proteínas ácidas (punto isoeléctrico inferior a 7) se

eluyen más fácilmente que las proteínas básicas mediante un aumento en el gradiente de solución de fosfato, los gradientes de iones son útiles especialmente para la elución selectiva de proteínas básicas (Figura 3) [21].

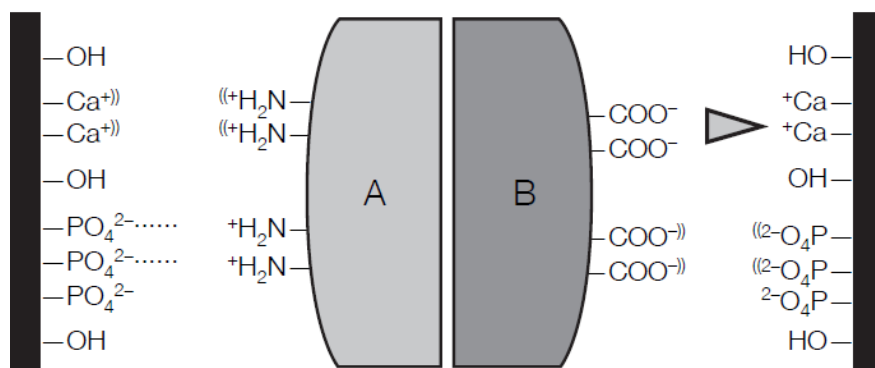


Figura 3. Unión de la proteína a la hidroxiapatita. A: proteína básica. B: proteína ácida. Dobles paréntesis indican repulsión. Líneas punteadas indican enlace iónico. Triángulo indica enlaces coordinados [22].

2.4. UPLC-QToF

En los últimos años, la cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplada a la espectrometría de masas (HPLC-MS) se ha convertido en una herramienta avanzada y útil, ya que ha permitido la caracterización de extractos de diversos materiales vegetales, dicha caracterización implica tanto la identificación como la cuantificación de compuestos [23].

La técnica de HPLC de fase inversa está conformada por una fase estacionaria no polar (columna) y una fase móvil de polaridad moderada, en la fase móvil se encuentra el analito de interés. La separación cromatográfica se lleva a cabo por las afinidades relativas específicas entre las moléculas del analito con las fases, móvil y estacionaria. En la HPLC la fase móvil es forzada a través de altas presiones, de hasta 400 atmósferas, por la fase estacionaria. Esto hace que la separación se lleve a cabo de forma más rápida. El principio de operación del UPLC (cromatografía líquida de ultra-alta resolución) es el mismo que el del HPLC, sin embargo, la diferencia básica está en el tamaño de partícula del material de la

columna, menor de 2 μm [24]. Este diámetro de partícula permite una mayor resolución. Asimismo, las partículas pequeñas crean presiones de funcionamiento muy altas (6000 a 15000 psi) [25].

En el espectrómetro de masas cuadrupolo tiempo de vuelo (QToF) la separación de masa se logra por el establecimiento de un campo eléctrico en el cual los iones de una cierta relación entre masa y carga (m/z) tienen trayectorias estables a través del campo. El campo eléctrico es generado por un voltaje de corriente continua (cc) y un voltaje oscilante creado por radiofrecuencias (rf) en las cuatro varillas de metal (cuadrupolos). Las varillas adyacentes poseen polaridad opuesta, esto hace que los iones pasen a través del centro de las barras registrando círculos a medida que pasan a lo largo de las barras. Al aumentar la magnitud de los voltajes de cc y rf, en una relación adecuada, se crean trayectorias estables, estas trayectorias permiten que iones de diferentes relaciones m/z pasen a través de los cuadrupolos y salgan al analizador de masas Tof [26].

La técnica espectrométrica de UPLC en combinación con técnicas de espectrometría de masas multietapa, incluida la espectrometría de masas QToF, es una herramienta de alta resolución para el análisis de extractos complejos. Dicho método espectrométrico permite una mayor velocidad de análisis y sensibilidad, así como una mínima dispersión de los iones del analito, generando información masiva con alta precisión y exactitud [27].

2.5. Electroforesis

La electroforesis es una técnica utilizada para estimar el peso molecular de proteínas. Se basa en la migración de las proteínas por la influencia de un campo eléctrico; en donde las partículas migran hacia el cátodo o ánodo, dependiendo de su carga, peso molecular y estructura tridimensional [18].

2.5.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)

El uso de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) es una de las técnicas más utilizadas para la separación y caracterización de proteínas. Los factores más importantes que contribuyen a la separación de las proteínas en PAGE son el peso molecular y la carga de superficie [28]. La matriz de gel de poliacrilamida se forma a través de polimerización de acrilamida y un agente de reticulación bifuncional. El agente de reticulación más comúnmente utilizado es N,N'-metilenediacrilamida (Bis-acrilamida) su uso en el proceso de polimerización se da principalmente para variar el tamaño de poro del gel, el cual se puede modificar cambiando las proporciones de acrilamida, lo que permite la separación de proteínas, con una amplia gama de pesos moleculares. El tamaño de poro, el campo eléctrico, el tamaño y la forma del gel, y la carga superficial, son factores que determinan la distancia a la cual migran las proteínas en el gel y la capacidad de tamizado molecular de la matriz del gel. Porcentajes más altos de acrilamida generalmente dan como resultado una mejor separación de las proteínas de bajo peso molecular [29].

Las características principales de los geles son:

- El pH del gel es de alrededor de 9.
- Insoluble en agua.
- Se puede trabajar con muestras de hasta 10 µg.

La electroforesis en PAGE comúnmente se suele clasificar en desnaturalizante y nativa [19].

2.5.1.1. Electroforesis desnaturalizante

Este método se denomina así debido a que hace uso de compuestos desnaturalizantes como el dodecilsulfato sódico (SDS). El SDS se utilizó inicialmente en la electroforesis para la separación e identificación de cadenas de polipéptidos y posteriormente para la determinación del peso molecular de proteínas, debido a que minimiza los efectos de las diferencias de carga y asegura que todas las proteínas en la muestra migren como aniones [29].

El SDS desnaturaliza y despliega la mayoría de las estructuras proteicas, se une a la proteína dotándolas de una alta carga eléctrica negativa, y mediante la repulsión provoca el desplegamiento de la misma, eliminando así las diferencias en las estructuras secundarias y terciarias. Las proteínas son analizadas como polipéptidos unidos a SDS. También se utiliza de forma habitual un agente reductor, el ditioneitol (DTT), que contribuye a la desnaturalización de las proteínas reduciendo los enlaces disulfuro, desplegando algunas formas de plegamiento terciario y rompiendo la estructura cuaternaria. De este modo se obtiene un fraccionamiento que obedece a la diferencia de peso, tamaño de la cadena, y forma de la proteína. El método de electroforesis SDS-PAGE es el más empleado para analizar y estimar el peso molecular de proteínas [30].

2.5.1.2. Electroforesis nativa

En condiciones de PAGE nativas la migración de las proteínas en el gel depende de su tamaño, conformación y carga. En este método se omite el uso de SDS y del agente reductor DTT. Los geles para PAGE nativa permiten mezclas complejas de proteínas, las cuales se preparan en un solo gel. Este método es particularmente útil para el estudio de la composición y estructura de las proteínas, ya que los polipéptidos retienen su estructura de orden superior y la interacción con otros polipéptidos, y con frecuencia conservan la actividad biológica (actividad enzimática, actividad de unión, etc.) de una proteína. Las separaciones de proteínas toman aproximadamente de 30 a 60 min y no requieren ninguna preparación del amortiguador [31].

2.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

2.6.1. Métodos de extracción de ADN

La extracción de ADN se realiza para obtener moléculas aisladas con alto grado de pureza y para poderlas utilizar en la investigación científica. Existen diferentes métodos para poder

extraer y purificar el ADN, sin embargo, todos los métodos presentan el mismo principio y fundamento. En el cual se lleva a cabo el rompimiento o lisis de células y núcleos. Una vez obtenido el material genético se procede a purificarlo, sin embargo, la purificación es la etapa más importante, depende en gran parte de las propiedades físico-químicas [32], entre los procesos de purificación más comunes se encuentran los siguientes:

- Precipitación mediante sales y alcoholes: los ácidos nucleicos se precipitan añadiendo isopropanol o etanol. Este método permite la obtención de ADN de gran pureza.
- Extracción con solventes orgánicos: en el lisado celular se mezcla con fenol, cloroformo y alcohol isoamílico para llevar a cabo la separación de los ácidos nucleicos y las proteínas. El método permite obtener un alto rendimiento, sin embargo, es frecuente que los restos de solventes orgánicos contaminen la muestra.
- Kits con membranas de cilice: bajo ciertas condiciones de sales el material genético queda retenido en las membranas. En este método es necesario liberar al ADN de la matriz con soluciones de sales [33].

En la técnica de PCR se utiliza el material genético como molde y los oligonucleótidos, estos dos componentes son los factores más importantes para llevar a cabo la replicación selectiva de cualquier segmento de ADN.

2.6.2. Diseño de oligonucleótidos

La amplificación específica del fragmento de ADN deseado requiere que la secuencia de oligonucleótidos no coincida con otras partes de fragmentos no deseados. El proceso de diseño de cebadores específicos generalmente implica dos etapas. En la primera etapa, los oligonucleótidos que se unen a las regiones de interés se generan manualmente o haciendo uso de un software. En la segunda etapa, se utiliza un software para examinar los objetivos potenciales de estos oligonucleótidos diseñados (análisis *in silico*) [34]. Existen muchas herramientas en línea, disponibles gratuitamente, para el diseño de oligonucleótidos y para el análisis *in silico* [35]. Sin embargo, este proceso no es fácil ya que se necesitan examinar muchos detalles entre los oligonucleótidos y los fragmentos de ADN objetivos, tales como:

- La diferencia de longitud de la secuencia de cebadores: Una longitud óptima de diseño de oligonucleótidos es de 16-28 desoxinucleótidos, con una diferencia de longitud de no más de 3 desoxinucleótidos entre el cebador directo y el cebador inverso.
- El contenido de GC (Guanina-Citosina): Una proporción apropiada de contenido de GC de un cebador está usualmente en el rango de 40-60 %. Un contenido superior a este porcentaje puede afectar indirectamente las condiciones de apareamiento del cebador con el fragmento de ADN.
- La temperatura de fusión (Tm): La Tm es el valor más crítico para realizar un experimento de PCR. generalmente, la Tm de un par de cebadores oscila entre 50 °C y 62 °C. La técnica de PCR pueden realizarse con éxito si la diferencia de la temperatura de fusión de un par de cebadores no excede de 5 °C. La diferencia de temperatura de fusión ideal para un par de cebadores es cero.
- Las estructuras secundarias, como los dímeros. El alineamiento de dos cebadores da como resultado un dímero. La aparición de dímeros tiene un impacto negativo en los resultados de un experimento de PCR y, en consecuencia, debe evitarse la hibridación de dos cebadores.

La complejidad de este tipo de análisis generalmente hace que esta tarea sea muy lenta y muy difícil, especialmente cuando los cebadores tienen una gran cantidad de nucleótidos [36].

2.6.3. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (por sus siglas en inglés polymerase chain reaction), es una de las técnicas que ha revolucionado a la ingeniería genética y la biología molecular en general, desarrollada por el Dr. Kary Mullis en los años 80, esta técnica permite producir *in vitro*, grandes cantidades de una secuencia de ADN de forma específica y sin depender del clonado de dichos fragmentos de ADN en organismos vivos [37].

La técnica de PCR permite la replicación selectiva de cualquier segmento de ADN, ya que sintetiza dos nuevas hebras de ADN a partir de otras que funcionan como molde [38], para ello se requiere de:

- El extracto de ADN a partir del cual se generan las copias de ADN.
- Los oligonucleótidos cebadores o *primers*, los cuales son complementarios a una región del fragmento de ADN a amplificar.
- El ADN polimerasa, la cual es capaz de sintetizar el ADN utilizando como molde el fragmento de ADN.
- Los desoxinucleótidos o dNTPs, los cuales serán incorporados a las nuevas cadenas de ADN.
- Cloruro de magnesio ($MgCl_2$) u otro co-factor necesario para que trabaje la polimerasa.
- Una solución amortiguadora que mantenga el pH apropiado para que se lleve a cabo la síntesis.

La mezcla de los componentes anteriores se somete a una serie de ciclos de reacción los cuales consisten en:

- Desnaturalización o separación de la doble hélice del extracto de ADN, esto se da por el calentamiento de la muestra, entre 94 y 96 °C, para romper los puentes de hidrógeno que une las hélices.
- Alineación: los diseños de oligonucleótidos se unen a los sitios específicos complementarios de las cadenas sencillas de la región que se va a amplificar, para que esto suceda se baja la temperatura entre 40 y 60 °C lo que permite la unión (alineamiento).
- Extensión: se sintetiza una nueva cadena en sentido 5' a 3', por lo general se da a una temperatura de 72 °C, que es la temperatura óptima a la cual el ADN polimerasa se une a los cebadores y comienza la replicación, en la replicación se utilizan los desoxinucleótidos para formar la nueva cadena de ADN.

Este ciclo se repite sucesivamente, y en cada nuevo ciclo se amplifica la región de interés de las dos cadenas complementarias. Al final de todos los ciclos se tienen los amplicones con

un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) [37], como se muestra en la Figura 4.

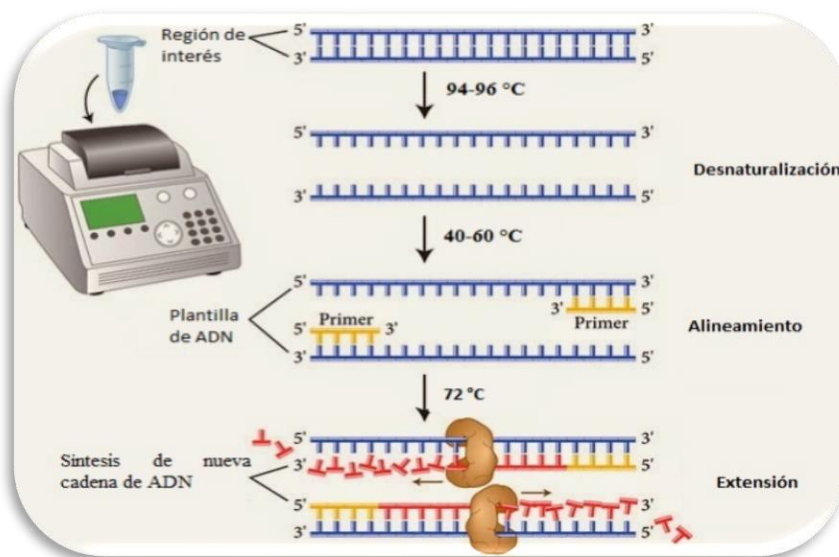


Figura 4. Etapas de la PCR.

2.7. Fluidos supercríticos

La ciencia de la extracción con disolventes ha evolucionado durante un largo período de tiempo y se ha hecho un gran progreso en el estudio de la comprensión de la solvatación y las propiedades de las mezclas de líquidos utilizados en procesos de extracción. La extracción con fluidos supercríticos (EFS) utiliza disolventes que se encuentran por encima de su punto crítico [39]. Un punto crítico para una sustancia pura se define como la máxima temperatura y presión a la que la sustancia puede existir en equilibrio vapor-líquido. A temperaturas y presiones por encima de este punto, se forma un solo fluido homogéneo, que se conoce como fluido supercrítico (FSC) el cual tiene el poder de penetración de un gas y de disolver las muestras como las de un líquido, estas propiedades hacen al fluido un disolvente eficaz y selectivo [40].

La EFS puede ser utilizada para extraer ingredientes activos o analitos de diversas plantas y muestras microbianas, siendo particularmente útil en la extracción de productos naturales [39]. El fluido supercrítico de uso más común es el dióxido de carbono (CO₂). Las principales ventajas del CO₂ son: bajo costo, se consigue con una alta pureza, es selectivamente controlable, su temperatura crítica (31°C) es cercana a la ambiente, no es tóxico comparado con otros disolventes orgánicos y a la presión atmosférica es un gas, por lo tanto, se puede retirar del analito de forma sencilla [41]. En condiciones estándar de temperatura y presión (25 °C y 1 bar) el CO₂ presenta una baja polaridad, esto se debe principalmente a su constante dieléctrica, sin embargo, en condiciones supercríticas (40 °C y 200 bar) el CO₂ presenta una constante dieléctrica de aproximadamente 1.5, esto proporciona al compuesto una polaridad semejante a la del pentano líquido y, por lo tanto, es más adecuado para la extracción de compuestos lipófilos [42].

Se pueden utilizar otros fluidos supercríticos, no obstante, algunos disolventes son inflamables a temperatura ambiente y su uso a nivel industrial es restringido debido a su efecto negativo sobre el medio ambiente, tal es el caso de los clorofluorocarbonos.

2.7.1. Aplicación de extracción con fluidos supercríticos en productos naturales

Por lo general en el caso de materiales vegetales, los ácidos grasos se extraen con disolventes orgánicos. Los métodos de extracción con disolventes tradicionales requieren cantidades relativamente grandes de disolventes, dejan residuos tóxicos y generalmente causan la degradación de los compuestos insaturados por las altas temperaturas de operación. Debido a este hecho, hay una demanda creciente de diferentes técnicas de extracción con tiempos más cortos y con el uso de una menor cantidad de disolventes. La extracción con fluidos supercríticos, enzimática acuosa y técnicas de extracción asistida por ultrasonido, son las técnicas más estudiadas para la obtención de aceites [43].

Probablemente, el uso más extendido de EFS es en el campo de los alimentos, en el cual se ha publicado en los últimos años, utilizando una alta variedad de muestras, materiales,

compuestos de interés y procedimientos [39]. En la Tabla 2 se muestran algunos ejemplos de aplicación de la EFS para obtener compuestos de interés a nivel comercial, así como las compañías que aplicaron este método.

Tabla 2. Aplicación de la EFS para la extracción de productos naturales comerciales [40].

Producto natural	Localización	Año en que inicio	Compañía
Café	Alemania	1979	HAG-General Foods
	EUA	1988	General Foods
Lúpulo	Alemania	1982	Carlton and United
	Australia	1985, 1988	Barth
Lúpulo y Especies	Alemania	1988	SKW Chemicals
	Inglaterra	1983	English Hops
Té	Alemania	1986	SKW Chemicals

En el 2016, en el laboratorio de la Universidad Tecnológica de la Mixteca, Hernández-Martínez [44], construyó un equipo de EFS el cual fue utilizado para la extracción de aceite esencial de menta verde (*Mentha spicata* L.). Los principales elementos del equipo son: un cilindro de disolvente (CO₂), una válvula de globo para el paso de fluido (V1 y V2), válvula micrométrica (VM), manómetro de caratula (M1-M3), regulador industrial de presión (RP), regulador industrial de contra-presión (RCP), termocompresor de acero inoxidable T-316 (TC), cinta de calentamiento (CC), indicador digital de temperatura (IDT), indicador digital de presión (IDP), medidor de flujo (MF), baño térmico (POLYSCIENCE) (BT), baño de acrílico DE 20 x 20 x 30 cm (BA), celda de extracción de acero inoxidable T-316 (CE) y celda de recolección (CR) (Figura 5). El modo de operación del equipo es de presurización del gas por efecto de la temperatura.

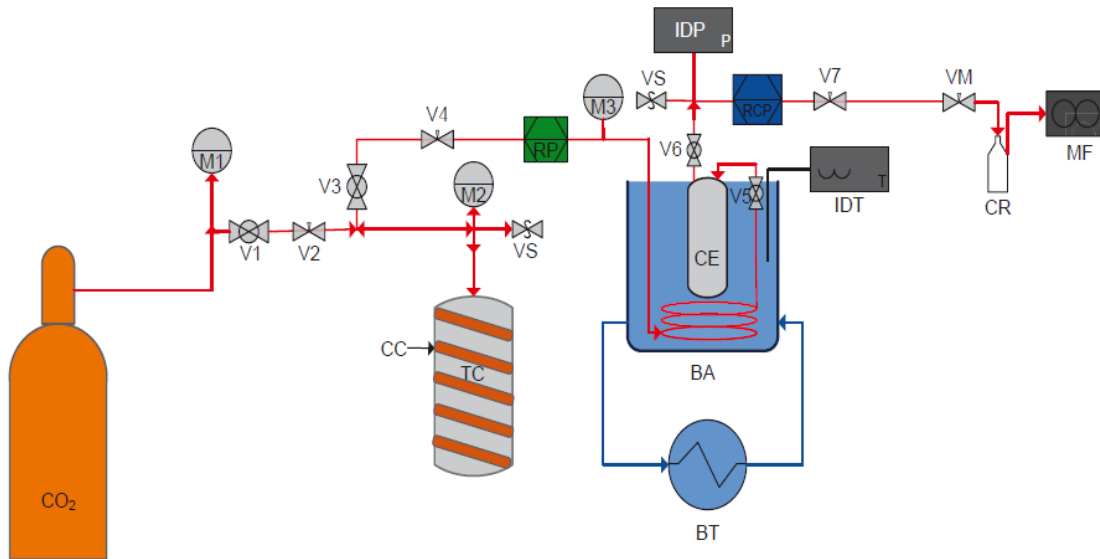


Figura 5. Diagrama del equipo de extracción supercrítica.

El modo de operación del equipo para realizar la extracción es estático-dinámico, el proceso comienza en modo estático, en el cual se utiliza una cantidad fija de disolvente (CO_2) a condiciones de temperatura y presión crítica ($35\text{ }^\circ\text{C}$ y 100 bar) para interactuar con la muestra. Posteriormente se emplea el modo dinámico, en el cual el disolvente se hace pasar de forma continua a través de la muestra, para este caso el disolvente libre de extracto se encuentra siempre en contacto con la muestra. Posterior a estas etapas se culmina con la despresurización de la celda de extracción y la recuperación del aceite extraído.

2.8. Quintoniles (*Amaranthus hybridus* L.)

Las plantas de *Amaranthus hybridus* L. son de rápido crecimiento (90 días aproximadamente), resistentes a la sequía, lo que le permite crecer en condiciones áridas y/o en suelos poco fértiles [45]. Son plantas herbáceas, distribuidas en México, Perú y otros países andinos, y se cultivan a pequeña escala en países de América Central y América del Sur [46].

Las plantas de *Amaranthus hybridus* L., denominadas frecuentemente como “bledo”, “quelite”, “quintonil” (o “quintolil”), son comestibles. Es una planta erguida, de hasta 2 m de alto, generalmente de 1 m o menos, con tallos estriados, a veces rojizos, con frecuencia muy ramificados (Figura 6). Los peciolos son delgados, de 10 a 15 cm de largo; en forma de láminas foliares ampliamente lanceoladas a ovadas u ovado-rómbicas, de 3 a 15 cm de largo por 1 a 7 cm de ancho, con base atenuada, a veces teñidas de rojo. La planta presenta inflorescencias de numerosas flores dispuestas en abundantes espicastro paniculados, la inflorescencia terminal es erguida, de 4 a 12 cm de largo por 1 a 2.5 cm de ancho, las inflorescencias laterales hasta la mitad de esas dimensiones, erguidas o extendidas, brácteas ovadas a lanceoladas, de aproximadamente 5 mm de largo, acuminadas y largamente aristadas en la punta; 3 ramas del estigma; utrículo subgloboso, igual o más corto que los tépalos, con semillas de 1 mm de diámetro, de color café-rojizo o negro brillante [47].



Figura 6. Quintoniles (*Amaranthus hybridus* L.).

Las hojas y tallos tiernos de los quintoniles son las únicas partes consideradas comestibles. Estas partes se consumen crudas, cocidas o se fríen ligeramente y se combinan con sopas, tacos, quesadillas, pinole o esquites. En algunos platillos constituyen el componente

principal, pero también puede ser el condimento que proporciona diferentes sabores y aromas a diversos platillos.

En varias zonas rurales los quintoniles se consumen al inicio del ciclo agrícola, ya que estos crecen entre los sembradíos de maíz. Por lo tanto, los retoños verdes se suman a la dieta para la subsistencia de los campesinos y sus familias, hasta que los cultivos principales son cosechados.

El consumo de quintoniles en México continúa a pesar de que su popularidad ha variado a lo largo de la historia y de que la riqueza de planta ha decaído. Son consumidos en mayor proporción en zonas rurales en donde se conservan las comidas tradicionales ancestrales [48].

Diemeleou & Niamke [49], examinaron la composición de las semillas de *Amaranthus hybridus* L. extrayendo los ácidos grasos por medio del método de Soxhlet y determinando su composición utilizando cromatografía de gases. En el perfil cromatográfico de la composición de ácidos grasos destacó la presencia de cinco compuestos: ácido palmítico (19.01 ± 0.01 %), esteárico (9.03 ± 0.01 %), oleico (36.45 ± 0.01 %), linoleico (33.16 ± 0.01 %) y linolénico (2.34 ± 0.01 %).

3. ANTECEDENTES

3.1. Fuentes para la extracción de la enzima HPL

Los valores reportados de la actividad enzimática específica de los extractos crudos van desde los 0.06 hasta 9.30 U/mg de proteína, y de enzima purificada de 3.50 hasta 243.96 U/mg de proteína (Tabla 3).

Tabla 3. Valores reportados de actividad enzimática específica de extracto crudo y enzima HPL purificada.

Materia prima	Extracto crudo, U/mg de proteína	Enzima purificada, U/mg de proteína
Aceitunas (<i>Olea europaea</i>) [9]	0.06	3.50
Girasol (<i>Helianthus annuus</i> L.) [10]	0.486	93.60
Pepinos (<i>Cucumis sativus</i>) [11]	0.69	60.85
Guayaba (<i>Psidium guajava</i>) [50]	9.30	243.96
Tomate (variedad <i>trust</i>) [12]	0.45	3.90
Chícharo (<i>Pisum sativum</i> L.) [1]	0.71	7.71
Pimiento verde (<i>Capsicum annuum</i> L.) [51]	5.78	28.48
Amaranto tricolor (<i>Amaranthus mangostanus</i> L.) [14]	0.90	31.40

La enzima HPL ha sido extraída de diferentes partes de las plantas: hojas, cotiledones, granos y frutos, con la finalidad de purificarla y caracterizarla. Algunas de estas plantas y frutos son: hojas de menta (*Mentha veridis* y *Mentha pulegium*) [52], hojas de olivo [2], hojas de remolacha de azúcar (*Beta vulgaris* L.) [13], melón (*Cucumis melo*) [53], hojas de amaranto tricolor (*Amaranthus mangostanus* L.) [14], aceitunas (*Olea europaea*) [9], hipocótilos y hojas de girasol (*Helianthus annuus* L.) [10], pepino (*Cucumis sativus*) [11], guayaba (*Psidium guajava*) [50], tomate [12], vástago, raíz y semilla de chícharo [1] y pimiento verde (*Capsicum annuum* L.) [51]. Además, la enzima HPL ha sido expresada en microorganismos,

tal es el caso de la HPL del pimiento verde, tomate, papa y hojas de olivo expresadas en *Escherichia coli*, [53, 54, 55], *Saccharomyces cerevisiae* [2, 7], *Yarrowia lipolytica* [56] y *Penicillium sp.*[57].

En trabajos previos, realizados por este equipo de trabajo en el 2015, se determinó la actividad específica de la enzima HPL a partir de extractos crudos de once plantas cultivadas en el estado de Oaxaca (Tabla 4), en estos trabajos también se estimó el peso molecular de la enzima por electroforesis SDS-PAGE [4].

Tabla 4. Actividad enzimática de extractos crudos de once plantas cultivadas en el estado de Oaxaca [4].

Materia prima	Actividad enzimática total, U	Actividad enzimática específica, U/mg de proteína
Chepiche (<i>Porophyllum tagetoides</i>)	11.45 ± 0.70	0.100 ± 0.007
Hierbamaestra (<i>Artemisa absinthium</i>)	13.69 ± 3.72	0.100 ± 0.010
Ruda (<i>Ruta graveolens</i>)	14.11 ± 5.20	0.168 ± 0.052
Palma (<i>Palmae breashea dilcis</i>)	14.14 ± 5.18	0.234 ± 0.070
Árnica (<i>Heterotheca inuloides cass.</i>)	45.21 ± 10.80	0.185 ± 0.090
Manzanilla (<i>Matricaria recutita</i>)	47.44 ± 0.10	0.653 ± 0.010
Moringa (<i>Moringa oleífera</i>)	87.16 ± 2.25	1.533 ± 0.050
Hierbabuena (<i>Mentha spitaca</i>)	147.83 ± 0.05	0.395 ± 0.030
Quintoniles (<i>Amaranthus hybridus L.</i>)	149.10 ± 1.38	0.433 ± 0.060
Té limón (<i>Cymbopogon citratus</i>)	192.80 ± 9.60	2.440 ± 0.075
Orégano (<i>Origanuu vulgare L.</i>)	195.44 ± 11.10	0.624 ± 0.100

Como se observa en la Tabla 4, los extractos crudos que presentaron una mayor actividad enzimática total fueron los extractos de orégano, té limón, quintoniles y hierbabuena. Con respecto a la actividad enzimática, las muestras que presentaron una mayor actividad específica fueron las de té limón y las de moringa. Al realizar la detección de la enzima por electroforesis, la presencia de la banda característica de la enzima HPL fue muy marcada en los extractos de quintoniles con respecto a las otras plantas, observándose un peso molecular aproximado de 64.0 kDa (Figura 7).

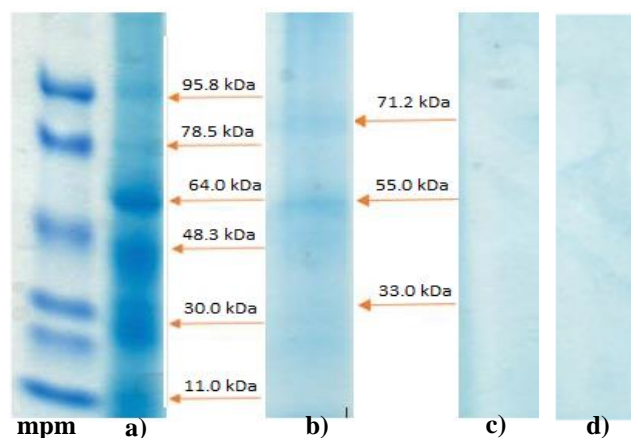


Figura 7. Gel de electroforesis SDS-PAGE, bandas identificadas en a) quintoniles, b) hierbabuena, c) té limón y d) orégano. mpm: marcador de pesos moleculares [4].

3.2. Métodos de purificación de la enzima HPL

Los métodos que se han utilizado para purificar la enzima HPL extraída a partir de plantas, frutos y semillas, reportados en la bibliografía, se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5. Métodos de purificación utilizados para la enzima HPL.

Materia prima	Métodos cromatográficos de purificación	Factor de purificación
Chícharo (<i>Pisum sativum</i> L.) [1]	Intercambio iónico	1.93
	Hidroxiapatita	10.10
Aceitunas (<i>Olea europaea</i>) [9]	Intercambio iónico	42.00
	Hidroxiapatita	58.00
Pepinos (<i>Cucumis sativus</i>) [11]	Intercambio iónico	30.60
	Hidroxiapatita	88.10
Tomate (variedad <i>trust</i>) [12]	Exclusión molecular	8.68
	Intercambio iónico	8.68
Pimiento verde (<i>Capsicum annuum</i> L.) [51]	Intercambio iónico	22.31
	Exclusión molecular	4.930
	Intercambio iónico	9.40
Girasol (<i>Helianthus annuus</i> L.) [10]	Interacción hidrofóbica	56.60
	Exclusión molecular	166.00
	Exclusión molecular	5.40
Guayaba (<i>Psidium guajava</i>) [50]	Interacción hidrofóbica	6.10
	Hidroxiapatita	26.20
	Enfoque isoeléctrico	68.20
	Intercambio iónico	5.00
Amaranto tricolor (<i>Amaranthus mangostanus</i> L.) [14]	Interacción hidrofóbica	17.60
	Hidroxiapatita	34.90

Como puede observarse en la tabla anterior, se requieren entre dos y cuatro etapas de purificación. Para la enzima extraída del girasol se utilizaron tres etapas de purificación [10], obteniéndose una enzima HPL con un factor de purificación de 166 y en las hojas de amaranto tricolor un factor de purificación de 34.9 [14].

Recientemente se ha estudiado la purificación parcial de la enzima HPL extraída de las hojas de orégano (*Origanum vulgare* L.) [58]. En este trabajo, Espinoza-Rivera realizó una etapa de purificación de la enzima HPL contenida en los extractos crudos, utilizando cromatografía de intercambio iónico. La actividad total de enzima HPL reportada fue de 12.42 U y una concentración de proteína de 4.75 µg/mL. Las pruebas de electroforesis en geles SDS-PAGE al 12 % de poliacrilamida mostraron un peso molecular de 56.6 kDa, lo cual concuerda con el peso reportado para la enzima HPL.

3.3. Uso de la técnica de PCR para la identificación de la enzima HPL

La técnica de PCR se ha utilizado en algunos extractos de ADN obtenido de plantas, generalmente para corroborar la presencia e integridad de la enzima HPL. En algunos estudios como los realizados en la sandía (*Citrullus lanatus*) la técnica de PCR se utilizó para determinar la presencia de la enzima y el producto obtenido se ligó en el vector de clonación para poder expresar la enzima HPL en *Nicotiana tabacum*. De igual forma se realizó la técnica de PCR en arabis (*Arabidopsis thaliana* L.), el producto se utilizó para expresar la enzima HPL en *Nicotiana tabacum*. Las actividades enzimáticas de las enzimas sobreexpresadas de sandía con respecto a las sobreexpresadas en arabis fueron 10 veces mayor [59]. En el tomate (*Lycopersicon esculentum*) [55], melón (*Cucumis melo*) [53], pimiento verde (*Capsicum annuum* L.) [60] y guayaba (*Psidium guajava*) [50] se utilizó la técnica de PCR con el objetivo de buscar las homologías de las secuencias pertenecientes a la enzima HPL y comparar esta secuencia con la de otras plantas, también se determinó la similitud con las proteínas CYP74 y con la familia del citocromo P450.

3.4. Fuentes y métodos de obtención del sustrato para la enzima HPL

La enzima HPL tiene una mayor afinidad por los sustratos del ácido 13(*S*)-hidroperoxi-(9*Z*,11*E*)-octadecadienoico (13-HPOD) y el ácido 13(*S*)-hidroperoxi-(9*Z*,11*E*,15*Z*)-octadecatrienoico (13-HPOT), siendo los menos activos los del ácido 9(*S*)-hidroperoxi-(10*E*,12*Z*)-octadecadienoico (9-HPOD) y el ácido 9(*S*)-hidroperoxi-(10*E*,12*Z*,15*Z*)-octadecatrienoico (9-HPOT). La clasificación de la enzima HPL depende del sustrato utilizado. La enzima 13-HPL utiliza los sustratos 13-HPOD o 13-HPOT para producir hexanal y hexenal, respectivamente; mientras que la enzima 9-HPL utiliza 9-HPOD y 9-HPOT como sustratos para formar aldehídos de 9 carbonos [61]. El sustrato para la enzima HPL se puede obtener a través de la vía de la lipoxigenasa (LOX) [1, 14, 62], catalizando la oxigenación específica de la posición 13 o 9 del ácido linoleico para producir sus correspondientes hidroperóxidos el 13-HPOD y el 9-HPOD o los hidroperóxidos producidos a partir del ácido linolénico, el 13-HPOT y el 9-HPOT. Estos productos son utilizados como sustrato por la enzima HPL para formar aldehídos y oxoácidos.

Regularmente, la producción del sustrato se ha realizado utilizando como materia prima los ácidos linoleico y linolénico puros, comercializados por Sigma-Aldrich [1, 14, 62]. Sin embargo, el precio de estos ácidos grasos es alto, 500 mg de ácido linoleico tienen un precio de \$929.00 y 500 mg de ácido linolénico un precio de \$1,797.00. Son pocos los trabajos en los que se ha utilizado materia prima diferente como fuente de obtención de estos ácidos grasos, un ejemplo de esto se reporta en el trabajo de Noordermeer *et al.* [63], Aziz *et al.* [64], así como en el de Santiago-Gómez *et al.*[65], en este último trabajo se utilizaron los ácidos grasos de aceite de oleína, una fuente compuesta por 48 % de ácido linolénico y 18 % de ácido linoleico, como sustrato para la enzima lipoxigenasa, de harina de soya, para la obtención de hidroperóxidos.

3.5. Extracción supercrítica de aceites esenciales

El CO₂ supercrítico se ha utilizado con éxito para la extracción de aceites a partir de semillas oleaginosas incluyendo colza, cacahuate, almendra, pistacho, nogal y de albaricoque, entre otros [66]. La EFS se ha aplicado a una gran variedad de alimentos a partir de los cuales se han obtenido aceites esenciales y ácidos grasos. En la Tabla 6 se resumen algunas aplicaciones de la EFS para la obtención de estos aceites.

Tabla 6. Extracción de compuestos bioactivos a partir de diferentes matrices por extracción con CO₂ supercrítico.

Matriz	Compuesto extraído	Condiciones de extracción
Tomate y avellanas [67]	Licopeno y aceites esenciales	CO ₂ , 400 bar, 60 °C
Canola [68]	Ácidos grasos esenciales	CO ₂ , 207 bar, 35 °C
Pupas de gusano de seda [69]	Ácidos grasos (saturados y polinsaturados)	CO ₂ , 200-300 bar, 35-45 °C
Amaranto [41]	Aceite y escualeno	CO ₂ , 150-350 bar, 40-70 °C
Melocotón [70]	Aceite esencial	CO ₂ , 100-300 bar, 30-50 °C
Menta [71]	Aceite esencial	CO ₂ , 90 bar, 45 °C
Nuez [72]	Aceite	CO ₂ , 400 bar, 50 °C

Por otro lado, la EFS se ha utilizado en las semillas de amaranto para la extracción de ácidos grasos, utilizando CO₂ como disolvente, a diferentes condiciones de presión, flujo y temperatura, en este trabajo obtuvieron rendimientos de 6 a 50.7 %, con respecto a la grasa total.

4. JUSTIFICACIÓN

La enzima hidroperóxido liasa (HPL) es necesaria para la formación de compuestos volátiles (como los aldehídos) provenientes de derivados de ácidos grasos, los cuales son responsables de las notas verdes, “aroma a fresco” [8]. Dichas notas verdes se utilizan en la industria de alimentos para reconstituir o mejorar las propiedades organolépticas asociadas con la frescura, forman parte de la gran variedad de olores que existen en el mercado, los cuales junto con los sabores son considerablemente importantes para la industria de alimentos, cosméticos, química y farmacéutica. Estos representan actualmente casi 7 mil millones de dólares al año en EEUU, una cifra que aumenta un 4.4 % cada año [3]. La enzima HPL se ha obtenido por diferentes métodos como la extracción directa de frutas y de hojas verdes y manipulación genética de microorganismos [73]. En la actualidad la enzima HPL no se encuentra en el mercado. Continúan las investigaciones para obtenerla en concentraciones y con actividades enzimáticas importantes, por lo que es necesaria la búsqueda de nuevas fuentes naturales, seguras, baratas y asequibles.

Además, para que se obtengan los productos deseados a partir de la enzima HPL se requiere de sustratos como los hidroperóxidos de ácidos grasos (HPOT y HPOD), producidos por los ácidos linoleico y linolénico, los cuales tienen un precio alto en el mercado, encareciendo la producción de notas verdes [43].

Generalmente el peso molecular de la enzima HPL es expresado como un aproximado ya que no se tiene conocimiento del peso molecular exacto, por lo cual en este trabajo se propuso evaluar el uso de UPLC-QToF para determinar el peso molecular exacto de la enzima.

Por otro lado, hasta el momento no se tiene conocimiento de la similitud de la enzima HPL de quintoniles con las enzimas HPL de otras plantas, lo cual, permitirá en un futuro utilizar el ADN de la enzima HPL de las hojas de esta planta para su expresión en microorganismos.

Por lo tanto, el presente proyecto de investigación se justifica por las siguientes razones:

1. Se presenta una alternativa para la obtención de compuestos volátiles de forma natural, mediante la extracción de la enzima HPL a partir de la planta *Amaranthus hybridus* L., la cual es subutilizada.

2. Se presenta el estudio que ofrece una alternativa de obtención del sustrato a través de la obtención de ácidos grasos por extracción supercrítica, una técnica que utiliza disolventes amigables para el ambiente y presenta una buena selectividad en la extracción.
3. Se presentan avances de la técnica de PCR aplicada al fragmento de ADN de la enzima HPL extraído de las hojas frescas de quintoniles.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

- Purificar y caracterizar la enzima hidroperóxido liasa, así como la producción del sustrato a partir de ácidos grasos, obtenidos de quintoniles (*Amaranthus hybridus* L.).

5.1.1. Objetivos específicos

- Caracterizar taxonómicamente la planta de los quintoniles, cultivada en Santiago Huajolotitlán, Huajuapán de León, Oaxaca.
- Extraer la enzima hidroperóxido liasa de las hojas frescas de quintoniles, para su purificación.
- Purificar la enzima HPL mediante cromatografía de intercambio iónico, de interacción hidrofóbica y de hidroxipatita.
- Determinar el peso molecular de la enzima HPL, mediante electroforesis y con el equipo de UPLC-QToF.
- Realizar el diseño de los oligonucleótidos para la enzima HPL utilizando las secuencias de ADN reportadas en la bibliografía, para su aplicación en PCR.
- Producir el sustrato para la enzima HPL mediante la oxidación de un ácido graso puro (ácido linolénico).
- Producir el sustrato para la enzima HPL mediante la oxidación de una mezcla de ácidos grasos obtenidos por EFS.
- Comparar las actividades específicas de la enzima HPL, utilizando los sustratos obtenidos mediante la oxidación del ácido graso puro y la oxidación de una mezcla de ácidos grasos.

6. METODOLOGÍA

En la Figura 8 se muestran los pasos que se siguieron para extraer, purificar y caracterizar la enzima HPL extraída de la planta de quintoniles (*Amaranthus hybridus* L.).

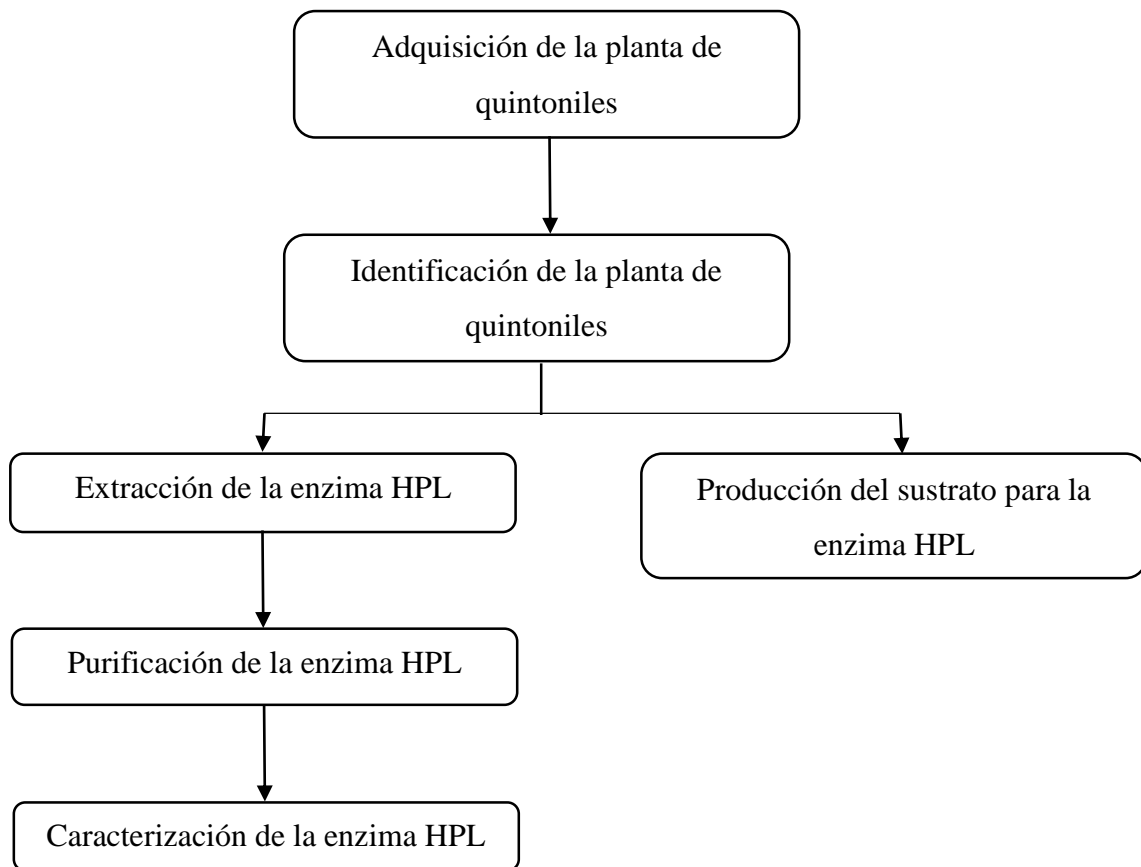


Figura 8. Metodología para la purificación y caracterización de la enzima HPL a partir de quintoniles (*Amaranthus hybridus* L.).

6.1. Adquisición e identificación de la planta

Los quintoniles empleados en el trabajo fueron obtenidos del municipio de Santiago Huajolotitlán, Oaxaca; a 30 min de la ciudad de Huajuapán de León. La planta fue depositada en el Herbario Nacional del Instituto de Biología de la UNAM, e identificada por la Dra. Emma Cristina Mapes Sánchez.

6.2. Producción del sustrato para la enzima HPL a partir de ácidos grasos puros

La obtención de los hidroperóxidos se realizó a partir de ácido linolénico con alta pureza. Se pesó 15 mg de la enzima lipoxigenasa (Sigma-Aldrich) y 200 mg de ácido linolénico (pureza $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich). La mezcla se adicionó a un matraz Erlenmeyer de 1 L junto con 200 mL de amortiguador de glicina (Bio-Rad) (0.2 M, pH 9.0). El matraz se colocó en una parrilla y se agitó por 1 h conservando una temperatura de 25 °C y un flujo constante de oxígeno (presión 0.1 bar o 20 mL O₂/min) [8]. La enzima se inactivó con la adición de H₂SO₄ hasta alcanzar un pH de 3.0 [74]. Posteriormente los hidroperóxidos formados fueron extraídos dos veces con un volumen equivalente 1:1 (v/v) de éter etílico en un embudo de separación [75]. La fase orgánica recuperada se secó con MgSO₄ anhidro. El éter fue evaporado empleando un rotavapor modelo R-100 (Buchi). Los hidroperóxidos se recuperaron con etanol anhidro y se almacenaron a -20 °C. La presencia de los hidroperóxidos fue determinada realizando un barrido a las muestras en un espectrofotómetro modelo UV765 UV-visible (Hinodek), utilizando celdas de cuarzo y una longitud de onda de 200 a 400 nm. Para determinar la concentración de los hidroperóxidos producidos, se midió la absorbancia de las muestras a 234 nm y se consideró un valor del coeficiente de extinción molar $\epsilon = 25,000 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ [8].

6.3. Extracción de la enzima HPL de los quintoniles

Para la extracción de la enzima HPL se utilizaron las hojas de quintoniles frescos. Se seleccionaron las hojas en buen estado las cuales fueron lavadas con agua, eliminando el exceso de agua con papel absorbente. Después se pesaron 50 g de hojas, se añadió 100 mL de amortiguador de Tris-HCl (pureza ≥ 99.8 %, Bio-Rad) (0.1 M, pH 8.5), el cual contenía polivinilpirrolidona (PVP40, Sigma-Aldrich) al 0.5 % (p/v), DTT (Bio-Rad) 0.001 M y Tritón X-100 (grado laboratorio, Sigma-Aldrich) al 0.3 % (v/v) y se molieron en una licuadora por 1 min, en intervalos de 10 s. El homogenizado se agitó por 90 min a 4 °C y posteriormente se filtró a través de manta de cielo, al filtrado se le realizó la extracción de clorofilas y lípidos con una mezcla hexano-acetona (3:2) en una relación de 1:1. Se centrifugó, utilizando una centrifuga modelo 5810R con Rotor FA-45-6-30 (Eppendorf), a 8000 x g por 7 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido se denominó extracto crudo de la enzima HPL [14].

6.4. Purificación de la enzima HPL

Las fracciones obtenidas en cada etapa de purificación se les determinó la concentración de proteína, actividad enzimática total y específica. Los sustratos utilizados para la enzima HPL fueron obtenidos a partir del ácido linolénico puro.

6.4.1. Precipitación de la enzima con sulfato de amonio

Al extracto crudo de la enzima HPL se le agregó sulfato amónico (J.T. Baker) en pequeñas cantidades hasta llegar a una concentración de 35 % de sulfato de amonio [76], la muestra se agitó hasta observar una separación de fases, la cual duró aproximadamente 105 min, durante la agitación la muestra se colocó en un baño de hielo [14]. Posteriormente la mezcla se colocó en un embudo de separación y se dejó reposar durante 12 h. Transcurrido este tiempo, se

midió la concentración de proteína y actividad enzimática de las dos fases obtenidas, se separó la fase acuosa inferior la cual presentó actividad enzimática, se centrifugó la fase inferior, para retirar los restos la fase superior, a 8300 x g durante 15 min a 4 °C. La fase inferior se dializó por 12 h, utilizando una membrana de diálisis de celulosa (12 a 14 kDa, Sigma-Aldrich) y amortiguador A: Tris-HCl (0.02 M, pH 8.5), Tritón X-100 al 0.3 % (v/v) y DTT 0.001 M. La solución enzimática se almacenó a 4 °C hasta su uso.

6.4.2. Primera etapa de purificación

6.4.2.1. Preparación de la resina y equilibrio de la columna

La preparación y empaqueo de la resina en la columna se realizó conforme a las instrucciones de proveedor TOYOPEARL DEAE-650M Column Packing.

La cantidad de resina TOYOPEARL DEAE-650M (Tosoh, Supelco Analytical) utilizada se calculó en base a las especificaciones de la columna Bio-Scale MT20 de 15 x 124 mm (Bio-Rad). El volumen de la resina se consideró con un 20 % de exceso, por lo tanto, el volumen de resina fue de 26.28 mL. El frasco que contiene la resina se agitó de forma vigorosa para una correcta homogenización. Posteriormente, se midieron 35.04 mL de suspensión de resina, tomando en cuenta que cuatro volúmenes de la suspensión son equivalentes a tres volúmenes de resina, a este volumen de suspensión se le adicionaron 141.6 mL de agua destilada, se agitó y se dejó en reposo durante 40 min, para obtener un tamaño de partícula fino, una vez transcurrido este tiempo se decantó el sobrenadante. Se repitió la adición de agua y decantación tres veces más, y en el último lavado se sustituyó el agua destilada por la solución amortiguadora A. Al finalizar la preparación de la resina se procedió a colocarla en la columna, a la cual se le hizo pasar un flujo de 0.5 mL/min de amortiguador A, hasta que el lecho se mantuvo estable (20-30 min). Se aumentó el flujo a 1.5 mL/min y se mantuvo por aproximadamente 15 min. Una vez transcurrido este tiempo se detuvo el flujo y se eliminó el exceso de resina en la columna, posteriormente se montó y ajustó el adaptador hasta la superficie del medio. Una vez empacada la columna con la resina, se procedió a equilibrarla con amortiguador A, a una velocidad de flujo de 1.25 mL/min por 48 min.

6.4.2.2. Cromatografía de intercambio iónico

El dializado obtenido en la precipitación con sulfato de amonio se pasó por un filtro de 0.45 μm [51]. El filtrado fue aplicado a la columna. La enzima se eluyó con amortiguador A con diferentes concentraciones de NaCl (0, 0.25 y 1.00 M) a una velocidad de flujo de 1.5 mL/min. Las fracciones purificadas se concentraron con amicones ultra-15 (30 kDa) y se dializó por 12 h a 4 °C, utilizando una membrana de diálisis de celulosa (12 a 14 kDa, 12 a 14 kDa, Sigma-Aldrich) y amortiguador B: Tris-HCl (0.01 M, pH 6.8), DTT 0.001 M y Tritón X-100 al 0.3 % (v/v) [14].

6.4.3. Segunda etapa de purificación

6.4.3.1. Preparación de la resina y equilibrio de la columna

La columna se empacó empleando la metodología especificada por el fabricante. Para obtener una altura del lecho de 10 cm en la columna Bio-Scale MT10 de 15 x 124 mm (Bio-Rad), se adicionaron 12 mL de la resina fenil sefarosa (GE Healthcare), la cual se agitó previamente para homogenizarla. Se añadió etanol al 20 % por la parte superior de la columna y se colocó el adaptador, evitando la retención de burbujas de aire. Se empacó la columna pasando un flujo de 2 mL/min de etanol al 20 %, hasta que el lecho de la resina se mantuvo estable (2-3 min). Se aumentó el flujo a 5.2 mL/min y se mantuvo por aproximadamente 5 min. Una vez transcurrido este tiempo se detuvo el flujo y se retiró el tubo de empaque y el conector. Se eliminó el exceso de resina, se montó y ajustó el adaptador hasta la superficie del medio. Posteriormente, se pasó un flujo a 5.2 mL/min de etanol al 20 % durante 1 min, se detuvo el flujo y se ensambló por completo la columna. Una vez empacada la columna se procedió a equilibrarla, haciendo pasar amortiguador B a un flujo de 0.5 mL/min por 40 min.

6.4.3.2. Cromatografía de interacción hidrofóbica

Las fracciones obtenidas en la cromatografía de intercambio iónico fueron filtradas utilizando una membrana de 0.45 μm , los filtrados se hicieron pasar en la columna empacada con fenil sefarosa. La enzima se eluyó con amortiguador B con diferentes concentraciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0, 0.8 y 0.1 M), a una velocidad de flujo de 1 mL/min. Las fracciones obtenidas fueron concentradas con amicones ultra-15 (30 kDa) y dializadas por 12 h a 4 °C con amortiguador C, el cual contenía fosfato de sodio (0.01 M, pH 6.8), DTT 0.001 M y Tritón X-100 al 0.3 % (v/v) [14].

6.4.4. Tercera etapa de purificación: cromatografía de hidroxiapatita

Las fracciones dializadas de la segunda etapa de purificación se pasaron por una columna de hidroxiapatita, Bio-Scale Mini CHT de 40 μm , 1x5 mL, (Bio-Rad), equilibrada con 80 mL de amortiguador C a una velocidad de flujo de 2 mL/min. La columna se eluyó con amortiguador C, con diferentes concentraciones de fosfato de sodio (200, 250, 300 y 350 mM) a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min.

6.5. Caracterización de la enzima HPL

6.5.1. Determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford

Se realizó una curva estándar de calibración con el estándar de albúmina sérica bovina (ASB) (Bio-Rad) para la cual se prepararon una serie de diluciones a diferentes concentraciones de ASB (0-2 mg ASB/mL). Se tomaron 20 μL de cada dilución las cuales se mezclaron con 1 mL del reactivo de Bradford (colorante reactivo de inicio rápido para Bradford 1 x, Bio-Rad). La mezcla se dejó reposar durante 5 min en oscuridad y posteriormente se midió la

absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro modelo UV765 UV-visible (Hinotek). Para la elaboración de la curva de calibración se graficó la concentración de ASB contra la absorbancia obtenida (Figura 9).

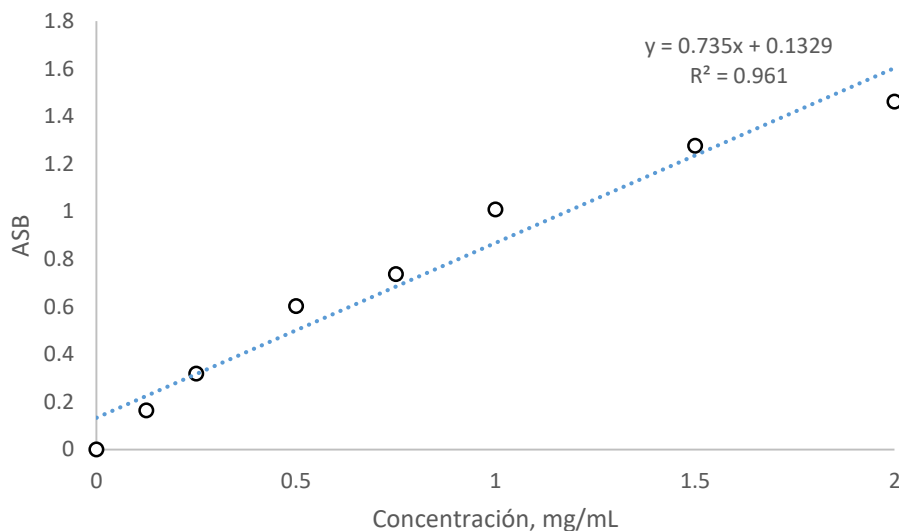


Figura 9. Curva estándar de calibración con ASB.

La determinación de la concentración de proteína de la HPL del extracto crudo y de las fracciones recuperadas se realizó tomando 20 μ L de las muestras las cuales se mezclaron con 1 mL del reactivo de Bradford. La mezcla se dejó reposar durante 5 min y se midió la absorbancia a 595 nm en espectrofotómetro. Finalmente, la concentración de la enzima se determinó sustituyendo la absorbancia obtenida en la ecuación resultante de la curva de calibración [77].

6.5.2. Actividad enzimática total y específica de la enzima HPL

La actividad de la enzima HPL fue determinada por la disminución de la absorbancia a 234 nm debido a la degradación del sustrato (hidroperóxidos de ácidos grasos), utilizando un espectrofotómetro modelo UV765 UV-visible (Hinotek). La mezcla de reacción (3.0 mL) contenía: 10 μ L de hidroperóxidos producidos a partir de los ácidos grasos puros (10 mM),

5 μL de la solución enzimática y 2985 μL de amortiguador de fosfato de sodio (0.01 M, pH 6.0). la muestra calibradora utilizada contenía todos los reactivos a excepción del sustrato, el cual se sustituyó por 10 μL de agua [14]. La pendiente obtenida de la curva resultante, absorbancia vs tiempo, se utilizó para calcular la actividad de la enzima HPL, utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad enzimática total (U)} = \frac{\text{Volumen de reacción} * \left(\frac{m}{\epsilon * b}\right)}{\text{Volumen del extracto de HPL}}$$

Donde:

m = Pendiente (Absorbancia/Tiempo (min))

ϵ = Coeficiente de extinción molar, $\epsilon = 25000 \text{ cm}^{-1} * \text{M}^{-1}$

b = Ancho de la cubeta, cm

Con las actividades enzimáticas totales y con la concentración de proteína se determinó la actividad enzimática específica. La actividad enzimática específica es el número de unidades de enzima por miligramo de proteína (U/mg proteína).

El porcentaje de recuperación se determinó tomando en cuenta el valor de la actividad enzimática total, considerando el 100 % la actividad del extracto crudo. El factor de recuperación se determinó considerando la actividad enzimática específica, la actividad específica del extracto crudo se tomó como la unidad [14].

6.5.3. Electroforesis SDS-PAGE

El extracto crudo y las fracciones eluidas fueron analizadas por electroforesis para estimar el peso molecular de la enzima. Se realizó la electroforesis empleando geles de poliacrilamida

al 12 % (Mini-PROTEAN TGX, Bio-Rad). La cámara se llenó con amortiguador de corrida el cual fue diluido 10 veces, (Tris base 0.2 M pH 8.3) con 1.9 M de glicina (reactivo de pureza para electroforesis, Bio-Rad) y SDS (reactivo de pureza para electroforesis, Bio-Rad) al 10 % (p/v), se realizó una solución (1:20) del marcador de pesos moleculares de bajo rango (Bio-Rad) con amortiguador, Tris-HCl (0.5 M, pH 6.8) con glicerol anhidro (J.T. Baker) al 5 % (v/v), SDS al 10 % (p/v), azul de bromo fenol al 0.1 % (p/v) y β -mercaptoetanol (Bio-Rad) al 5.3 % (v/v), en el primer pozo del gel se agregaron 10 μ L de esta solución del marcador de pesos moleculares y en los demás pozos se agregaron 20 μ L de muestra previamente preparada, 24 μ L de las fracciones diluidas se mezclaron con 6 μ L del amortiguador para la muestra compuesto por Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8) con glicerol al 11.1 % (v/v), SDS al 10 % (p/v), azul de bromo fenol al 1 % (p/v) y β -mercaptoetanol al 5.5 % (v/v). La mezcla se calentó a 100 °C por 5 min. La electroforesis se llevó a cabo a 200 V y 0.05 mA. El voltaje se detuvo hasta que el frente del azul de bromo fenol alcanzó la parte inferior del gel. El gel fue teñido con una solución de tinción azul de Coomassie (azul de Coomassie R-250 al 0.1 % (p/v) con ácido acético al 10 % (v/v) y metanol al 40 % (v/v)) por 50 min y se destiño con una solución decolorante (ácido acético al 10 % (v/v) con metanol al 40 % (v/v)), cambiándola hasta que las bandas del gel estuvieron bien definidas [78].

6.5.4. Determinación del peso molecular de la enzima por UPLC-QToF

La determinación del peso molecular de la enzima HPL por el método espectrométrico se realizó utilizando reactivos grado masas, la metodología empleada se detalla a continuación.

1) Acondicionamiento de la muestra

Las muestras purificadas se dializaron (12 h en agitación y 12 h en reposo a 4 °C) con agua destilada para retirar el Tritón X-100 de la muestra.

2) Preparación y acondicionamiento de la columna

Se realizaron tres lavados a la columna con 200 μ L de ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1 %.

3) Condiciones para LC y análisis por MS

Para el análisis de proteínas se utilizaron las siguientes condiciones.

Condiciones cromatográficas: se utilizó una columna Acquity UPLC BEH C4, 1.7 μm , 2.1 x 50 mm. Fase móvil: A: Agua, 0.1 % ácido fórmico y B: Acetonitrilo, 0.1 % ácido fórmico. Se inyectó 5 μL de muestra, a una velocidad de flujo de 0.2 mL/min. El gradiente de elución lineal fue bajo las siguientes condiciones: 10 % de B (0-5 min), 90 % B (5-7.1 min), 10 % de B (7.1-10 min). La temperatura de la columna fue de 80 °C. Las condiciones de operación del espectrómetro de masas fueron las siguientes: se operó en modo de ionización positivo (ESI+), capilar 2.7 V, cono 35 V, temperatura de la fuente 150 °C, temperatura de desolvatación 350 °C. Los espectros se capturaron de 500 a 3000 m/z. Se utilizó como estándar de referencia de masas (lock mass) leucina/encefalina $[\text{M}+\text{H}]^+ = 556.2771$.

6.6. Amplificación del ADN de las hojas de los quintoniles por PCR

6.6.1. Diseño de oligonucleótidos

El diseño de los oligonucleótidos se realizó utilizando el software libre Primerquest (<https://www.idtdna.com/Primerquest>), utilizando las secuencias de ADN reportadas para la enzima HPL del tomate (*Lycopersicon esculentum*) número de acceso AAF67142 [55], hojas de sandía (*Citrullus lanatus*) con número de acceso AY703450. y arabidopsis (*Arabidopsis thaliana* L.) con número de acceso AAC69871 [59]. El alineamiento de los oligonucleótidos diseñados se realizó utilizando el software libre Primers-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). En el programa Primers-BLAST se introdujeron las secuencias de ADN reportadas para la enzima HPL y el diseño de sus correspondientes oligonucleótidos.

6.6.2. Extracción de ADN

Se utilizó la metodología descrita por Keb-Llanes para la extracción del ADN. Se utilizaron hojas frescas de quintoniles (obtenidos en el municipio de Santiago Huajolotitlán, Oaxaca), hojas de sandía y el fruto de tomate (adquiridos en el mercado central de abastos en Oaxaca). Las muestras fueron lavadas con agua y posteriormente se molieron 0.3 g de muestra en un mortero y pistilo congelados. La muestra molida se transfirió a un tubo Eppendorf, al cual se agregaron 300 μ L de amortiguador D (bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) al 2 % (p/v), Tris-HCl 100 mM (pH 8), EDTA 20 mM, NaCl 1.4 M, polivinilpirrolidona (PVP-40) 4 % (p/v), ácido ascórbico 0.1 % (p/v), β -mercaptoetanol 10 mM), 900 μ L de amortiguador E (Tris-HCl 100 mM (pH 8), EDTA 50 mM, NaCl 100 mM, β -mercaptoetanol 10 mM) y 100 μ L de SDS al 20 % (p/v), la mezcla obtenida se agitó hasta una correcta homogenización y posteriormente se incubó a 65 °C por 10 min, se adicionaron 410 μ L de acetato de potasio frío (5 M), la mezcla se agitó de forma vigorosa y posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 15 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se añadió 540 μ L de isopropanol frío. Posteriormente se incubó en frío por 20 min, transcurrido este tiempo se centrifugó a 10000 rpm por 10 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. El precipitado recuperado se lavó con 500 μ L de etanol al 70 % frío y se centrifugó por 1 min a 14000 rpm. Se dejó secar y el precipitado se resuspendió en 600 μ L de amortiguador TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) pH 8. Se añadieron 60 μ L de acetato de sodio 3 M (pH 5.2) y 360 μ L de isopropanol frío, se incubó en hielo por 20 min y posteriormente se centrifugó por 10 min a 10000 rpm. Finalmente, el sobrenadante se eliminó y el precipitado se suspendió en 50 μ L de amortiguador TE. La concentración de ADN se midió en el equipo nanodrop modelo ND-2000 (Thermo Fisher) y la integridad del ADN se determinó por electroforesis (geles de agarosa al 2 % (p/v) con 0.1 % de bromuro de etidio (v/v)) [79].

6.6.3. Técnica de PCR

Para tener un control positivo se implementó la técnica de PCR utilizando los oligonucleótidos de actina en los extractos de ADN de hojas de quintonil, sandía y fruto de tomate.

Las muestras de ADN, concentraciones de 500-1000 ng/ μ L, se colocaron en viales y posteriormente se agregó el kit GoTaq Green master mix (Promega), con los siguientes volúmenes: 12.5 μ L de GoTaq, 1 μ L de *primer A*, 1 μ L de *primer B*, 1-5 μ L de extracto de ADN, el volumen se ajustó a 25 μ L con nucleasa libre de agua (Promega).

Las muestras se colocaron en un termociclador (Applied Biosystems 9600 GeneAmp PCR System 27000) bajo las siguientes condiciones: la etapa previa de desnaturalización se llevó a cabo a 94 °C por 5 min, se utilizaron 30 ciclos para ampliar el fragmento de ADN: iniciando con una etapa de desnaturalización a 94 °C por 45 s, el alineamiento de los oligonucleótidos a 56 °C por 1 min, finalmente la etapa de extensión se llevó a cabo a 72 °C por 1 min. Transcurridos los 30 ciclos, las muestras se dejaron a la temperatura de 72 °C por 5 min. Las muestras amplificadas se corrieron en un gel de agarosa al 2 % con 0.1 % de bromuro de etidio. Para identificar el fragmento de ADN amplificado en los productos de PCR, en el primer pozo del gel se colocó el marcador de pesos moleculares de ADN Bench Top (100 bp, Promega). El gel fue revelado utilizando un fotodocumentador (Gel Logic 200 Imaging System, KODAK).

6.7. Producción del sustrato para la actividad enzimática de la HPL a partir de ácidos grasos obtenidos mediante extracción con fluidos supercríticos

Se realizó la producción del sustrato para la enzima HPL a partir de extractos producidos por fluidos supercríticos y se comparó la actividad de la enzima con los sustratos puros y con los

obtenidos por EFS. La producción de hidroperóxidos a partir de los extractos derivados de la EFS se detalla a continuación.

Preliminar a la extracción de ácidos grasos por EFS se realizó la extracción por Soxhlet utilizando el método de la AOAC [80], con la finalidad de verificar si en los quintoniles se encontraban los ácidos linoleico y linolénico. La extracción por Soxhlet se realizó de la siguiente manera:

Se secó la muestra a 40 °C por 24 h en una estufa de secado (Felisa). La muestra seca se molió y se pesaron 2 g, los cuales se colocaron en el cartucho de extracción. La extracción se realizó utilizando éter de petróleo como disolvente, el cual se mantuvo a reflujo durante 4 h a una velocidad de condensación de 3-6 gotas/s. Una vez terminada la extracción, se eliminó el disolvente utilizando un rotavapor modelo R-100 (Buchi), El porcentaje de materia grasa se calculó por diferencia de peso.

Los ácidos grasos fueron convertidos a ésteres metílicos como se describe en los métodos de la Comunidad Europea [81]. Para realizar lo anterior se pesó 1 g de muestra de grasa extraída y se mezcló con 2 mL de n-heptano y 0.2 mL de solución metanólica de hidróxido de potasio (2 N). La mezcla se agitó por 30 s y se dejó reposar por 5 min. La parte superior se decantó, ya que esta contenía los esteres.

La caracterización de los ácidos grasos esterificados se realizó mediante cromatografía de gases con detector de ionización de flama (CG-DIF), en el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV. Se utilizó un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Autosystem, con una columna modelo OMEGA WAX 250 de 30.m de largo y 0.25 mm de diámetro interno (Supelco). Las muestras se llevaron a sequedad en ambiente de nitrógeno y se aforaron a 1 mL utilizando diclorometano. 200 µL de esta solución se derivatizó como ésteres. Se Inyectaron 2 µL de estos esteres al cromatógrafo. La temperatura utilizada para el detector fue de 250 °C, la temperatura de inyector fue 220 °C, la temperatura inicial de la columna se fijó en 120 °C la cual se dejó por 5 min, posteriormente se programaron incrementos de 5 °C por cada minuto hasta llegar a 220 °C, en esta temperatura se dejó por 3 min, a continuación, se programaron incrementos de 2 °C/min hasta alcanzar la temperatura de 250 °C en esta temperatura se dejó por 2 min. El flujo de nitrógeno fue a 9 psi. Para la identificación de las muestras se prepararon estándares de los ácidos grasos y en base a los

tiempos de retención de cada uno de ellos, se identificaron en los cromatogramas de las muestras. La cuantificación de los ácidos grasos se realizó por estandarización externa. Los picos de ésteres metílicos de ácidos grasos se compararon con los tiempos de retención de los estándares de ácidos grasos. El rendimiento de cada ácido graso se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{área de ácido graso}}{\text{áreas de ácidos grasos totales en el extracto}} * 100$$

La obtención de 13-HPOD y 13-HPOT a partir del extracto obtenido mediante EFS se realizó en tres etapas:

Etapas 1: Extracción supercrítica de ácidos grasos de quintoniles. La parte aérea del *Amaranthus hybridus* L. se secó a 40 °C por aproximadamente 24 h en una estufa de secado (Felisa). La muestra seca se molió hasta obtener un tamaño de partícula de 0.5 mm en un molino ciclónico (Foss Cyclotec, 1093) [41]. Los experimentos de extracción de ácidos grasos se llevaron a cabo utilizando un equipo de extracción con fluidos supercríticos construido en la UTM [44].

Para realizar las corridas en el equipo de EFS se efectuó el siguiente procedimiento: en primer lugar, se realizó el llenado del termocompresor con CO₂ comercial. Se colocó un baño de hielo para enfriar el termocompresor y de esta forma hacer más eficiente el llenado, el llenado se realizó haciendo varias descargas de CO₂, del cilindro comercial al termocompresor.

Se pesaron 20 g de la muestra molida y se colocaron en la celda de extracción, posteriormente, se instaló la celda de extracción dentro del baño de acrílico y se conectó con las tuberías del equipo. Se realizó el calentamiento del termocompresor hasta llegar a una presión por encima de la presión de operación del equipo (3200 psi). Las extracciones se llevaron a cabo a 100 bar y 35 °C, iniciando con una etapa estática de 30 min, posteriormente se realizaron tres etapas dinámicas de 60 min cada una, a un flujo de 30 mL/min, y entre cada etapa dinámica se realizó una etapa estática de 15 min. Al finalizar la corrida de las etapas estáticas y dinámicas se realizó la despresurización del CO₂ contenido en la celda de extracción.

El aceite colectado en la celda de recolección se recuperó con 7 mL de hexano, se tomó 1 mL y se evaporó el hexano en el rotavapor, el extracto obtenido en el rotavapor fue disuelto en 2 mL de hexano con BHT 0.001 % (p/v) para posteriormente ser analizado por CG-DIF. Ambos extractos fueron colocados en recipientes ámbar y almacenados [44].

Etapa 2. Extracción de la enzima lipoxigenasa. Se suspendió 1.4 g de harina de soya en 6 ml de agua acidificada (pH 4.5) y se mantuvo en agitación por 10 min en hielo. Posteriormente se centrifugó, utilizando una centrifuga modelo 5810R con rotor modelo FA-45-6-30, (Eppendorf) a 1000 x g, durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido fue utilizado como el extracto de la enzima lipoxigenasa.

Etapa 3. Obtención de los hidroperóxidos. Se evaporó en un rotavapor los extractos diluidos en hexano, obtenidos en la extracción con fluidos supercríticos. Posteriormente se le adicionaron 140 µL de Tween 20 y 504 µL de NaOH al 30 % (p/v), se mantuvo a un flujo constante de oxígeno durante 20 min a 20 °C. Se añadió el extracto de lipoxigenasa manteniendo el flujo de oxígeno y agitando la muestra durante 30 min. El medio de reacción se ajustó a pH 9.5 con NaOH al 30 %. La reacción se detuvo ajustando el pH a 3.0 con H₂SO₄ 1 M. Posteriormente, los hidroperóxidos formados fueron extraídos dos veces con un volumen equivalente de cloroformo, con agitación constante por 1 min y a continuación se centrifugó a 10000 x g, durante 5 min, a temperatura ambiente, recuperando la fase orgánica y desechando la fase acuosa. La fase orgánica se secó con MgSO₄ anhidro. El cloroformo fue evaporado empleando un rotavapor. Los hidroperóxidos se recuperaron con etanol anhidro y se almacenaron a -20 °C [65].

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Identificación de la planta

La planta de quintoniles fue identificada como *Amaranthus hybridus* L. por la Dra. Emma Cristina Mapes Sánchez del Instituto de Biología de la UNAM. *Amaranthus hybridus* L. pertenece a los cinco complejos de especies del género de *Amaranthus*, esta planta es la especie progenitora de los granos de amarantos, además de ser la especie que representa la mayor diversidad del género *Amaranthus* en América central [47].

7.2. Producción del sustrato para la enzima HPL a partir de ácido linolénico puro

Los hidroperóxidos de ácidos grasos producidos a partir de ácido linolénico puro fueron analizados realizándoles un barrido de 200 a 400 nm (Figura 10). Como se puede observar, se generó un pico con un máximo de absorbancia a 234 nm, lo que indica que hubo una conversión del ácido linolénico a hidroperóxidos [8].

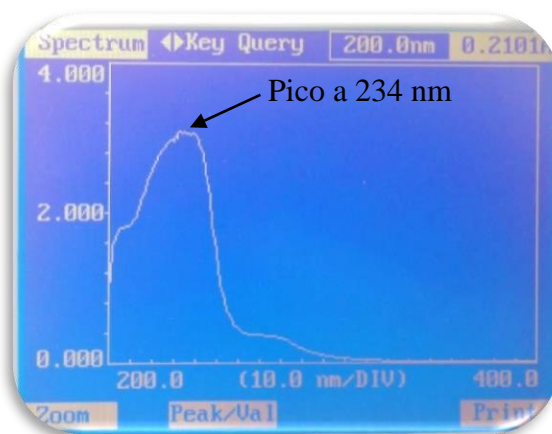


Figura 10. Barrido de los hidroperóxidos de ácidos grasos producidos a partir de ácido linolénico.

7.3. Extracción de la enzima HPL

En este estudio la actividad enzimática de HPL fue detectada en el sobrenadante del extracto crudo obtenido de las hojas de los quintoniles, como puede observarse en la Tabla 7, la concentración de proteína y actividad enzimática total en el sobrenadante fue de 0.91 mg/mL y 199.2 U, respectivamente. La actividad enzimática del sobrenadante de las hojas de quintoniles representó el 70 % del valor encontrado para amaranto tricolor (*Amaranthus mangostanus* L.) (285 U).

Tabla 7. Concentración de proteína y actividad enzimática en el precipitado y en el sobrenadante de quintoniles.

Extracto crudo	Concentración de proteína, mg/mL	Actividad enzimática total, U
Precipitado (hojas de quintoniles)	1.17 ± 0.03	ND
Precipitado (hojas de amaranto) [14]	4.16	285.00
Sobrenadante (hojas de quintoniles)	0.91 ± 0.07	199.20 ± 33.94

ND: No detectado.

Los valores reportados representan el promedio de tres replicas.

1 U = 1 μ M hidropéroxidos/min.

Cabe mencionar, que en el trabajo del amaranto la actividad de la enzima HPL se detectó en el precipitado [14], lo cual puede ser debido a que utilizaron una velocidad de centrifugación de 40000 x g y en este estudio la velocidad de centrifugación fue de 8000 x g (4800 rpm). Ya que como lo indican Noordermeer *et al.* [6], la enzima HPL se encuentra generalmente en los cloroplastos, por lo que, para la extracción de la enzima de estos organelos se han utilizado velocidades de centrifugación de 25000 a 40000 x g [14, 11, 50]. Sin embargo, en un estudio previo se detectó la presencia de la enzima HPL en el sobrenadante del extracto crudo de hojas de quintoniles [4]. Además, Espinoza-Rivera no detectó actividad de la enzima HPL en el precipitado del extracto crudo de hojas de orégano, pero si en el sobrenadante [58]. Por otro lado, en otros trabajos también han reportado actividad

enzimática de la HPL en el sobrenadante del extracto crudo, utilizando velocidades de centrifugación de 10000 a 15000 x g [8, 13, 56, 75].

7.4. Purificación y caracterización de la enzima HPL

El espectrograma que corresponde a la primera etapa de purificación de la enzima HPL extraída de las hojas frescas de los quintoniles se muestra en la Figura 11.

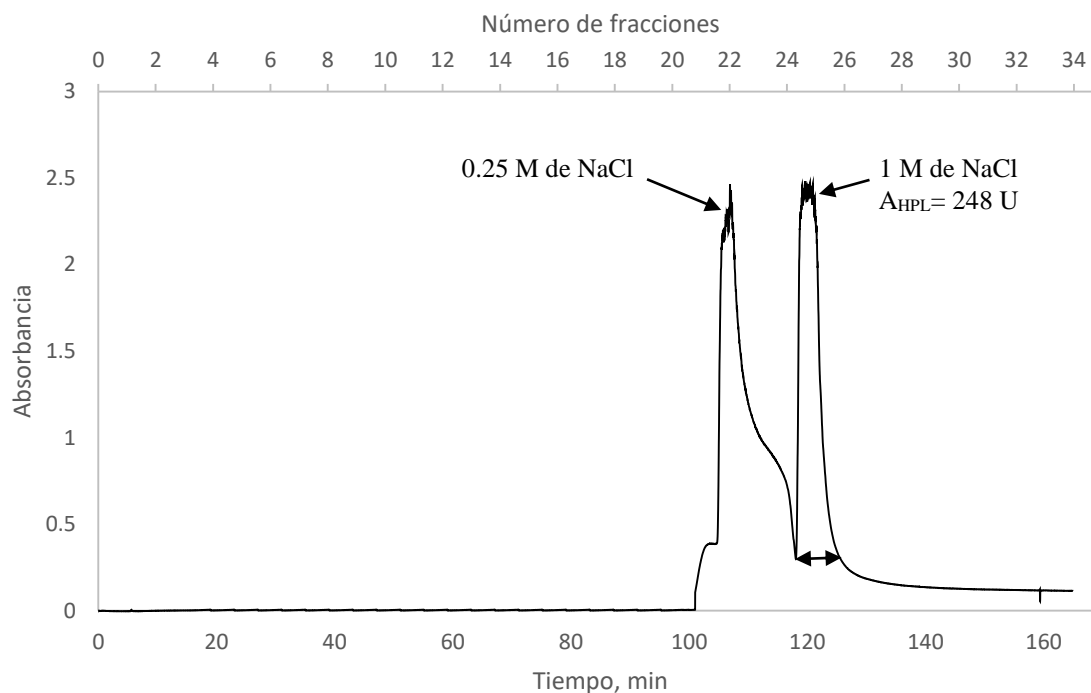


Figura 11. Espectrograma de la primera etapa de purificación de la enzima HPL de hojas de quintoniles.

Después de que se inyectó el extracto crudo de la enzima HPL en la columna DEAE-Toyopearl, se colectaron un total de 35 fracciones, conteniendo 4.5 mL de eluato en cada fracción, las fracciones que generaron un pico con el máximo de absorbancia a 280 nm fueron de la 20 a 23 y de la 24 a 27, estas últimas fracciones eluidas con 1 M de NaCl, se mezclaron

y se les determinó la actividad enzimática total, recuperándose el 87.75 % de la actividad enzimática original.

La mezcla de fracciones con actividad enzimática obtenidas en la primera etapa de purificación, se inyectó en la columna de fenil sefarosa, en esta etapa de purificación se colectaron 21 fracciones conteniendo 3 mL de eluato cada una, las fracciones 3 a 6, eluidas con 1.0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, fueron las que presentaron actividad enzimática total encontrándose 207.60 U, como se muestra en la Figura 12.

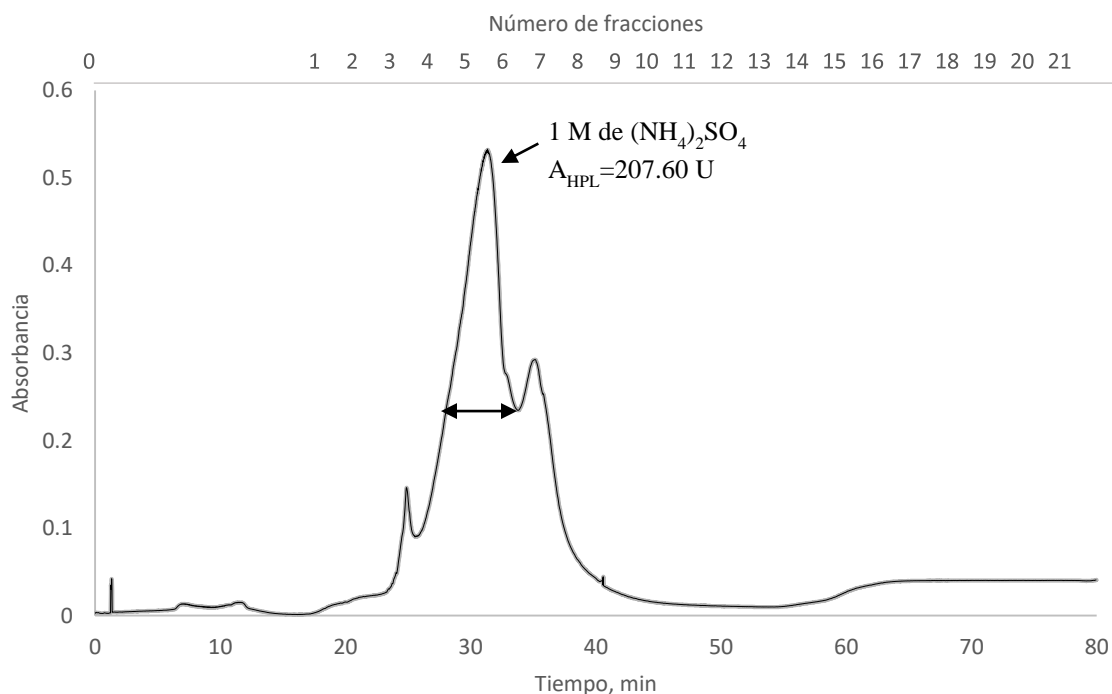


Figura 12. Espectrograma de la segunda etapa de purificación de la enzima HPL extraída de hojas de quintoniles.

Finalmente, la mezcla de fracciones con actividad enzimática obtenidas en la segunda etapa de purificación se inyectó a una columna de hidroxapatita, en la cual se colectaron 39 fracciones conteniendo 1 mL de eluato cada una. Las fracciones 25 a 29, eluidas con 250 mM de fosfato de sodio fueron las que presentaron actividad enzimática total encontrándose 813.60 U, (Figura 13).

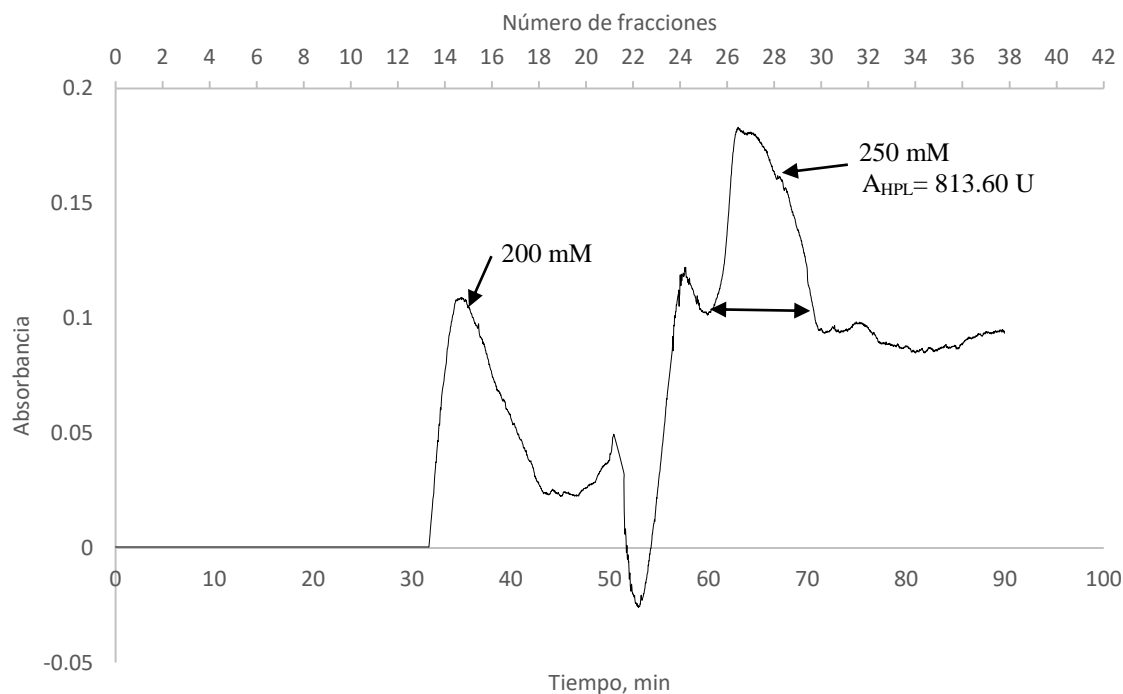


Figura 13. Espectrograma de la tercera etapa de purificación de la enzima HPL extraída de hojas de quintoniles.

En la tercera etapa de purificación la enzima HPL eluyó con una concentración alta de sal (250 mM), comparado con el estudio del amaranto tricolor (*Amaranthus mangostanus* L.) en donde la enzima HPL eluyó con 10, 25 y 40 mM de fosfato de sodio [14], una de las razones por las cuales se presentó esta diferencia, es porque la enzima HPL extraída de las hojas de quintoniles posiblemente no presenta homología con la enzima del amaranto tricolor, y esto se comprobó al incrementar la afinidad de la enzima HPL con la resina hidroxiapatita. Lo anterior coincide con el estudio de Hornostaj y Robinson [11] en el cual indican que la afinidad de unión de la enzima a las columnas utilizadas para la purificación dependen en gran medida de su carga neta y de su punto isoelectrico, además de la materia prima de partida, estos factores hacen más selectiva la separación de las enzimas y por lo tanto los tiempos de elución y retención varían con respecto a la fuente de extracción de la enzima.

Los datos obtenidos de concentración de proteína, actividad enzimática total y específica, calculados para cada una de las etapas de purificación se muestran en la Tabla 8. La actividad específica de la enzima HPL purificada en este estudio fue de 872.69 U/mg de proteína, 28 veces mayor comparada con la obtenida para la enzima HPL de hojas de amaranto (31.40 U/mg de proteína)

Tabla 8. Etapas de la purificación de la enzima HPL extraída de las hojas de quintoniles (*Amaranthus hybridus* L.) y hojas de amaranto tricolor (*Amaranthus mangostanus* L.).

Etapas de purificación	Planta	Concentración de proteína, mg/mL	Actividad enzimática total, U	Actividad enzimática específica, U/mg	Porcentaje de recuperación	Factor de purificación
Extracto crudo	1	8.88 ± 0.72	294 ± 15.27	33.09 ± 3.187	100	1
	2	4.16	285	0.9	100	1
Toyopearl DEAE	1	0.12 ± 0.02	248.4 ± 5.09	2045.26 ± 389.82	84.49	61.81
	2	0.48	140	4.5	49.1	5.0
Fenil sefarosa	1	0.12 ± 0.02	207.60 ± 5.09	1710.60 ± 257.94	70.61	51.69
	2	0.10	74.5	15.8	26.1	17.6
Hidroxiapatita	1	0.93 ± 0.01	813.60 ± 129.66	872.69 ± 139.69	276.73	26.37
	2	0.11	40.8	31.4	14.3	34.9

Planta 1: *Amaranthus hybridus* L. y planta 2: *Amaranthus mangostanus* L.

Los valores reportados representan el promedio de tres replicas. La actividad enzimática y la concentración de proteína fueron determinadas por la medición de la absorbancia a 234 y 280 nm, respectivamente.

U= unidad, 1 U =1 μM hidróperóxidos/min.

En la segunda y tercera etapa de purificación la pureza de la enzima HPL extraída de las hojas de quintoniles disminuyó, como se observa en la Tabla 8, los factores de purificación de la primera, segunda y tercera etapa fueron de 61.81, 51.69 y 26.37, respectivamente. Este mismo comportamiento de la enzima HPL se observó en el trabajo de purificación de la enzima HPL extraída de pepinos, en este trabajo se evaluaron cuatro etapas de purificación, sin embargo, esto dio como resultado que el porcentaje de recuperación de la enzima

disminuyera de forma considerable; por tal motivo, solo consideraron conveniente el uso de tres etapas de purificación [11]. En este estudio se observó que, al considerar tres etapas de purificación, la actividad enzimática específica disminuyó 2.43 veces comparado con la primera etapa de purificación, lo anterior es debido a la inestabilidad de la enzima y a la alta concentración de sales, ya que para estas fracciones fue necesario probar concentraciones de sales más altas para la elusión de la enzima HPL. Lo anterior concuerda con el trabajo de Salas y Sánchez [82], quienes observaron que al pasar la enzima HPL, extraída de la fruta de olivo, por la cromatografía de intercambio iónico el factor de purificación de la enzima disminuyó, esto lo adjudicaron a la alta tasa de inactivación de la enzima HPL debido a su inestabilidad bajo ciertas condiciones de concentraciones de amortiguadores y temperatura.

Por otro lado, de los estudios realizados también se puede observar que las características de la enzima HPL de los quintoniles pueden variar, dado que la planta presentó diferente comportamiento dependiendo de la etapa de crecimiento. En este trabajo se ocupó la planta de quintoniles en dos etapas fenológicas de crecimiento, debido a que no se tiene un control estricto de su cosecha porque es una planta herbácea que crece de manera natural en los sembradíos de maíz. En la Tabla 9 se muestran los resultados de concentración de proteína y actividad enzimática obtenidos de las hojas de quintoniles de las dos etapas fenológicas.

Tabla 9. Actividad enzimática total y específica de extractos crudos de quintoniles en dos diferentes etapas fenológicas de crecimiento.

	Quintoniles con inflorescencias	Quintoniles sin inflorescencias
Concentración de proteína, mg/mL	7.51 ± 0.17 ^a	8.524 ± 1.46 ^a
Actividad enzimática total, U	471.20 ± 40.82 ^a	159.20 ± 9.69 ^b
Actividad enzimática específica, U/mg	62.71 ± 5.62 ^a	18.67 ± 3.40 ^b

Los valores reportados representan el promedio de tres replicas.

Diferentes letras mostradas como superíndice en la misma fila representan diferencia significativa entre los datos ($p > 0.05$). El análisis estadístico se realizó mediante la diferencia de medias, usando el estadístico t de student.

Los resultados de la tabla anterior mostraron que hubo una variación en la concentración de proteína y en la actividad enzimática, esto se da principalmente por el tipo de clima en el cual se cosecharon las muestras y por la etapa fenológica de la planta [83, 84, 85]. En el trabajo realizado por Matsui *et al.* [86] controlaron la temperatura, los ciclos de oscuridad y luz, y el desarrollo de la planta del pepino, las réplicas de los extractos de la enzima HPL no presentaron diferencia significativa, además, lograron una mayor actividad en la planta con un menor estado de desarrollo, los hipocótilos. En este trabajo la enzima HPL extraída de las hojas de los quintoniles presentó la mayor concentración de proteína en la planta con una etapa fenológica sin inflorescencias y la mayor actividad enzimática se presentó en la planta con una etapa fenológica con inflorescencias, este resultado puede deberse a que la planta de quintoniles con inflorescencias está más expuesta a los daños mecánicos y al ataque de insectos, con lo cual hace que la actividad total de la enzima HPL sea mayor en esta etapa. Ya que como lo indica Noordermeer *et al.* [6], la enzima HPL está íntimamente ligada al rol de protección primaria, y los niveles de HPL transcriptasa se ven incrementados en respuesta al ataque de insectos y a daños mecánicos.

7.4.1. Determinación del peso molecular de la enzima HPL

La estimación del peso molecular de las fracciones purificadas se realizó por electroforesis, en la Figura 14 se muestra el gel de electroforesis SDS-PAGE con la fracción que presentó actividad enzimática en la primera etapa de purificación (eluida con 1 M de NaCl y con una actividad enzimática total de 248 U).

La banda detectada en el gel de electroforesis para la enzima HPL presentó un peso molecular de aproximadamente 59 kDa. Esta banda mostró un peso molecular cercano al calculado para las HPL obtenidas de las hojas de amaranto tricolor [14], guayaba [50], pimiento verde [51] y pepino [11], todos ellos con un peso molecular aproximado de 55 kDa.

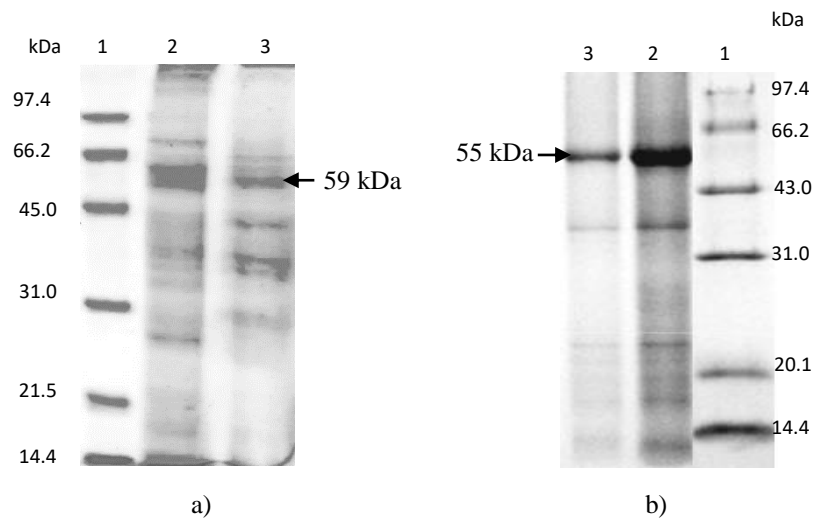


Figura 14. Gel de electroforesis SDS-PAGE; a) Quintoniles (*Amaranthus hybridus* L.) y b) Amaranto tricolor (*Amaranthus mangostanus* L.). Línea 1, marcador de pesos moleculares; línea 2, extracto crudo; línea 3, primera etapa de purificación.

Por otro lado, la determinación del peso molecular por UPLC-QToF no pudo determinarse, debido a que los compuestos con detergente no pueden ser analizados utilizando este equipo, ya que es extremadamente sensible y este tipo de compuestos suelen dar iones muy intensos, aunque se encuentren en pequeñas cantidades en los analitos, como es el caso de la enzima HPL que contiene 0.3 % de Tritón X-100. El cromatograma y espectro de masas obtenido al analizar la enzima HPL en el equipo de UPLC-QToF se muestra en las Figuras 15 y 16. Como puede apreciarse en el espectro de masas se observa una diferencia de masas entre los iones fragmento de 44 Da, esta diferencia es característica de los detergentes.

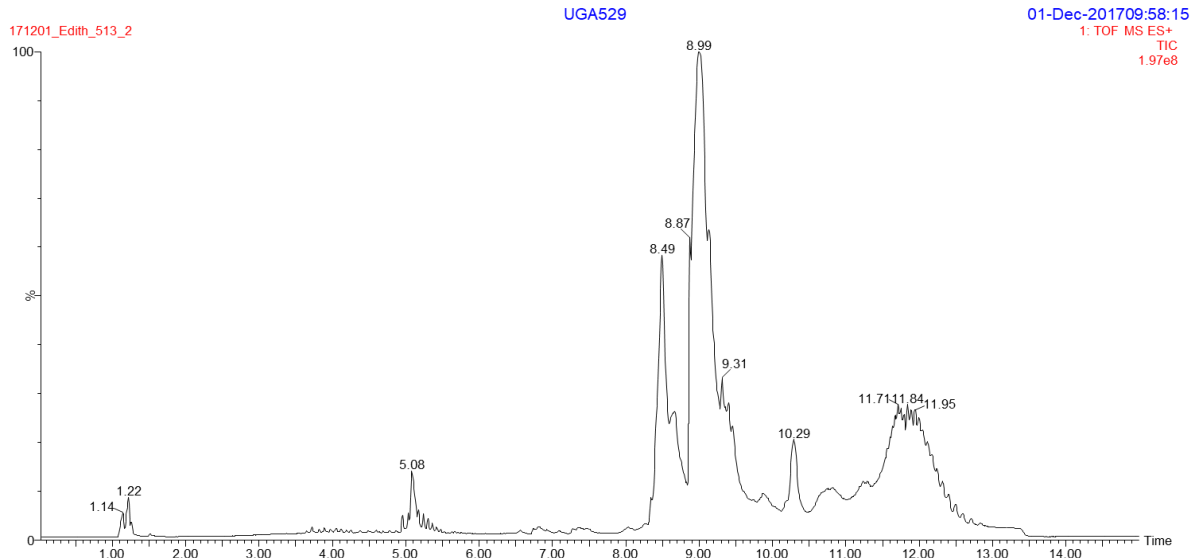


Figura 15. Cromatograma obtenido del extracto de la primera etapa de purificación de quintoniles (*Amaranthus hybridus* L.).

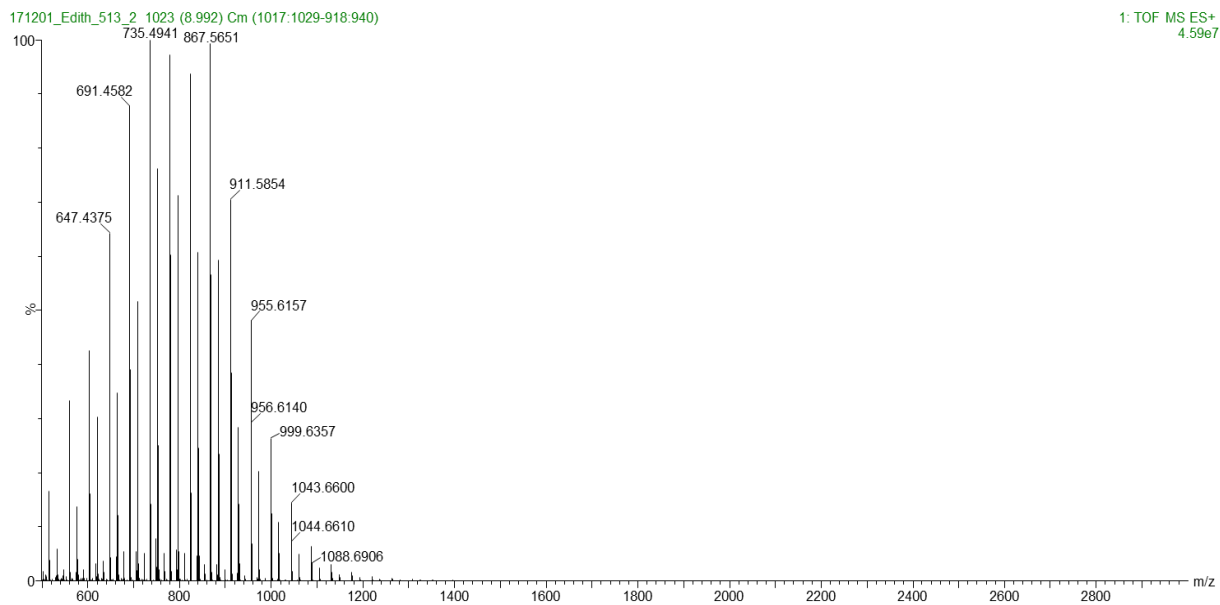


Figura 16. Espectro de masas obtenido del extracto de la primera etapa de purificación de quintoniles (*Amaranthus hybridus* L.).

Cabe mencionar, que para que la enzima HPL se pueda extraer de la membrana de los cloroplastos de plantas es importante utilizar entre 0.1 a 0.5 % de Tritón X-100 [1, 14, 87]. Lo anterior fue comprobado al realizar la extracción de la enzima HPL sin Tritón X-100 y sin polivinilpirrolidona, encontrando baja concentración de proteína (1.33 ± 0.07 mg/mL), sin actividad enzimática.

7.5. Diseño de oligonucleótidos y extracción del ADN de las hojas de los quintoniles para su aplicación en PCR

7.5.1. Diseño de oligonucleótidos

En la Tabla 10 se muestran las características de cada uno de los oligonucleótidos diseñados, tomando las referencias del tomate, arabidopsis y sandía.

Tabla 10. Características de los oligonucleótidos diseñados para la enzima HPL.

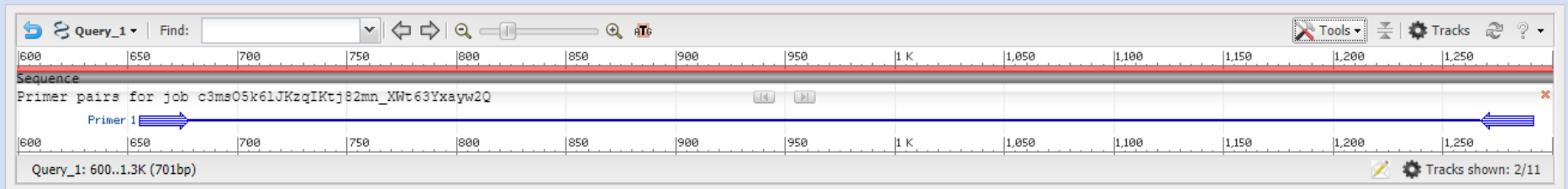
	Secuencia de nucleótidos	Orientación	Tamaño (pb)	Tm, °C	Amplificación del fragmento (pb)
Tomate	CTGTCAGCATTGGTGTCCTTCA	Sentido	22	68	636
	GTCTCCCAGTTTGTGGACCATTAG	Anti sentido	24	66.5	
Arabidopsis	GGCTTGCGTTGCAAGTTATTCC	Sentido	22	65	399
	CCACGGATTTAACCAGCTCCAT	Anti sentido	22	65	
Sandía	GTGATTTTCATGCCGAGCACAAG	Sentido	22	68	418
	GGGAAGAAGGGTAATCGGAAAGAG	Anti sentido	24	66.5	

Como puede observarse en la tabla anterior, las secuencias de oligonucleótidos diseñados a partir del ADN del tomate, sandía y arabidopsis presentan un tamaño de pares de bases muy cercana, el cual oscilan entre 22 y 24 pb, sin embargo, el fragmento amplificado para cada par de secuencias de oligonucleótidos varía desde los 399 pb para arabidopsis, 418 pb para sandía y 636 pb para el tomate.

Posterior al diseño de oligonucleótidos se utilizó el software libre Primers-Blast para realizar el análisis *in silico* de las características de los oligonucleótidos diseñados. En el software se colocaron las secuencias de los oligonucleótidos con su respectivo ADN del cual se obtuvo el diseño. Los resultados de este alineamiento se muestran en las Figuras 17-19.

Con el análisis *in silico* se comprobó la temperatura de alineamiento, contenido de guanina y citosina (GC), longitud del amplicón y productos no deseados, esto último se corroboró con la gráfica de alineamiento de los oligonucleótidos en donde se descartó la formación de estructuras no deseadas que pueden dar lugar a errores en las reacciones de PCR. El alineamiento ofreció una alternativa la cual permitió aceptar los oligonucleótidos para ser aplicados a la PCR experimental, ya que todos los oligonucleótidos diseñados se alinearon de forma específica y complementaria con su material genético correspondiente.

Graphical view of primer pairs



Detailed primer reports

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CTGTCAGCATTGGTGCCTTCA	Plus	22	656	677	60.81	50.00	5.00	1.00
Reverse primer	GTCTCCCAGTTTGTGGACCATTAG	Minus	24	1291	1268	61.10	50.00	5.00	1.00
Product length	636								

Products on potentially unintended templates

>[NM_001247491.2](#) Solanum lycopersicum fatty acid hydroperoxide lyase (HPL), mRNA

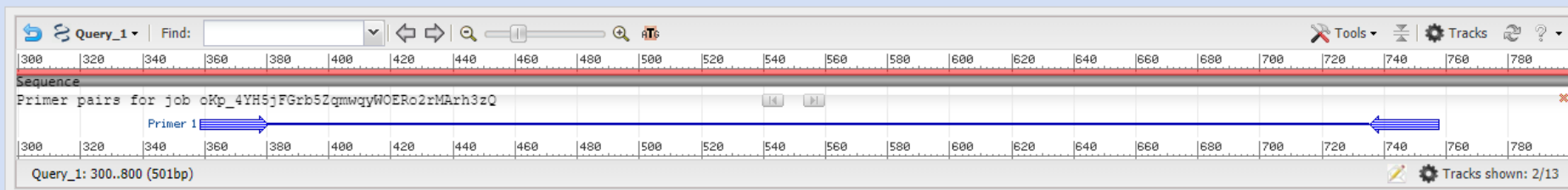
product length = 636

```
Forward primer 1 CTGTCAGCATTGGTGCCTTCA 22
Template      824 ..... 845
```

```
Reverse primer 1 GTCTCCCAGTTTGTGGACCATTAG 24
Template      1459 ..... 1436
```

Figura 17. Alineamiento de oligonucleótidos diseñados a partir del ADN de tomate. (Datos obtenidos de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Graphical view of primer pairs



Detailed primer reports

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GGCTTGCGTTGCAAGTTATTCC	Plus	22	359	380	61.24	50.00	7.00	2.00
Reverse primer	CCACGGATTTAACCAGCTCCAT	Minus	22	757	736	60.68	50.00	4.00	2.00
Product length	399								

Products on potentially unintended templates

>[NM_117633.3](#) Arabidopsis thaliana hydroperoxide lyase 1 (HPL1), mRNA

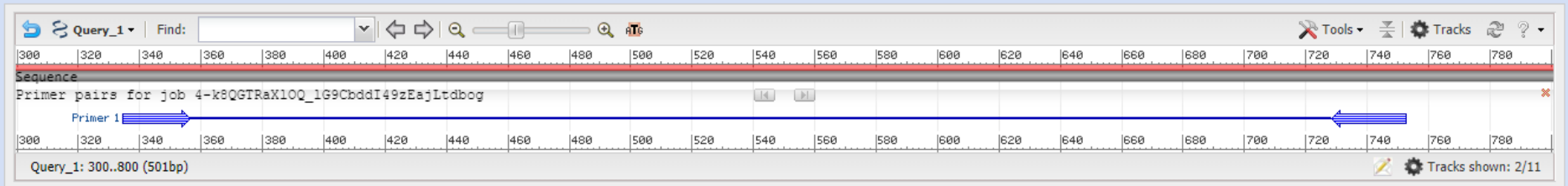
product length = 399

Forward primer 1 GGCTTGCGTTGCAAGTTATTCC 22
 Template 860 881

Reverse primer 1 CCACGGATTTAACCAGCTCCAT 22
 Template 1258 1237

Figura 18. Alineamiento de oligonucleótidos diseñados a partir del ADN de arabidopsis. (Datos obtenidos de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Graphical view of primer pairs



Detailed primer reports

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GTGATTTTCATGCCGAGCACAAG	Plus	22	335	356	60.73	50.00	4.00	0.00
Reverse primer	GGGAAGAAGGGTAATCGGAAAGAG	Minus	24	752	729	60.68	50.00	3.00	0.00
Product length	418								

Figura 19. Alineamiento de oligonucleótidos diseñados a partir del ADN de sandía. (Datos obtenidos de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

7.5.2. Aplicación de la técnica de PCR

Cabe resaltar que en la literatura no se encuentran estudios donde se reporte la amplificación del fragmento de ADN de la enzima HPL extraída de los quintoniles. Por lo tanto, no está establecida una metodología para llevar a cabo la extracción del material genético de esta planta. Sin embargo, implementando la metodología descrita por Keb-Llanes para la extracción del ADN se obtuvo el material genético requerido para su aplicación en la técnica de PCR. Las concentraciones del ADN de las hojas de los quintoniles, del tomate y hojas de sandía se muestran en la Tabla 11. La concentración del material genético obtenido en la sandía y los quintoniles es adecuado para poder amplificar por la técnica de PCR (500 a 1000 ng/ μ L) [37].

La concentración de ADN del tomate fue 7.2 veces menor que la obtenida en los extractos de sandía y 20.9 veces menor que los quintoniles. Sin embargo, estos extractos de ADN se utilizaron para una prueba de amplificación por PCR.

Tabla 11. Concentraciones de ADN.

Extracto de ADN	Concentración, ng/μL
Quintoniles	6656.5
Sandía	2299.6
Tomate	317.9

La integridad del material genético obtenido de las hojas de quintoniles sandía y el fruto de tomate se verificó al correr las muestras en el gel de agarosa al 2 %. En la Figura 20 puede observarse que para las tres muestras solo se observa una banda, lo que indica que el ADN no se degradó.



Figura 20. Gel de electroforesis de agarosa al 2 %; 1) quintoniles, 2) tomate y 3) sandía.

Se realizó la PCR con los extractos de ADN de tomate, sandía y quintoniles. En primer lugar, los extractos se corrieron con oligonucleótidos de actina con la finalidad de tener un control positivo, este diseño de oligonucleótidos ya ha sido amplificado adecuadamente y se conoce el patrón de bandas amplificado, además con esta reacción se verifica que la amplificación se llevó a cabo de forma correcta. Al correr los productos obtenidos por PCR en el gel de agarosa al 2 % (Figura 21), las muestras no mostraron una banda definida en 900 pb, la cual es característica de los oligonucleótidos de actina. Este mismo resultado se observó al correr los productos obtenidos por PCR en el gel de agarosa al 2 % al utilizar los oligonucleótidos obtenidos a partir de la sandía, tomate y arabidopsis.



Figura 21. Productos de PCR con oligonucleótidos de actina; carril 1) marcador de pesos moleculares, 2) tomate, 3) sandía y 4) quintoniles.

Hasta el momento se hicieron pruebas de PCR en gradiente para poder encontrar la temperatura óptima de los oligonucleótidos. Cabe resaltar que en este estudio se realizaron diferentes experimentos para encontrar las condiciones óptimas para llevar a cabo la amplificación del fragmento de ADN extraído de las hojas de los quintoniles, se varió la concentración de los amortiguadores y de los oligonucleótidos, sin embargo, de acuerdo a las recomendaciones de Verma *et al.* [88] falta verificar si existen inhibidores en los extractos de ADN, si la concentración de amortiguadores es el adecuado o si los oligonucleótidos están contaminados, ya que estas son algunas de las causas por lo que no se amplifica el ADN. En general, los resultados obtenidos son de vital importancia, ya que hasta el momento no existe ningún reporte del uso de la técnica de PCR aplicada al material genético de la enzima HPL extraída de los quintoniles. En este trabajo se logró diseñar y realizar *in silico* el alineamiento de los oligonucleótidos, de igual forma se logró obtener un extracto de ADN con las concentraciones adecuadas para ser utilizados para la amplificación del fragmento de ADN de la enzima HPL.

7.6. Producción del sustrato para la enzima HPL a partir de extractos obtenidos por extracción con fluidos supercríticos

7.6.1. Identificación de los ácidos grasos obtenidos por extracción con fluidos supercríticos

El análisis de ácidos grasos, obtenidos por Soxhlet, de las hojas, semillas, cascarilla y una mezcla (50 % de semilla y 50 % de cascarilla) de los quintoniles, se presenta en la Tabla 12.

Tabla 12. Composición de ácidos grasos en hojas, semilla, cascarilla y mezcla de quintoniles (*Amaranthus hybridus* L.), obtenidos por el método de Soxhlet.

Ácidos grasos	Composición de ácidos grasos, % relativo				
	Hojas	Cascarilla	Semilla	Mezcla (50 % de semilla y 50 % de cascarilla)	Semillas [49]
Mirístico	0.30 ± 0.04	0.64 ± 0.18	0.25 ± 0.03	ND	ND
Palmítico	12.44 ± 0.58	13.59 ± 0.97	16.87 ± 0.91	17.76 ± 0.30	19.01 ± 0.01
Esteárico	1.69 ± 0.24	3.96 ± 0.17	3.39 ± 0.82	2.99 ± 0.22	9.03 ± 0.01
Oleico	6.16 ± 0.63	33.43 ± 0.57	26.07 ± 0.50	9.64 ± 1.15	36.45 ± 0.01
Linoleico	12.35 ± 0.23 ^a	31.91 ± 2.99 ^b	50.74 ± 2.16 ^c	42.31 ± 1.16 ^d	33.16 ± 0.01 ^b
γ-Linolénico	1.19 ± 0.42 ^a	4.88 ± 4.51 ^a	ND	ND	2.34 ± 0.01 ^e
α-Linolénico	60.19 ± 0.42 ^a	12.85 ± 0.87 ^b	0.96 ± 0.07 ^c	23.62 ± 3.76 ^d	
cis-11,14- eicosadienoico	5.75 ± 1.87	ND	ND	4.28 ± 1.45	ND

ND. No detectado.

Los valores reportados representan el promedio de tres replicas. El análisis estadístico se realizó mediante la diferencia de medias, usando el estadístico t de student, el análisis estadístico solo se realizó para los ácidos grasos de nuestro interés (ácido linoleico y linolénico). Diferentes letras mostradas como superíndice en la misma fila representan diferencia significativa entre los datos ($p > 0.05$).

Como se observó en la tabla anterior, en todas las muestras analizadas están presentes los dos ácidos grasos de interés para esta investigación, linoleico y linolénico, no obstante, en la mezcla y en la semilla se encontró la mayor cantidad de ácido linoleico (42.31 % y 50.74 %, respectivamente) y en las hojas el ácido α-linolénico fue el componente mayoritario (60.19 %). Los cromatogramas de este análisis se muestran en el Anexo 1. Al comparar las medias de los ácidos grasos, linolénico y α-linolénico, obtenidos a partir de la semilla, las hojas y la mezcla, con los obtenidos por Diemeleou *et al.* [49], se observa un mayor contenido de estos ácidos grasos para las muestras analizadas en este trabajo. En base a este resultado, en el cual se comprueba la presencia de los ácidos grasos de interés, se realizó la siguiente etapa en la que se utilizó la extracción con fluidos supercríticos en las muestras con mayor composición de ácido linoleico, con la finalidad de obtener una muestra con una menor cantidad de componentes de los ácidos grasos que no son de interés para este trabajo, los resultados de la caracterización de los extractos obtenidos por EFS se muestran en la Tabla 13, los cromatogramas de este análisis se encuentran en el Anexo 2.

Tabla 13. Composición de ácidos grasos en cascarilla, semilla y mezcla de semilla y cascarilla de quintoniles (*Amaranthus hybridus* L.), obtenidos por extracción con fluidos supercríticos.

Ácidos grasos	Composición de ácidos grasos, % relativo			
	Cascarilla	Semilla	Mezcla (50 % de semilla y 50 % de cascarilla)	Semillas [49]
Mirístico	0.32 ± 0.12	0.47 ± 0.40	ND	ND
Palmítico	15.21 ± 1.32	14.52 ± 2.20	16.66 ± 2.20	19.01 ± 0.01
Estearico	6.89 ± 2.59	5.63 ± 1.21	6.83 ± 1.73	9.03 ± 0.01
Oleico	30.26 ± 2.02	28.69 ± 3.15	29.72 ± 1.80	36.45 ± 0.01
Linoleico	38.56 ± 7.81 ^a	38.42 ± 9.97 ^a	40.66 ± 8.19 ^a	33.16 ± 0.01 ^a
γ-Linolénico	ND	5.92 ± 3.79 ^a	2.64 ± 1.67 ^a	2.34 ± 0.01 ^a
α-Linolénico	4.72 ± 1.32 ^a	6.49 ± 6.79 ^a	4.01 ± 2.45 ^a	
cis-11,14-eicosadienoico	1.59 ± 0.55	ND	ND	ND

ND. No detectado.

Los valores reportados representan el promedio de tres replicas.

El análisis estadístico se realizó mediante la diferencia de medias, usando el estadístico t de student, el análisis estadístico solo se realizó para los ácidos grasos de nuestro interés (ácido linoleico y linilénico). Diferentes letras mostradas como superíndice en la misma fila representan diferencia significativa entre los datos ($p > 0.05$).

Wejnerowska *et al.* [89], analizaron los rendimientos de escualeno y aceite a partir de las semillas de amaranto por EFS con los obtenidos con el método de Soxhlet, el porcentaje máximo de recuperación de escualeno y aceite obtenido por EFS fue de 98.2 y 62.7 %, respectivamente, considerando los extractos obtenidos por Soxhlet como el 100 %. También, analizaron diferentes parámetros como: presión, temperatura y tiempo, este último parámetro fue el más decisivo y con el que obtuvieron la mayor composición de escualeno, manejaron tiempos de 90 a 120 min de extracción de etapa dinámica, con un flujo de 6.4 a 10 L de CO₂/h y una presión de 30 MPa. Hang-Ping *et al.* [41], investigaron el incremento en el rendimiento de aceite y la tasa de extracción en las semillas de amaranto, concluyeron que este incremento en la extracción se da principalmente con el aumento de la velocidad de flujo de CO₂ supercrítico y con el incremento de tiempo en la etapa dinámica. Con base a lo anterior, se puede considerar que la baja composición en los extractos obtenidos por EFS a partir de quintoniles puede ser adjudicado a que no se alcanzó el agotamiento de las muestras debido al tiempo de extracción y al flujo de CO₂ supercrítico utilizados.

Cabe resaltar que la variación en los porcentajes entre las muestras de los extractos obtenidos por EFS se debió principalmente a los problemas técnicos que se presentaron al operar el equipo. Al realizar el análisis de medias de estos resultados con los obtenidos en la bibliografía no se observa diferencia significativa.

Debido a que en los extractos obtenidos mediante EFS se encuentran los ácidos grasos linoleico y linolénico, la mezcla se utilizó como sustrato para la obtención de los hidroperóxidos. Son pocos los trabajos que reportan el uso de una mezcla de ácidos grasos para la obtención de hidroperóxidos [63, 64]. En el trabajo reportado por Santiago-Gómez *et al.* [65] utilizaron la oleína conteniendo 48 % de α -ácido linolénico y 18 % de ácido linoleico, los cuales se convirtieron a hidroperóxidos de ácidos grasos por la acción de la enzima lipoxigenasa contenida en la harina de soya.

7.6.2. Caracterización del sustrato producido con ácidos grasos obtenidos por extracción con fluidos supercríticos

El resultado del barrido realizado a los hidroperóxidos producidos a partir de los ácidos grasos obtenidos por EFS, mostró que no hay un pico definido a 234 nm (Figura 22). Sin embargo, para los cálculos de concentración de los hidroperóxidos se tomó el valor de la absorbancia que mostró un ligero incremento en la cresta del pico a una longitud de onda de 223 nm, el cual es cercano a una longitud de onda de 234 nm.

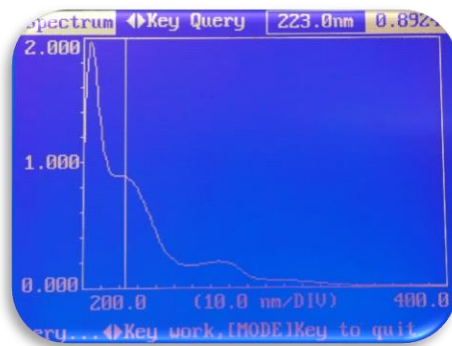


Figura 22. Barrido de los hidroperóxidos de ácidos grasos producidos a partir de EFS.

El hecho de que no se observe un pico definido a 234 nm es porque no se realizó una conversión total de los ácidos grasos a hidroperóxidos de ácidos grasos, y a que los ácidos linoleico y linolénico se encuentran en una mezcla con otros ácidos grasos. Lo anterior concuerda con el estudio realizado por Aziz *et al.* [64], en su trabajo utilizaron ácido linoleico 100 % puro, ácido comercial con una pureza de 67 % de ácido linoleico y aceite de cártamo con 7.5, 3.8, 16.5 y 72.2 % de ácido palmítico, esteárico, oleico y linoleico, respectivamente. Al realizar la oxidación de estas muestras para obtener los hidroperóxidos, el porcentaje de recuperación de hidroperóxidos de ácidos grasos determinado por CG fue de 68.9 % para el comercial y 2.0 % para el aceite de cártamo. Con base a los resultados anteriores se puede concluir que no siempre se produce una mayor cantidad de hidroperóxidos a partir de una fuente con una mayor composición de ácidos grasos linoleico y/o linolénico, sino que depende principalmente de la cantidad de componentes y método de obtención de la mezcla de ácidos grasos.

7.6.3. Comparación de la actividad enzimática con sustratos puros y compuestos

Los resultados de las actividades de la enzima HPL, parcialmente purificada, utilizando sustratos puros y mezcla de ácidos grasos obtenidos por EFS se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Comparación de la actividad enzimática HPL con diferentes sustratos, obtenidos con ácido linolénico puro y por EFS.

Actividad enzimática	Hidroperóxidos puros	Semilla	Mezcla	
			(50 % de semilla y 50 % de cascarilla)	Cascarilla
Total, U	140.80 ± 24.04 ^a	31.20 ± 6.78 ^b	170.4 ± 23.76 ^a	ND
Específica, U/mg	145.47 ± 24.84 ^a	32.23 ± 7.14 ^b	176.05 ± 25.62 ^a	ND

ND. No detectado.

Los valores reportados representan el promedio de tres replicas.

El análisis estadístico se realizó mediante la diferencia de medias, usando el estadístico t de student.

Diferentes letras mostradas como superíndice en la misma fila representan diferencia significativa entre los datos ($p > 0.05$).

Como puede observarse en la tabla anterior, la enzima HPL no presentó actividad con los hidroperóxidos obtenidos a partir de los extractos de la cascarilla. Sin embargo, sí presentó actividad con los hidroperóxidos obtenidos de los extractos de las semillas y la mezcla. Al comparar la actividad específica de la enzima con el sustrato puro se observó una disminución del 77.8 % con los extractos de semillas, y un aumento del 21.2 % al utilizar el sustrato obtenido a partir de extractos de la mezcla. La actividad enzimática total y específica exhibida al utilizar hidroperóxidos producidos a partir de los extractos de la mezcla obtenida por EFS es debido posiblemente a que la enzima HPL, parcialmente purificada, tiene una mayor afinidad por los 9 o 13-HPOD derivados del ácido linoleico, presentes en mayor porcentaje en la mezcla (40.6 %), ya que la actividad de la enzima HPL con los 9 o 13-HPOT, derivados de ácido linolénico, fue menor. Harold *et al.* [90] evaluaron la afinidad de la enzima HPL con los diferentes sustratos y demostraron que la afinidad puede variar dependiendo de la materia prima de extracción de la enzima, en su estudio analizaron la actividad de la enzima HPL obtenida de las semillas y de las hojas de soya, la actividad de la enzima fue analizada con los sustratos 9-HPOT, 9-HPOD, 13-HPOT y 13-HPOD puros, encontrando que la actividad de la enzima HPL obtenida de las semillas fue mayor con los 9-HPOD, y la actividad de la enzima HPL extraída de las hojas fue mayor con los 13-HPOD y 13-HPOT.

En un trabajo realizado por Noordermeer *et al.* [63], utilizaron aceite de cártamo (conteniendo 73 % de ácido linoleico) para la producción de hidroperóxidos, los cuales fueron utilizados como sustrato para la enzima HPL, la afinidad de la enzima HPL con este sustrato fue medida a través de la producción de hexanal, comparando la producción de hexanal con hidroperóxidos obtenidos de ácidos grasos puros, el rendimiento de hexanal fue de 85 %, con este resultado concluyeron que el aceite de cártamo es adecuado para ser utilizado como sustrato para la producción de hidroperóxidos.

Por otro lado, al realizar el análisis estadístico de diferencia de medias de las actividades enzimáticas total y específica con los hidroperóxidos producidos a partir de la mezcla obtenida por EFS y con las de los hidroperóxidos puros, estas actividades no presentaron diferencia significativa entre las medias. Los resultados de este estudio demuestran que los extractos obtenidos por EFS a partir de la mezcla (50 % de semilla y 50 % de cascarilla)

puede ser una alternativa para la producción del sustrato mediante la reacción con la enzima lipoxigenasa.

8. CONCLUSIONES

- Se identificó la planta de quintoniles encontrando que pertenece a *Amaranthus hybridus* L.
- Se purificó parcialmente la enzima HPL en una sola etapa de purificación encontrándose un factor de purificación de 61.81, con una actividad enzimática específica de 2045.26 U/mg de proteína y una concentración de proteína de 0.12 mg/mL. Las dos últimas etapas de purificación no fueron óptimas para la purificación de la enzima HPL extraída de los quintoniles, lo cual puede ser debido a la inestabilidad de la enzima HPL por las altas concentraciones de sales utilizadas para la segunda y tercera etapa de purificación.
- El peso molecular estimado por electroforesis SDS-PAGE de la enzima HPL de las hojas frescas de los quintoniles fue de 59 kDa.
- Al realizar la reacción catalítica del enzima HPL con el sustrato producido a partir de una mezcla de ácidos grasos de la semilla de los quintoniles extraídos por EFS y los obtenidos a partir de ácidos grasos puros, se determinó que no hay diferencia significativa en la actividad de la enzima HPL.
- Se obtuvo una concentración de ADN de 6656.50 ng/ μ L y se realizó el diseño de los oligonucleótidos, los cuales se aplicaron en la técnica de PCR.

9. PERSPECTIVAS

Las perspectivas de este trabajo son las siguientes:

- Purificar la enzima HPL extraída de las hojas de quintoniles en su totalidad; variando la concentración de sales y el pH en los amortiguadores o cambiando la fase estacionaria en la cromatografía.
- Identificar mediante cromatografía de gases los hidroperóxidos producidos con ácidos grasos obtenidos por EFS.
- Buscar un método para eliminar el detergente Tritón X-100 de las muestras de la enzima HPL purificada lo cual permitirá determinar el peso molecular exacto de la enzima por UPLC-QToF.
- Para realizar la técnica de PCR en los extractos de ADN de quintoniles es necesario verificar si hay presencia de inhibidores en los extractos de ADN, evaluar diferentes concentraciones de amortiguadores y verificar que los oligonucleótidos no estén contaminados.

10. BIBLIOGRAFÍA

- [1] A. R. Hornostaj and D. S. Robinson, “Purification of hydroperoxide lyase from pea seeds,” *Food Chem.*, vol. 71, pp. 241–247, 2000.
- [2] N. B. Akacha and M. Gargouri, “Enzymatic synthesis of green notes with hydroperoxide-lyase from olive leaves and alcohol-dehydrogenase from yeast in liquid/gas reactor,” *Process Biochem.*, vol. 44, no. 10, pp. 1122–1127, 2009.
- [3] N. B. Akacha and M. Gargouri, “Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses,” *Food Bioprod. Process.*, vol. 94, no. October, pp. 675–706, 2014.
- [4] R. A. Mejía-Maldonado, “Actividad de la enzima hidroperóxido liasa extraída de diferentes plantas de Oaxaca,” Tesis. Universidad Tecnológica de Tehuacán, 2015.
- [5] B. a Vick and D. C. Zimmerman, “Lipoxygenase and hydroperoxide lyase in germinating watermelon seedlings.,” *Plant Physiol.*, vol. 57, no. 5, pp. 780–8, 1976.
- [6] M. A. Noordermeer, G. A. Veldink, and J. F. G. Vliegthart, “Fatty Acid Hydroperoxide Lyase: A Plant Cytochrome P450 Enzyme Involved in Wound Healing and Pest Resistance,” pp. 494–504, 2001.
- [7] M. Buchhaupt, J. C. Guder, M. M. W. Etschmann, and J. Schrader, “Synthesis of green note aroma compounds by biotransformation of fatty acids using yeast cells coexpressing lipoxygenase and hydroperoxide lyase,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 93, no. 1, pp. 159–168, 2012.
- [8] M. Gargouri, N. B. Akacha, and M.-D. Legoy, “Coupled hydroperoxide lyase and alcohol dehydrogenase for selective synthesis of aldehyde or alcohol.,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 119, no. 2, pp. 171–180, 2004.
- [9] J. J. Salas and J. Sánchez, “Hydroperoxide lyase from olive (*Olea europaea*) fruits,” *Plant Sci.*, vol. 143, no. 1, pp. 19–26, 1999.
- [10] A. Itoh and B. A. Vick, “The purification and characterization of fatty acid hydroperoxide lyase in sunflower,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*,

vol. 1436, no. 3, pp. 531–540, 1999.

- [11] A. R. Hornostaj and D. S. Robinson, “Purification of hydroperoxide lyase from cucumbers,” *Food Chem.*, vol. 66, no. 2, pp. 173–180, 1999.
- [12] C. N. S. P. Suurmeijer, M. Pérez-Gilabert, D. J. Van Unen, H. T. W. M. Van Der Hijden, G. A. Veldink, and J. F. G. Vliegthart, “Purification, stabilization and characterization of tomato fatty acid hydroperoxide lyase,” *Phytochemistry*, vol. 53, no. 2, pp. 177–185, 2000.
- [13] H. N. Rabetafika, C. Gigot, M. Fauconnier, M. Ongena, J. Destain, P. Jardin, J. Waelele and P. Thonart, “Sugar beet leaves as new source of hydroperoxide lyase in a bioprocess producing green-note aldehydes,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 30, no. 6, pp. 1115–1119, 2008.
- [14] Z. Long, X. Kong, C. Zhang, B. Jiang, and Y. Hua, “Purification and characterization of hydroperoxide lyase from amaranth tricolor (*Amaranthus mangostanus* L.) leaves,” *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 231, no. 6, pp. 865–871, 2010.
- [15] X. Fernandez, S. Kerverdo, E. Duñach, and L. Lizzani-Cuvelier, “Les hétérocycles dans la chimie des arômes-Heterocycles in aroma chemistry,” *Actual. Chim.*, vol. Avril, no. 1, pp. 4–14, 2002.
- [16] C. Gigot, M. Ongena, M. Fauconnier, Y. Muhovski, J. Waelele, P. Jardin and P. Thonart, “Optimization and scaling up of a biotechnological synthesis of natural green leaf volatiles using *Beta vulgaris* hydroperoxide lyase,” *Process Biochem.*, vol. 47, no. 12, pp. 2547–2551, 2012.
- [17] P. Baumann, A. Osberghaus, and J. Hubbuch, “Systematic purification of salt-intolerant proteins by ion-exchange chromatography: The example of human α -galactosidase A,” *Eng. Life Sci.*, p. n/a-n/a, 2015.
- [18] D. Voet and J. Voet, *Bioquímica*, Tercera ed. 2006.
- [19] D. Freifelder, *Técnicas de Bioquímica y Biología Molecular*. 2003.
- [20] A. Gennaro, *Remington Farmacia*, Segunda. 2003.

- [21] E. Schröder, T. Jönsson, and L. Poole, "Hydroxyapatite chromatography: Altering the phosphate-dependent elution profile of protein as a function of pH," *Anal. Biochem.*, vol. 313, no. 1, pp. 176–178, 2003.
- [22] P. Gagnon, R. Frost, T. Ogawa, V. Biosystems, and B. Laboratories, "CHT™ Ceramic Hydroxyapatite — A New Dimension in Chromatography of Biological Molecules," *Biorad*, pp. 3–6, 2000.
- [23] S. Zielińska, J. Kolniak-Ostek, M. Dziadas, J. Oszmiański, and A. Matkowski, "Characterization of polyphenols in *Agastache rugosa* leaves and inflorescences by UPLC-qTOF-MS following FCPC separation," *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, vol. 39, no. 4, pp. 209–219, 2016.
- [24] I. S. and H. A. Taleuzzaman M*, Ali S, Gilani SJ, "Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) - A Review," *J. Anal. Pharm. Chem.*, vol. 6, no. 2, p. 1056, 2015.
- [25] Y. Wu, J. R. Engen, and W. B. Hobbins, "Ultra performance liquid chromatography (UPLC) further improves hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 17, no. 2, pp. 163–167, 2006.
- [26] J. R. Yates, "Structure of Peptides and Proteins," vol. 265, 1993.
- [27] P. M. Le, M. McCooeye, and A. Windust, "Application of UPLC-QTOF-MS in MSE mode for the rapid and precise identification of alkaloids in goldenseal (*Hydrastis canadensis*)," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 406, no. 6, pp. 1739–1749, 2014.
- [28] H. Lodish, *Biología celular y molecular*, Quinta ed. 2005.
- [29] K. Biji and S. Hal, *Protein Electrophoresis: Methods and Protocols*. New York: Humana Press, 2012.
- [30] D. Voet, J. Voet, and C. Pratt, *Fundamentos de Bioquímica la vida a nivel molecular*, Segunda ed. 2007.
- [31] Thermofisher, "Native Page Protocol," pp. 8–11, 2014.
- [32] T. Demeke and G. R. Jenkins, "Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors

and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 396, no. 6, pp. 1977–1990, 2010.

- [33] A. Orfao and M. Morent, “Protocolo de Extracción de Ácidos Nucleicos,” *Red Nac. Biobancos*, p. 30, 2015.
- [34] J. Ye, G. Coulouris, I. Zaretskaya, I. Cutcutache, S. Rozen, and T. L. Madden, “Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction.,” *BMC Bioinformatics*, vol. 13, p. 134, 2012.
- [35] R. Kalendar, B. Khassenov, Y. Ramankulov, O. Samuilova, and K. I. Ivanov, “Fast PCR: An *in silico* tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis,” *Genomics*, vol. 109, no. 3–4, pp. 312–319, 2017.
- [36] L. C. Y. Cheng, “Specific primer design for the polymerase chain reaction,” 2010.
- [37] A. M. Bolivar, A. Rojas, and P. Garcia-Lugo, “PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización,” *Av. en Biomed.*, vol. 3, no. 1, pp. 25–33, 2014.
- [38] T. D. D. L, C. Ibarra, and C. Velasquillo, “Fundamentos de la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real,” *Tecnología en Salud*, vol. 2, no. 2, pp. 70–80, 2013.
- [39] M. Herrero, J. a Mendiola, A. Cifuentes, and E. Ibáñez, “Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications.,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1217, no. 16, pp. 2495–511, 2010.
- [40] L. Nahar and S. D. Sarker, “Supercritical Fluid Extraction,” *Nat. Prod. Isol.*, vol. 20, pp. 47–76, 2005.
- [41] H. Hang-Ping, C. Harold, and C. Jian-Guo, “Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Oil and Squalene from *Amaranthus* Grain,” pp. 7921–7925, 2003.
- [42] M. D. Luque de Castro, M. Valcárcer, and M. T. Tena, “Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico,” *Editor. Reverté*, p. 480, 1993.
- [43] Z. S. Zhang, L. J. Wang, D. Li, S. S. Jiao, X. D. Chen, and Z. H. Mao, “Ultrasound-assisted extraction of oil from flaxseed,” *Sep. Purif. Technol.*, vol. 62, no. 1, pp. 192–

198, 2008.

- [44] U. P. Martínez-Hernández, “Diseño, construcción y validación experimental de un equipo de extracción supercrítica a escala laboratorio,” Tesis. Universidad Tecnológica de la Mixteca, 2016.
- [45] Y.-J. Park, T. Nishikawa, K. Matsushima, M. Minami, and K. Nemoto, “A rapid and reliable PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) marker for the identification of *Amaranthus cruentus* species.,” *Breed. Sci.*, vol. 64, no. 4, pp. 422–6, 2014.
- [46] E. C. Mapes, E. Espitia, R. Inifap, and C. E. Baj, “Recopilación y análisis de la información existente de las especies del genero amaranthus cultivadas y de sus posibles parientes silvestres en México.,” pp. 1–232, 2011.
- [47] G. Calderón and J. Rzedowski, *Flora fanerogámica del Valle de México*. 2001.
- [48] R. Bye and E. Linares, “Los quelites, plantas comestibles de México,” pp. 11–14, 2000.
- [49] C. A. Diemeleou and S. L. Niamke, “Physicochemical and nutritive characterization of high value non- conventional oil from seeds of *Amaranthus Hybridus* Linn,” vol. 10, no. 24, pp. 100–115, 2014.
- [50] N. Tijet, U. Wäspi, D. Gaskin, P. Hunziker, B. Muller, E. Vulfson, A. Slusarenko, A. Brash and I. Whitehead, “Purification, molecular cloning, and expression of the gene encoding fatty acid 13-hydroperoxide lyase from guava fruit (*Psidium guajava*).,” *Lipids*, vol. 35, no. 7, pp. 709–720, 2000.
- [51] F. Husson and J. M. Belin, “Purification of Hydroperoxide Lyase from Green Bell Pepper (*Capsicum annuum* L.) Fruits for the Generation of C6-aldehydes in Vitro,” pp. 1991–1995, 2002.
- [52] M. Gargouri, P. Drouet, and M.-D. Legoy, “Hydroperoxide-lyase activity in mint leaves,” *J. Biotechnol.*, vol. 111, no. 1, pp. 59–65, 2004.
- [53] N. Tijet, C. Schneider, B. L. Muller, and a R. Brash, “Biogenesis of volatile aldehydes

- from fatty acid hydroperoxides: molecular cloning of a hydroperoxide lyase (CYP74C) with specificity for both the 9- and 13-hydroperoxides of linoleic and linolenic acids.,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 386, no. 2, pp. 281–289, 2001.
- [54] W. M. Mu, Q. H. Xue, B. Jiang, and Y. F. Hua, “Molecular cloning, expression, and enzymatic characterization of *Solanum tuberosum* hydroperoxide lyase,” *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 234, no. 4, pp. 723–731, 2012.
- [55] K. Matsui, C. Miyahara, J. Wilkinson, B. Hiatt, V. Knauf, and T. Kajiwara, “Fatty acid hydroperoxide lyase in tomato fruits: cloning and properties of a recombinant enzyme expressed in *Escherichia coli.*,” *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, vol. 64, no. 6, pp. 1189–1196, 2000.
- [56] M. P. Santiago-Gómez, S. Kermasha, J. M. Nicaud, J. M. Belin, and F. Husson, “Predicted secondary structure of hydroperoxide lyase from green bell pepper cloned in the yeast *Yarrowia lipolytica*,” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 65, pp. 63–67, 2010.
- [57] S. Kermasha, X. Perraud, B. Bisakowski, and F. Husson, “Production of flavor compounds by hydroperoxide lyase from enzymatic extracts of *Penicillium sp.*,” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 19–20, pp. 479–487, 2002.
- [58] R. Espinoza-Rivera, “La enzima hidroperóxido liasa del orégano (*Origanum vulgare* L.): extracción y primera etapa de purificación utilizando cromatografía de intercambio iónico,” Tesis. Universidad Tecnológica de la Mixteca, 2015.
- [59] H. Fukushige and D. F. Hildebrand, “Watermelon (*Citrullus lanatus*) hydroperoxide lyase greatly increases C 6 aldehyde formation in transgenic leaves,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 6, pp. 2046–2051, 2005.
- [60] K. Matsui, M. Shibutani, T. Hase, and T. Kajiwara, “Bell pepper fruit fatty acid hydroperoxide lyase is a cytochrome P450 (CYP74B),” *FEBS Lett.*, vol. 394, pp. 21–24, 1996.
- [61] B. Q. Zhu, X. Q. Xu, Y. W. Wu, C. Q. Duan, and Q. H. Pan, “Isolation and characterization of two hydroperoxide lyase genes from grape berries HPL isogenes in *Vitis vinifera* grapes,” *Mol. Biol. Rep.*, vol. 39, no. 7, pp. 7443–7455, 2012.

- [62] J. Xiong, X. Kong, C. Zhang, Y. Chen, and Y. Hua, "Production of (2E)-hexenal by a hydroperoxide lyase from *Amaranthus tricolor* and salt-adding steam distillation for the separation," *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 235, no. 5, pp. 783–792, 2012.
- [63] M. A. Noordermeer, W. Van Der Goot, A. J. Van Kooij, J. W. Veldsink, G. A. Veldink, and J. F. G. Vliegthart, "Development of a biocatalytic process for the production of C6-aldehydes from vegetable oils by soybean lipoxygenase and recombinant hydroperoxide lyase," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, no. 15, pp. 4270–4274, 2002.
- [64] M. Aziz, N. Ben Akacha, F. Husson, and S. Kermasha, "Synthesis of Linoleic Acid Hydroperoxides as Flavor Precursors, Using Selected Substrate Sources," *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 91, no. 11, pp. 1867–1876, 2014.
- [65] M. P. Santiago-Gómez, H. T. Thanh, J. D. Conick, R. Cachon, S. Kermasha, J. M. Belin, P. Gervais and F. Husson "Modeling hexanal production in oxido-reducing conditions by the yeast *Yarrowia lipolytica*," *Process Biochem.*, vol. 44, no. 9, pp. 1013–1018, 2009.
- [66] S. M. Pourmortazavi and S. S. Hajimirsadeghi, "Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis," *J. Chromatogr. A*, vol. 1163, no. 1–2, pp. 2–24, 2007.
- [67] L. Ciurlia, M. Bleve, and L. Rescio, "Supercritical carbon dioxide co-extraction of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* L.) and hazelnuts (*Corylus avellana* L.): A new procedure in obtaining a source of natural lycopene," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 49, no. 3, pp. 338–344, 2009.
- [68] M. Dong and T. H. Walker, "Production and recovery of polyunsaturated fatty acids-added lipids from fermented canola," *Bioresour. Technol.*, vol. 99, no. 17, pp. 8504–8506, 2008.
- [69] Z. J. Wei, A. M. Liao, H. X. Zhang, J. Liu, and S. T. Jiang, "Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of silkworm pupal oil applying the response surface methodology," *Bioresour. Technol.*, vol. 100, no. 18, pp. 4214–4219, 2009.

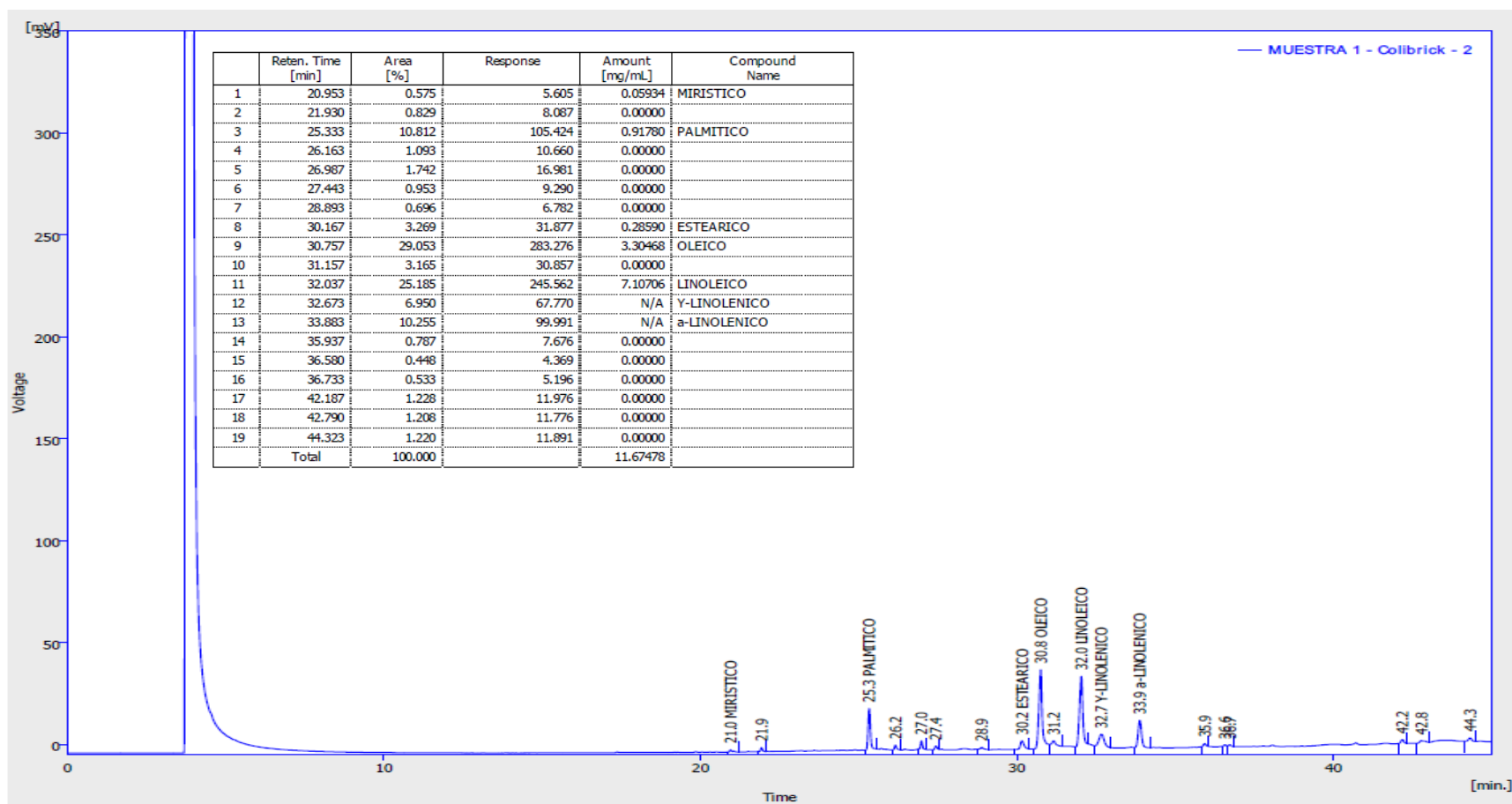
- [70] N. Mezzomo, B. R. Mileo, M. T. Friedrich, J. Martínez, and S. R. S. Ferreira, “Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: process yield and extract composition.,” *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 14, pp. 5622–32, 2010.
- [71] K. Ansari and I. Goodarznia, “Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of essential oil from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves by using Taguchi methodology,” *J. Supercrit. Fluids*, vol. 67, pp. 123–130, 2012.
- [72] M. L. Martínez, M. A. Mattea, and D. M. Maestri, “Pressing and supercritical carbon dioxide extraction of walnut oil,” *J. Food Eng.*, vol. 88, no. 3, pp. 399–404, 2008.
- [73] H. T. Thanh, C. Vergoingnan, R. Cachon, S. Kermasha, P. Gervais, T. X. S. Nguyen, J. M. Belin and F. Husson, “Recombinant hydroperoxide lyase for the production of aroma compounds: Effect of substrate on the yeast *Yarrowia lipolytica*,” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 52–53, no. 1–4, pp. 146–152, 2008.
- [74] Z. Long, X. Kong, C. Zhang, and Y. Hua, “Stability of hydroperoxide lyase activity from *Amaranthus tricolor* (*Amaranthus mangostanus* L.) leaves: influence of selected additives.,” *J. Sci. Food Agric.*, vol. 90, no. 5, pp. 729–34, 2010.
- [75] N. B. Akacha, S. Karboune, M. Gargouri, and S. Kermasha, “Activation and stabilization of the hydroperoxide lyase enzymatic extract from mint leaves (*Mentha spicata*) using selected chemical additives,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 160, no. 3, pp. 901–911, 2010.
- [76] G. Y. Flores-Guzmán and L. Fedra, “Biotecnología Alimentaria,” 2013. [Online]. Available: http://datateca.unad.edu.co/contenidos/211619/Contenido_en_linea_eXe/index.html.
- [77] M. M. Bradford, “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.,” *Anal. Biochem.*, vol. 72, pp. 248–254, 1976.
- [78] A. M. Maldonado-Alconada and J. V. Jorriñ-Novó, “Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida. Análisis de proteínas de hojas de *Arabidopsis thaliana*,” *Dep. Bioquim. y Biol. Mol. Campus Univ. Rabanales*, pp. 1–16, 2001.

- [79] M. Keb-Llanes, G. González, B. Chi-Manzanero, and D. Infante, “A rapid and simple method for small-scale DNA extraction in Agavaceae and other tropical plants,” *Plant Mol. Biol. Report.*, vol. 20, no. September, p. 299a–299e, 2012.
- [80] H. William and W. L. George, *Official methods of analysis of AOAC International*, 18th ed. USA, 2005.
- [81] European Communities, “Características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sus métodos de análisis,” vol. 64, pp. 1–44, 2015.
- [82] J. J. Salas and J. Sánchez, “Hydroperoxide lyase from olive (*Olea europaea*) fruits,” vol. 143, pp. 19–26, 1999.
- [83] Z. Yang, S. Baldermann, and N. Watanabe, “Recent studies of the volatile compounds in tea,” *FRIN*, vol. 53, no. 2, pp. 585–599, 2013.
- [84] J. E. de J. Davila-Avina, G. A. Gonzalez-Aguilar, J. F. Ayala-Zavala, D. R. Sepulveda, and G. I. Olivas, “Volatile Compounds Responsible of Tomato Flavor,” *Rev. Fitotec. Mex.*, vol. 34, no. 2, pp. 133–143, 2011.
- [85] G. E. Anthon and D. M. Barrett, “Thermal inactivation of lipoxygenase and hydroperoxytrienoic acid lyase in tomatoes,” vol. 81, pp. 275–279, 2003.
- [86] K. Matsui, C. Ujita, S. Fujimoto, J. Wilkinson, B. Hiatt, V. Knauf, T. Kajiwara and I. Feussner, “Fatty acid 9- and 13-hydroperoxide lyases from cucumber,” *FEBS Lett.*, vol. 481, no. 2, pp. 183–188, 2000.
- [87] Q. Liu and Y. Hua, “Continuous synthesis of hexanal by immobilized hydroperoxide lyase in packed-bed reactor,” *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 38, no. 12, pp. 2439–2449, 2015.
- [88] K. Verma, J. Dalal, and S. Sharma, “Scientific concepts of polymerase chain reaction (PCR),” *Pharm. Sci. Res.*, vol. 5, no. 8, pp. 3086–3095, 2014.
- [89] G. Wejnerowska, P. Heinrich, and J. Gaca, “Separation of squalene and oil from *Amaranthus* seeds by supercritical carbon dioxide,” *Sep. Purif. Technol.*, vol. 110, pp. 39–43, 2013.

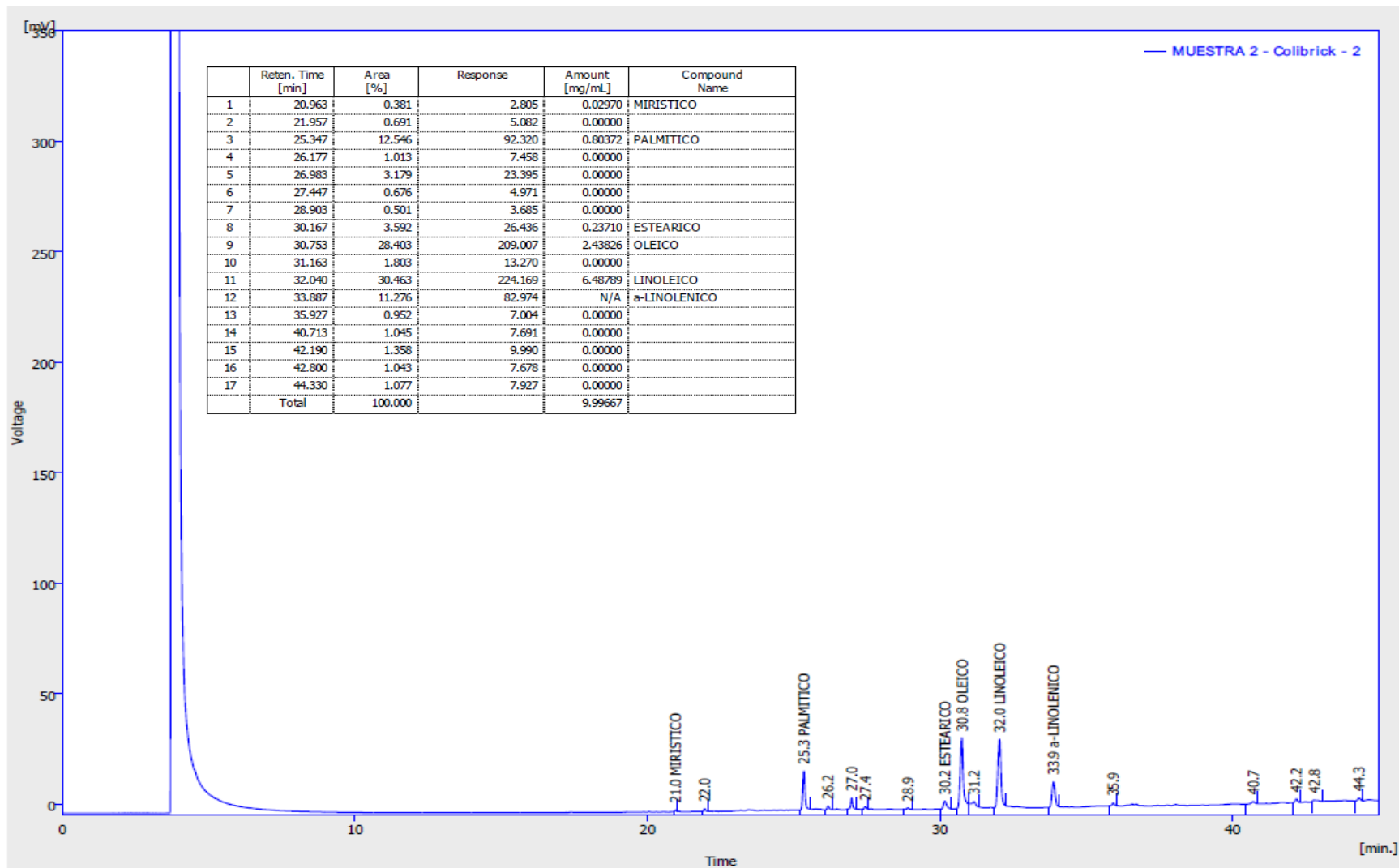
- [90] H. W. Gardner, D. Weisleder, and R. D. Plattner, "Hydroperoxide Lyase and Other Hydroperoxide-Metabolizing Activity in Tissues of Soybean, *Glycine max.*," *Plant Physiol.*, vol. 97, no. 3, pp. 1059–72, 1991.

11. ANEXOS

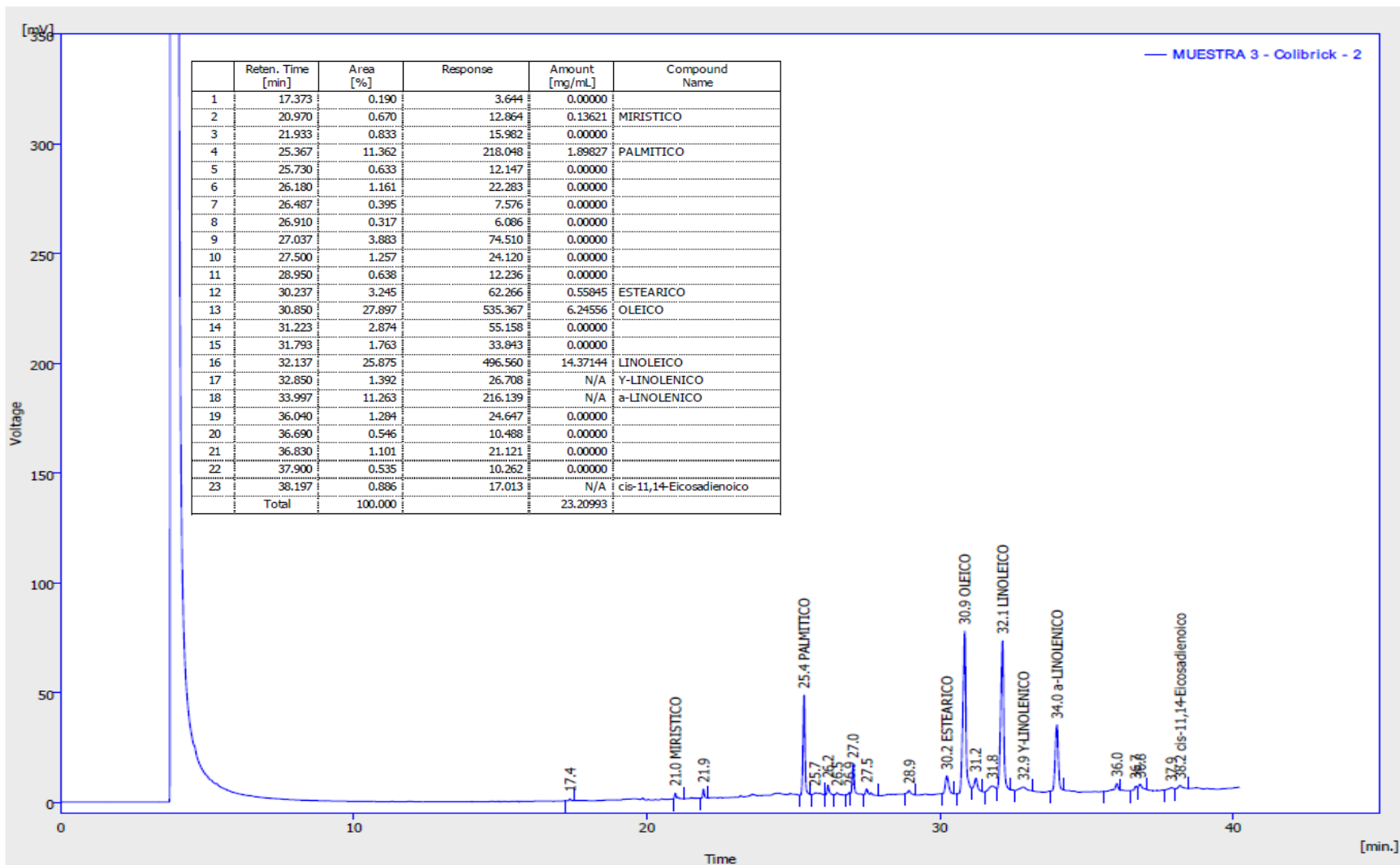
Anexo 1. Cromatogramas y tablas de resultados obtenidos en el análisis por GC de extractos obtenidos por Soxhlet



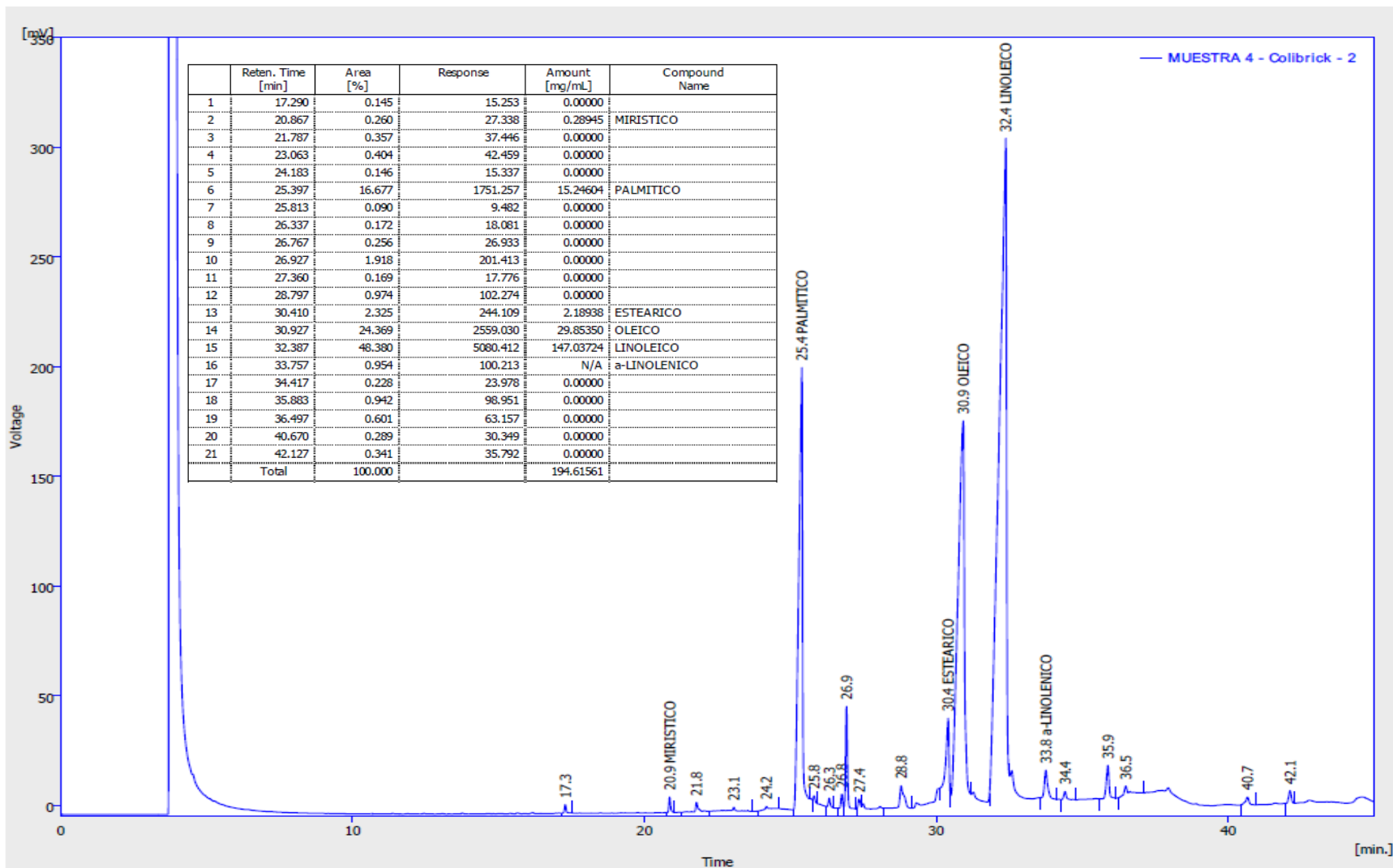
Cromatograma y tabla de resultados de cascarilla 1.



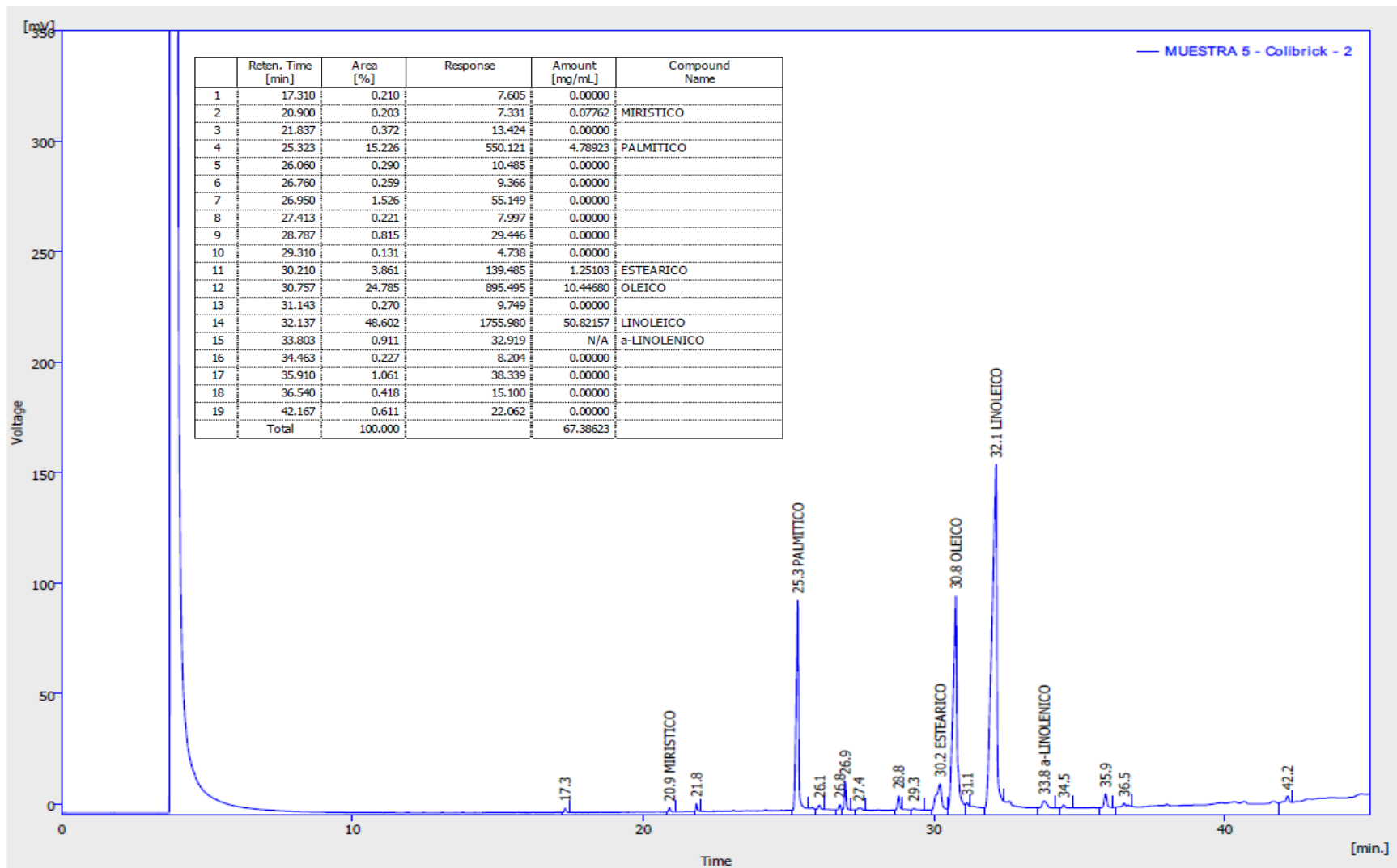
Cromatograma y tabla de resultados de cascarilla 2.



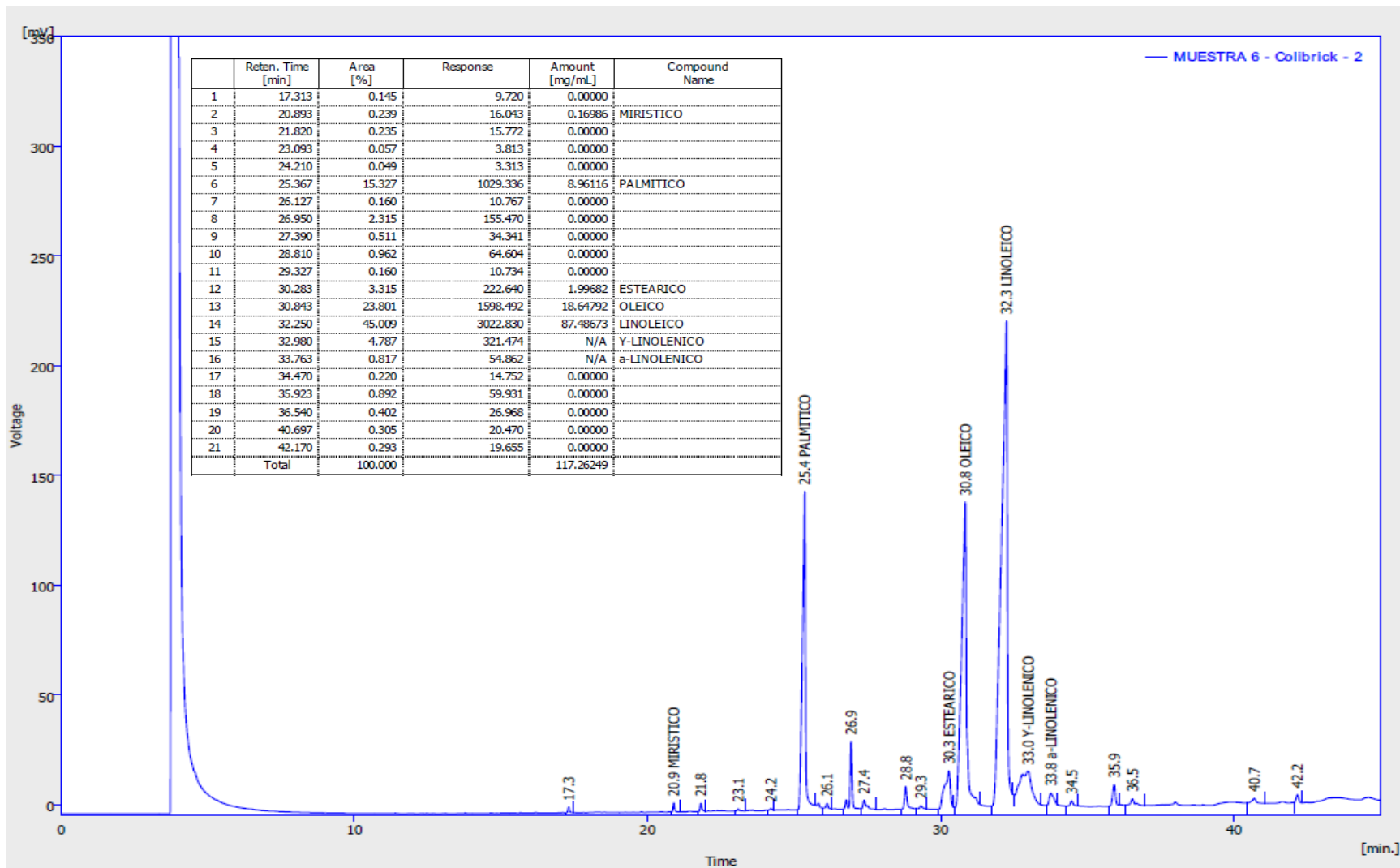
Cromatograma y tabla de resultados de cascarilla 3.



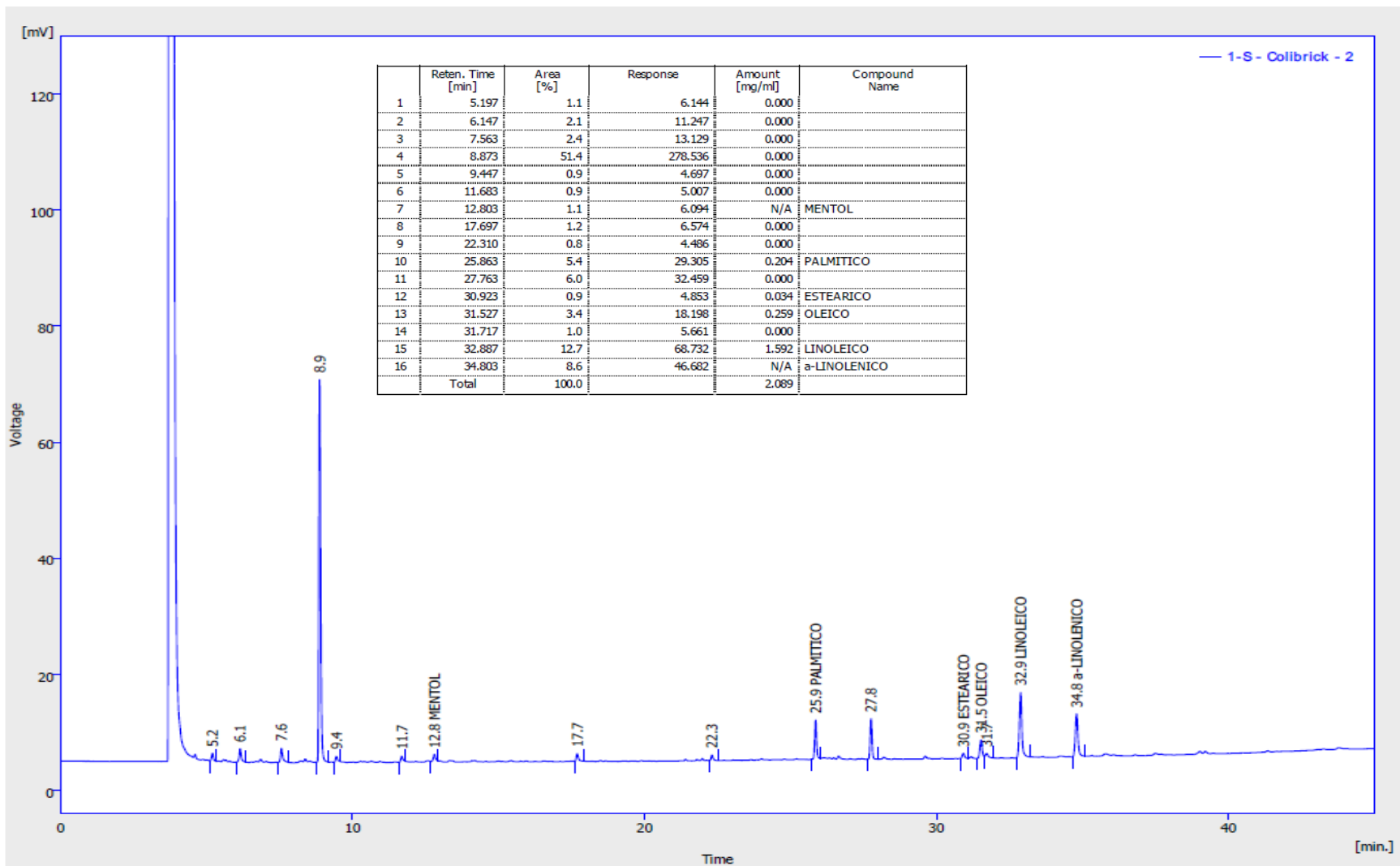
Cromatograma y tabla de resultados de semilla 1.



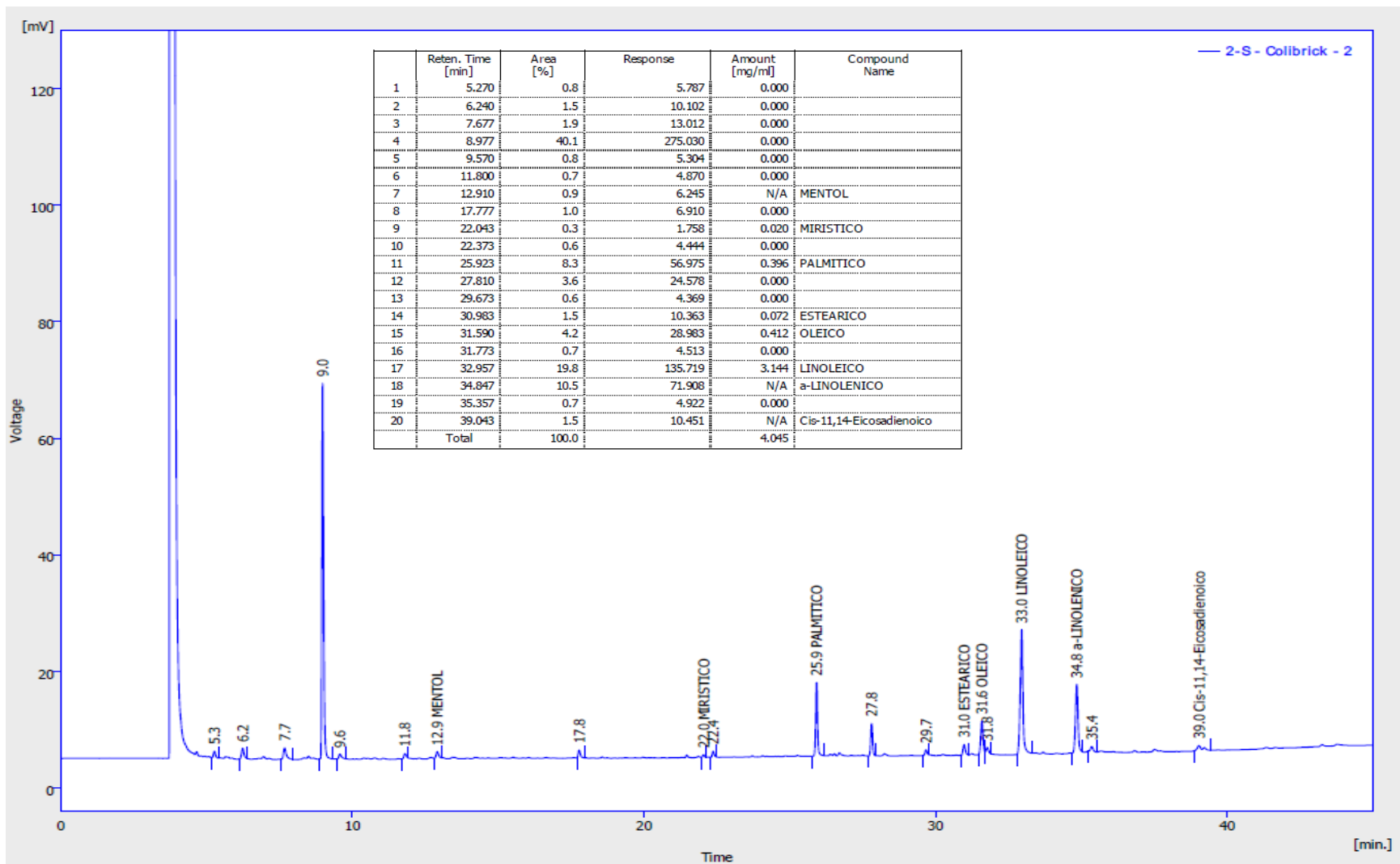
Cromatograma y tabla de resultados de semilla 2.



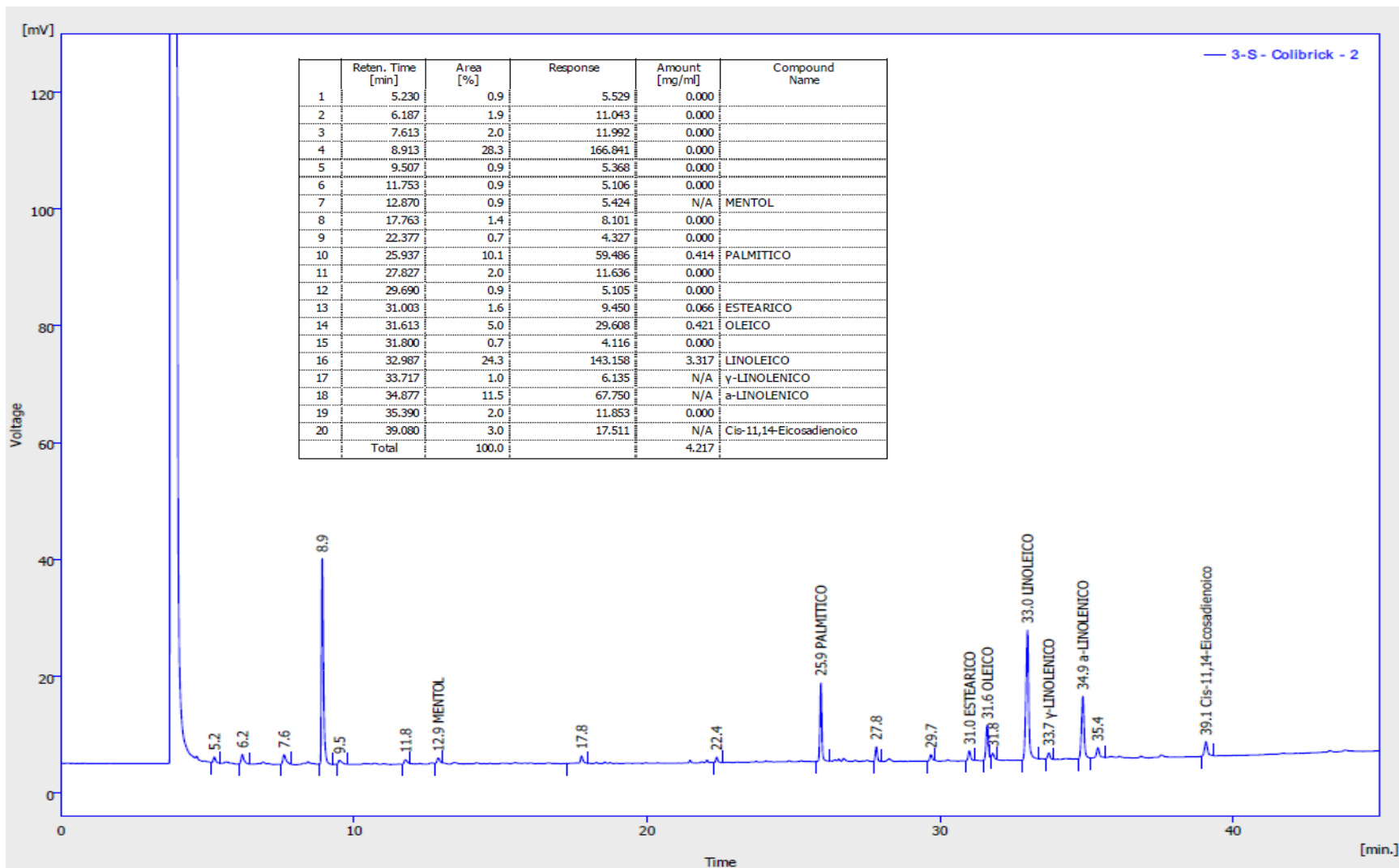
Cromatograma y tabla de resultados de semilla 3.



Cromatograma y tabla de resultados de mezcla 1.

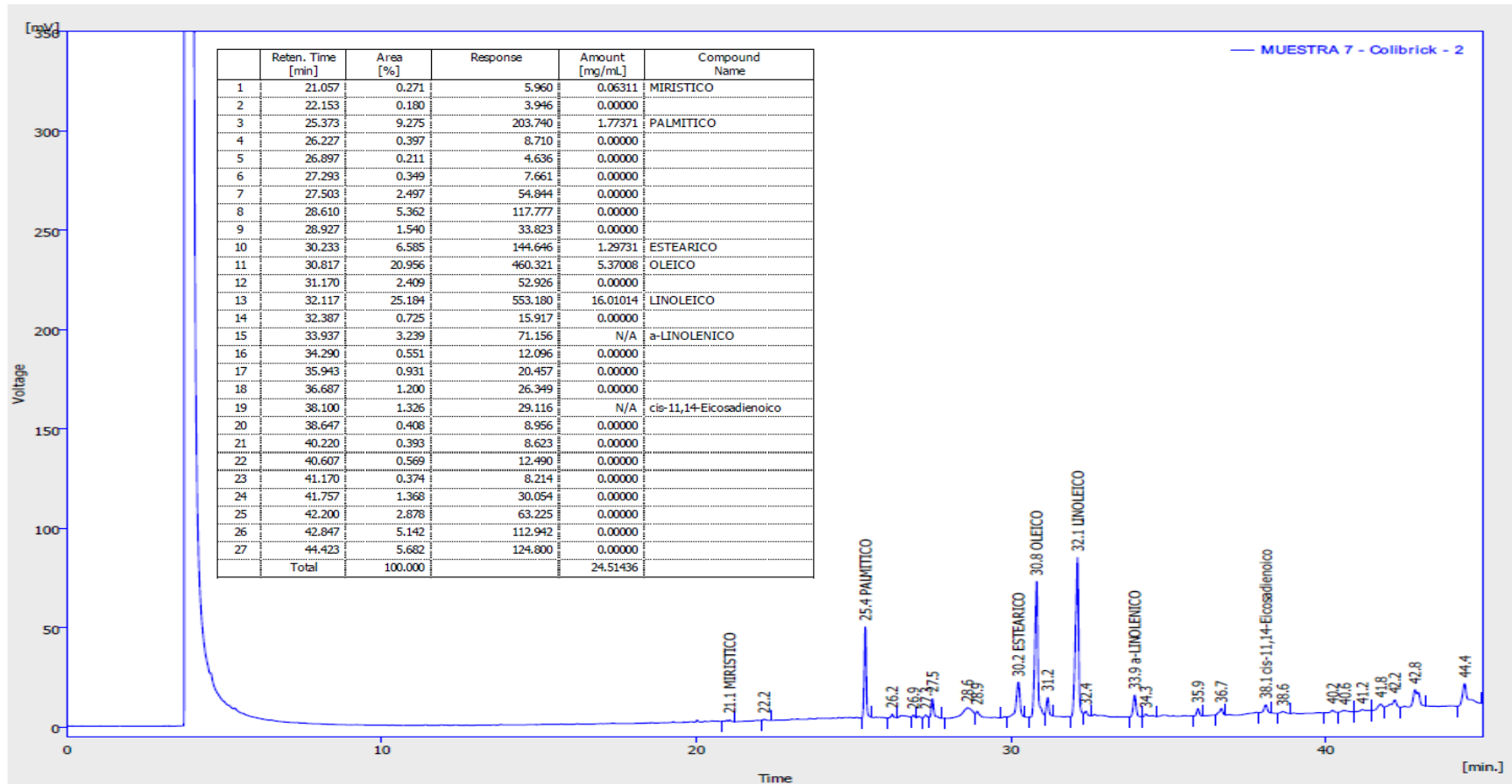


Cromatograma y tabla de resultados de mezcla 2.

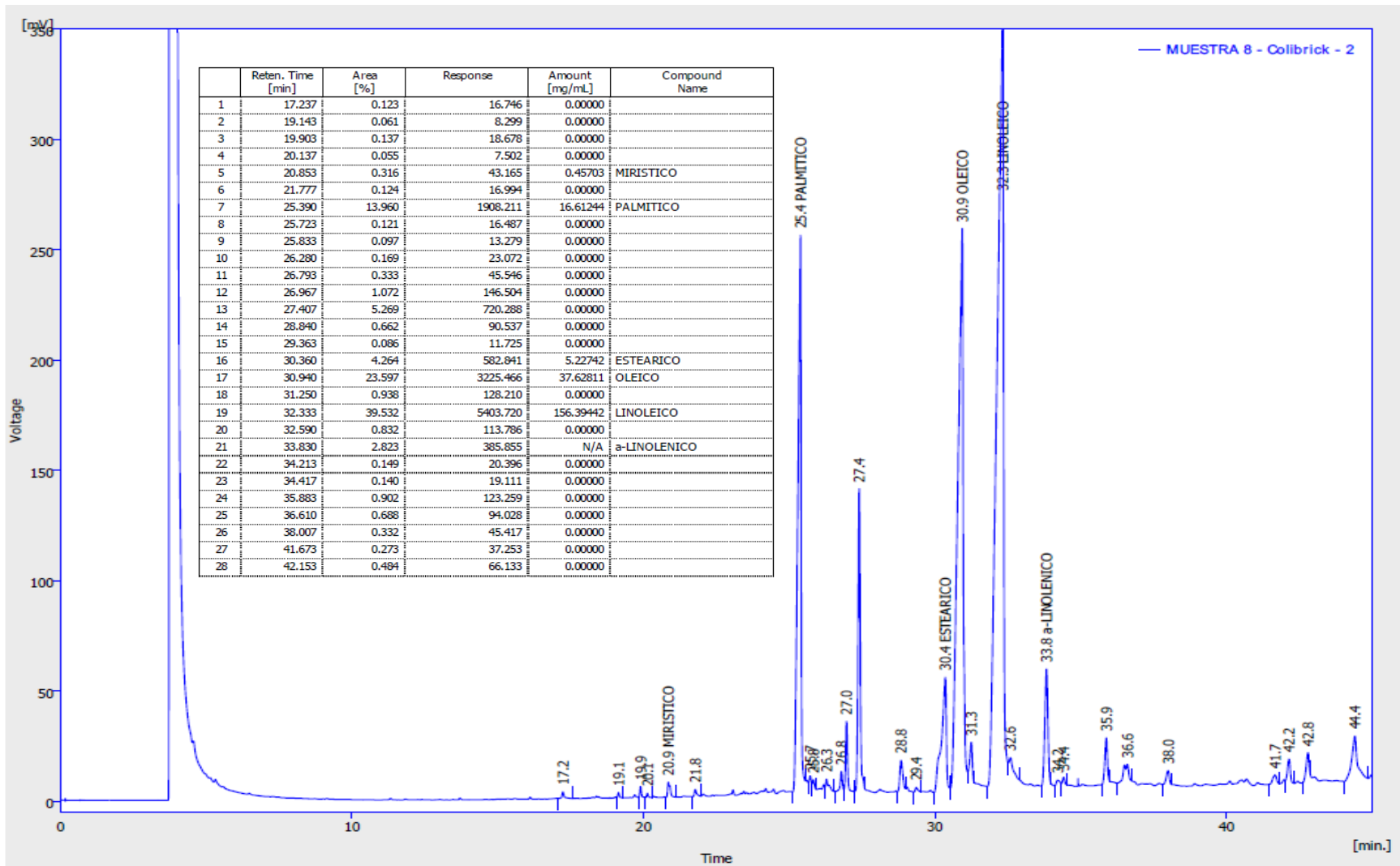


Cromatograma y tabla de resultados de mezcla 3.

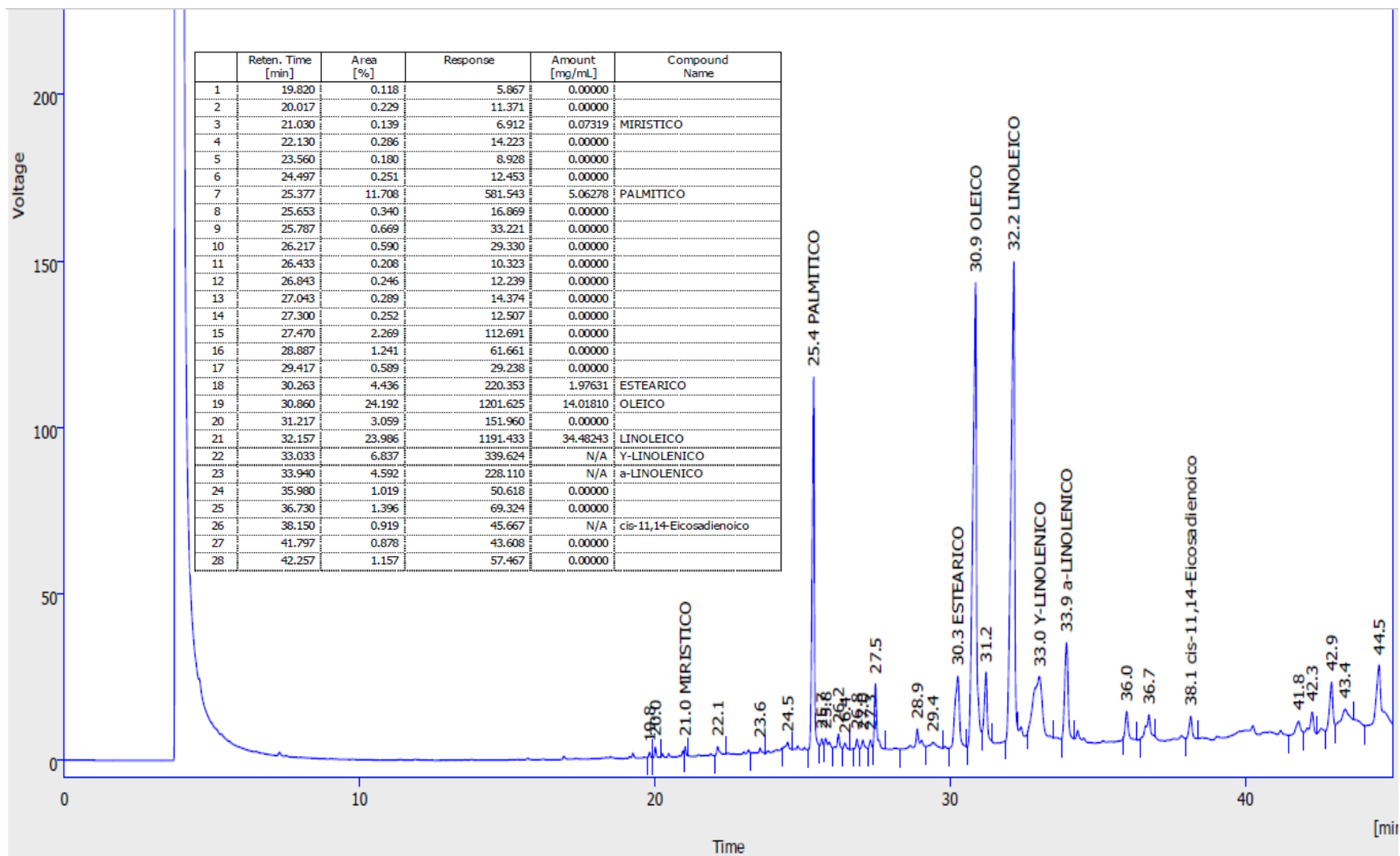
Anexo 2. Cromatogramas y tablas de resultados obtenidos en el análisis por GC de extractos obtenidos por EFS



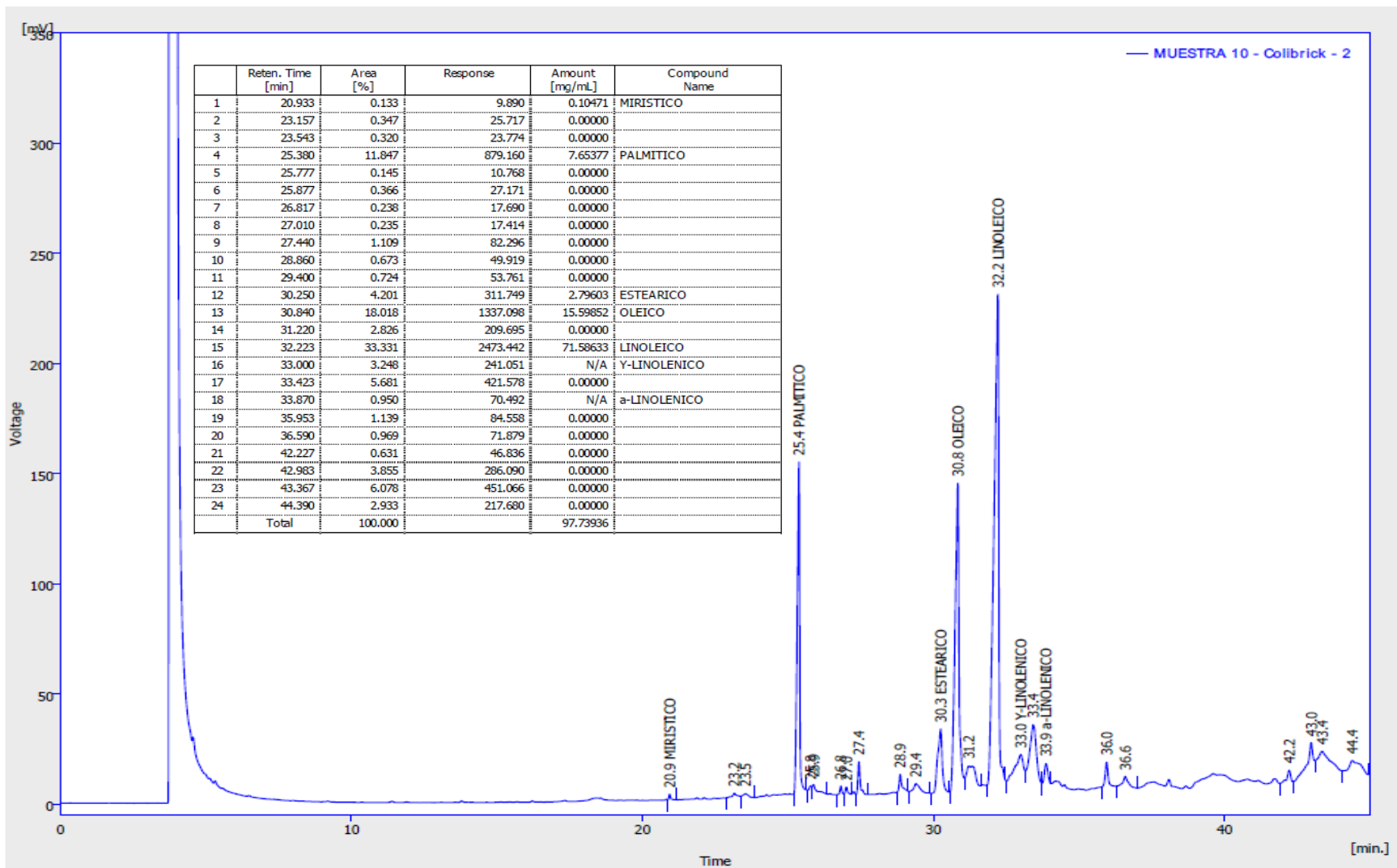
Cromatograma y tabla de resultados de cascarilla 1.



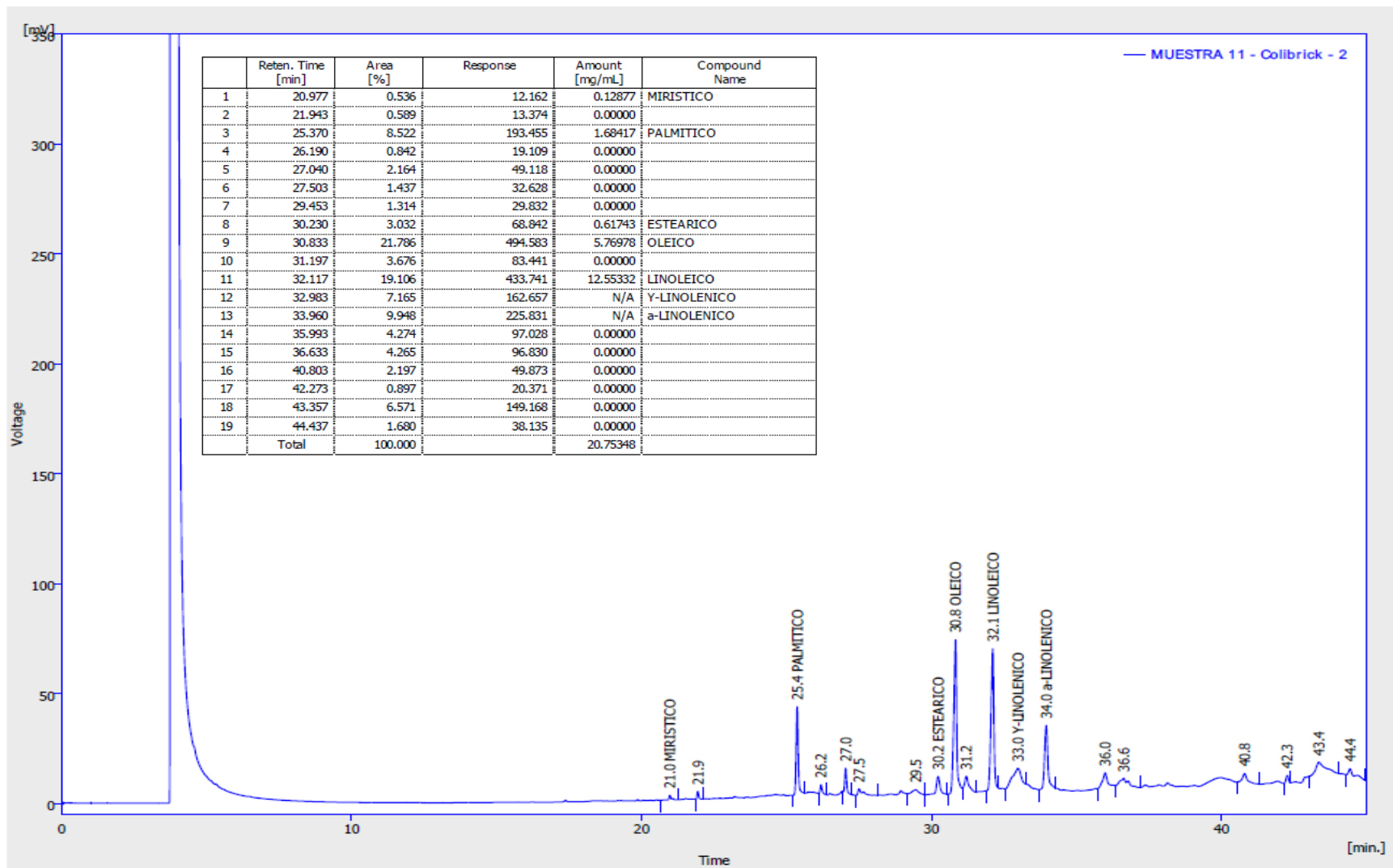
Cromatograma y tabla de resultados de cascarilla 2.



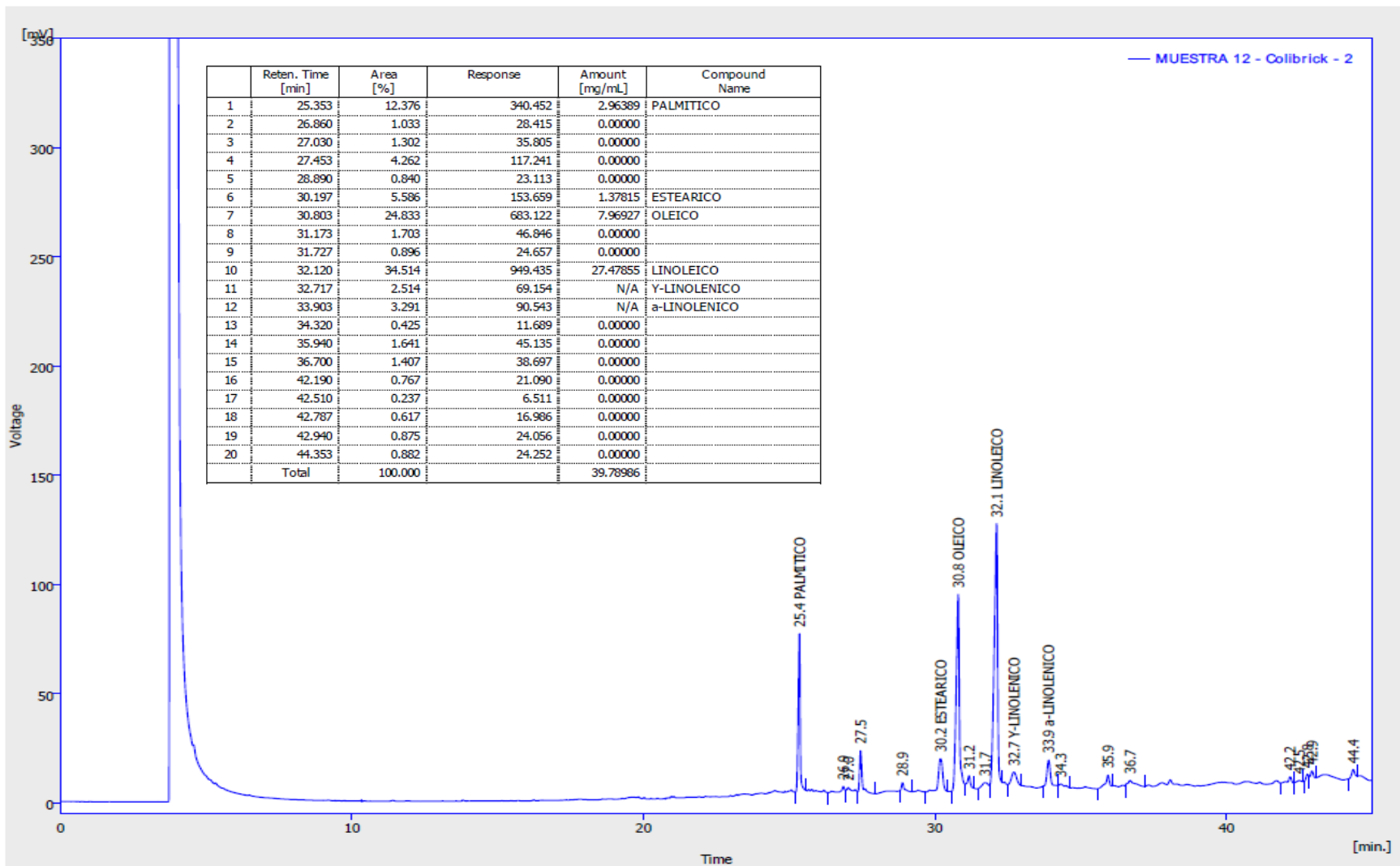
Cromatograma y tabla de resultados de cascarilla 3.



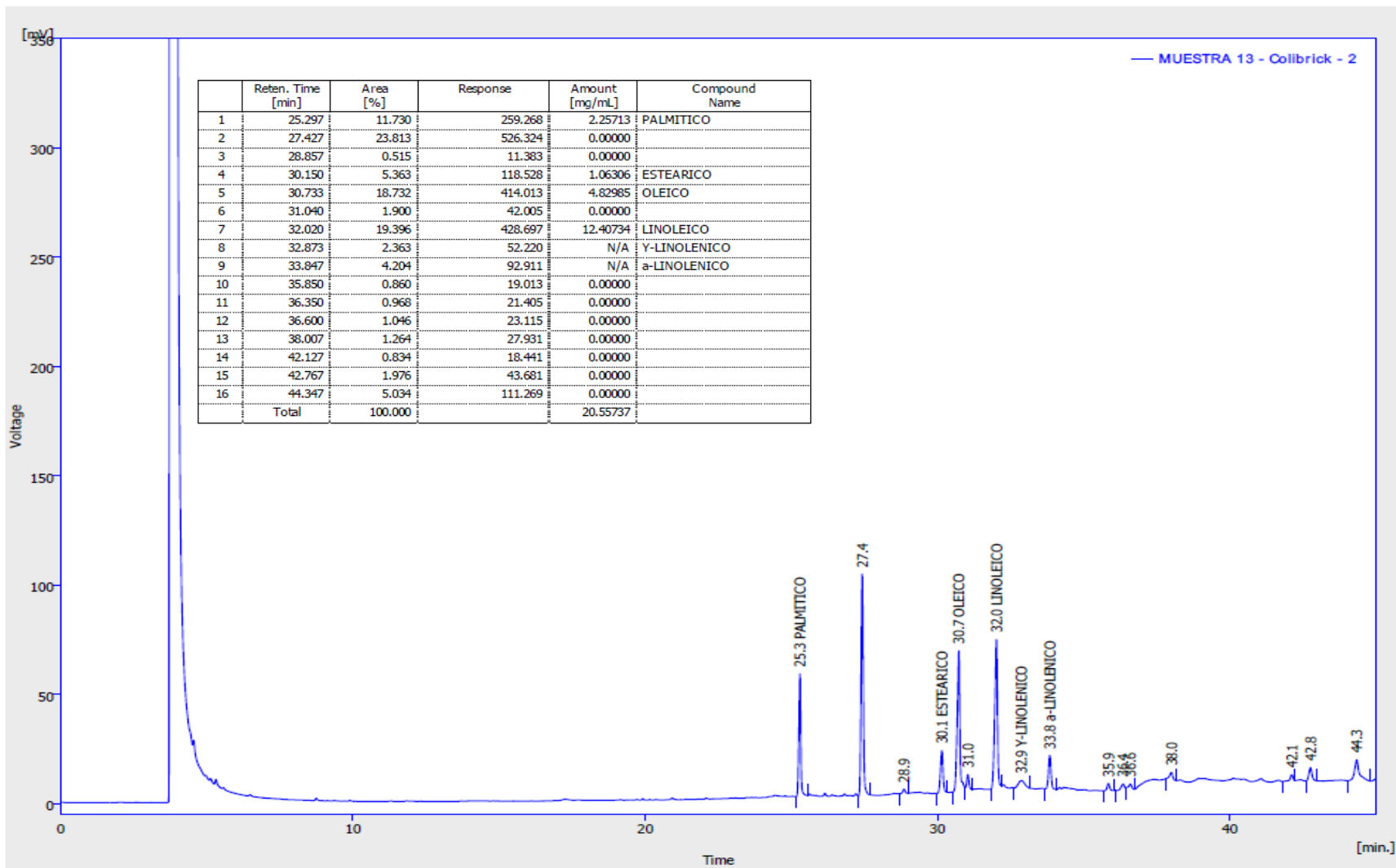
Cromatograma y tabla de resultados de semilla 1.



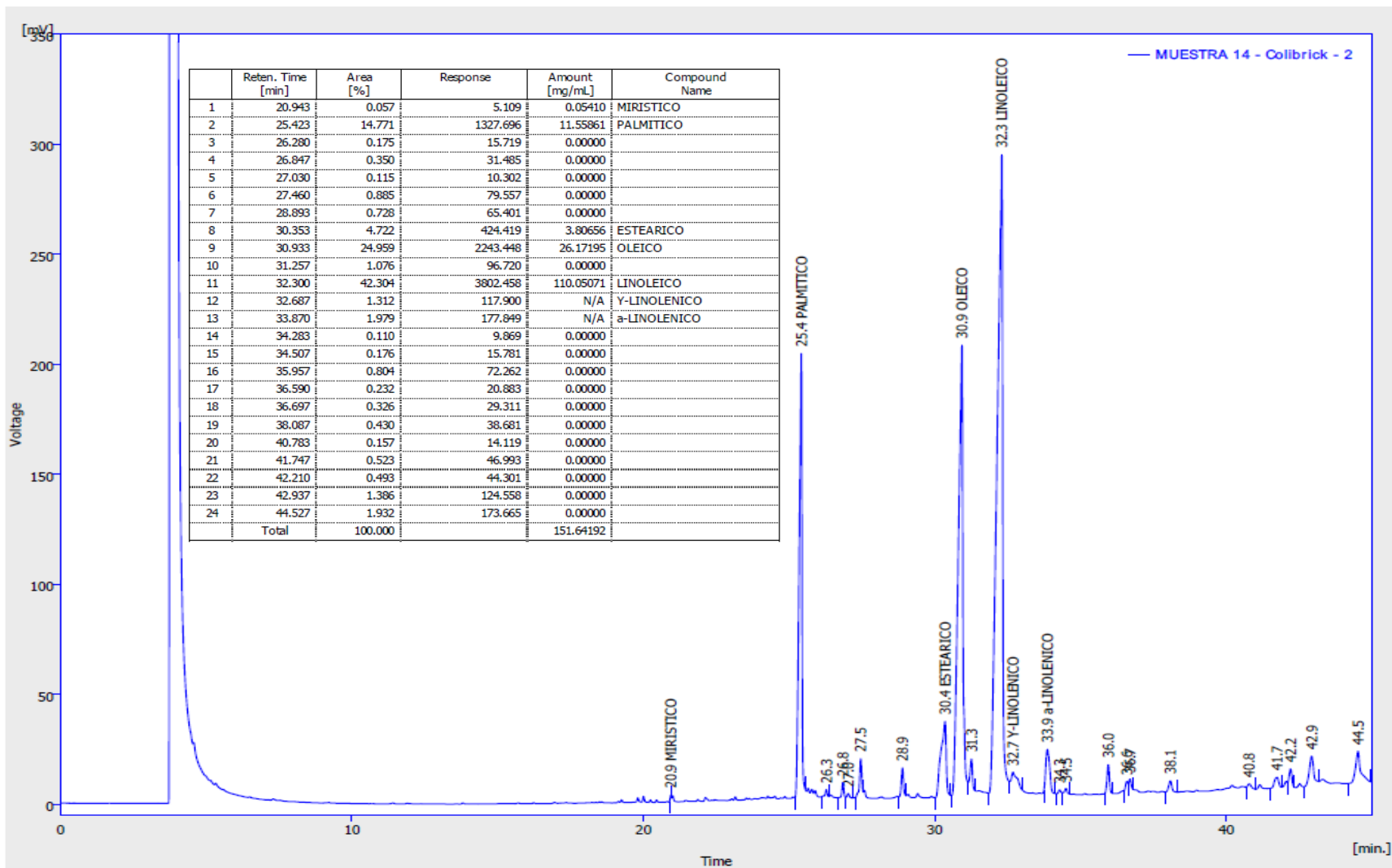
Cromatograma y tabla de resultados de semilla 2.



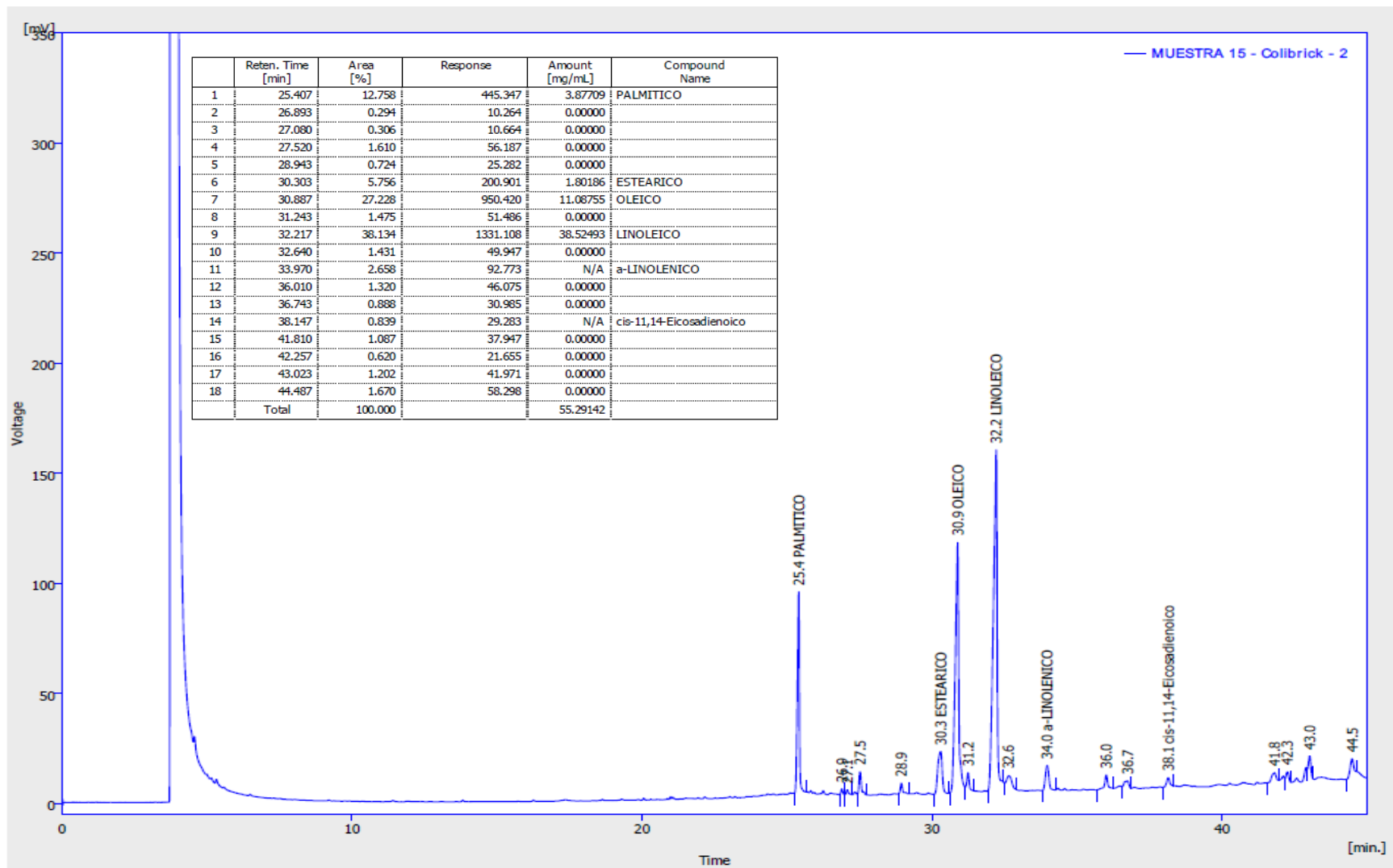
Cromatograma y tabla de resultados de semilla 3.



Cromatograma y tabla de resultados de mezcla 1.



Cromatograma y tabla de resultados de mezcla 2.



Cromatograma y tabla de resultados de mezcla 3.