

MODIFICACIÓN QUÍMICA POR METILACIÓN DE FRUCTANOS DE ACHICORIA Y AGAVE PARA SU POSIBLE APLICACIÓN EN ALIMENTOS

Hernández-Rojas Jaira^b, Castañeda-Ovando Araceli^a, Moreno-Vilet Lorena^b

^aUniversidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Área Académica de Química del Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. Carretera Pachuca – Tulancingo Km 4.5, CP. 42182, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México.

^bCONACYT – Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. A.C. CIDEA, Av. Normalistas 800. Colinas de la Normal. 44270 Guadalajara, Jalisco. México. lmoreno@ciatej.mx

Recibido 01 de noviembre 2018; aceptado 06 de mayo 2019

Palabras clave:
fructanos, metilación, infrarrojo

RESUMEN. Los polisacáridos han captado la atención de cierto grupo de la población debido a sus posibles propiedades funcionales que dependen de su estructura química. Dicha estructura se puede modificar a través de diferentes métodos químicos para mejorar las propiedades tecno-funcionales de aplicación en la formulación de alimentos. Algunos ejemplos de estas modificaciones son los almidones modificados y las pectinas de bajo y alto metoxilo. El objetivo de este trabajo fue modificar químicamente, a través de una reacción de metilación, la estructura de los fructanos (de achicoria y agave). La metodología se sustenta en la reacción de metilación bajo condiciones completamente anhidras utilizando un solvente polar (DMSO), una base fuerte (NaOH) y un agente metilante (CH₃I). Después de 18 h de reacción, se obtuvo un gel color blanco, altamente soluble en diclorometano y con capacidad de retener agua en su estructura. La eficiencia de la reacción de metilación se comprobó utilizando la cromatografía en capa fina y el análisis por espectroscopia en el infrarrojo.

Key words:
fructans, methylation, infrared

ABSTRACT. Nowadays, the polysaccharides have attracted the attention of a certain population group due to its possible functional properties that depend on their chemical structure. This structure can be modified through different chemical methods to improve the techno-functional properties of application in food formulation. Examples of these modifications are modified starches and low and high methoxyl pectins. The objective of this work was to chemically modify, through a methylation reaction, the structure of fructans (chicory and agave). The methodology is based on the methylation reaction under completely anhydrous conditions using a polar solvent (DMSO), a strong base (NaOH) and a methylating agent (CH₃I). After 18 h of reaction, a white gel was obtained, highly soluble in dichloromethane and capable of retaining water in its structure. The efficiency of the methylation reaction was checked using thin-layer chromatography and infrared spectroscopy.

INTRODUCCIÓN

Los fructanos son polímeros de fructosa, cuya estructura y tipo de enlaces glucosídicos depende de la fuente vegetal de obtención. Así, los fructanos de achicoria contienen enlaces $\beta(2-1)$, conformando una estructura lineal, mientras que los fructanos de agave contienen enlaces $\beta(2-1)$ y $\beta(2-6)$ conformando una estructura ramificada¹. A esta clase de fructanos se les atribuyen propiedades prebióticas, ya que ayudan al bienestar intestinal cuando son fermentados por las bacterias del colon². En lo que respecta a las propiedades tecno-funcionales (solubilidad, capacidad de formación de geles, espesantes), estas están relacionadas directamente con el grado de ramificación y distribución del peso molecular de los fructanos³. Debido a las propiedades antes mencionadas, estos polisacáridos tienen

aplicaciones potenciales como ingrediente funcional en la formulación de alimentos para la industria.

La modificación química de los polisacáridos se realiza con el fin de mejorar una propiedad, o incluso, otorgar nuevas características al polímero modificado. Por ejemplo, la adición de una molécula simple a un polímero natural, tal como almidón, celulosa, quitosano, gelatina, inulina, entre otros, es de gran importancia para el desarrollo de nuevos materiales, combinando las propiedades de la molécula injertada y del polímero natural⁴.

La reacción de modificación química de los fructanos está directamente relacionada con las reacciones de los grupos hidroxilo del polímero. Dentro de la técnica propuesta para el reconocimiento de enlaces glucosídicos se encuentran, además de la reacción

de metilación, la reacción de hidrólisis utilizando un ácido fuerte (ácido trifluoroacético), la reducción de los grupos OH resultantes de la hidrólisis con borohidruro de sodio deuterado y la acetilación con anhídrido acético, para finalmente obtener los derivados volátiles que se cuantificarán por cromatografía de gases.

La metilación es la adición de un grupo metilo (-CH₃) a los grupos hidroxilo de los fructanos (Figura 1). La disolución de la muestra de fructanos se realiza empleando dimetilsulfóxido (DMSO). En esta reacción el NaOH (base fuerte) reacciona con los grupos -OH de los polisacáridos, se libera una molécula agua y el ion Na⁺ queda unido al oxígeno con carga negativa resultante de la reacción. Posteriormente el yoduro de metilo se intercambia con los iones Na⁺ a través de una reacción SN₂. Al término de la reacción todos los alcoholes se transforman en compuestos metilados.

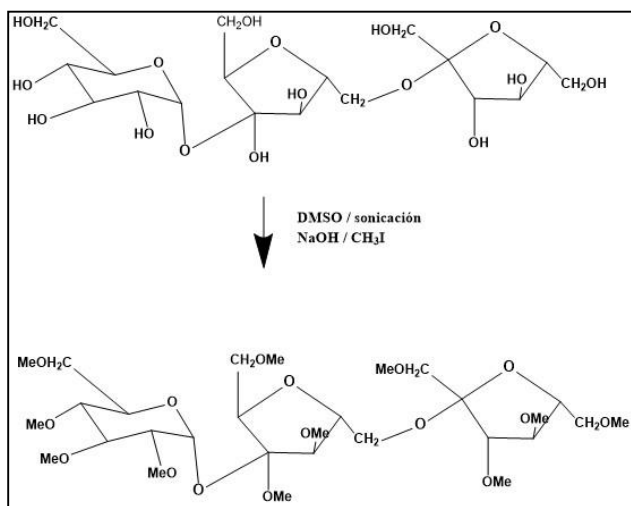


Figura 1. Reacción de metilación de fructanos.

Esta reacción fue perfeccionada por Ciucanu y Kerek en 1984³, y se continúa utilizando hasta hoy en día. Las desventajas de esta reacción son el uso de reactivos peligrosos y contaminantes para el ambiente, la dificultad de mantener las condiciones anhidras, el tiempo excesivo de reacción y la obtención de subproductos que disminuyen el rendimiento de la misma.

El objetivo de este trabajo fue modificar químicamente, a través de una reacción de metilación, la estructura de los fructanos (de achicoria y agave), mejorando las condiciones de reacción de las metodologías convencionales.

METODOLOGÍA

Reacción de metilación. Para realizar la metilación, se siguió la metodología ideada por Ciucanu y Kerek⁵ con algunas modificaciones. En un reactival se agregaron 15 mg de muestra de fructanos de agave o achicoria, 1 mL de DMSO (Sigma-Aldrich, USA) como disolvente, 300 mg de NaOH (Sigma-Aldrich, USA) y 1 mL de yoduro de metilo (Sigma-Aldrich, USA) como agente metilante. La reacción se efectuó bajo condiciones anhidras y de agitación. La aparición de una solución espesa indicó el final de la metilación, la cual se completó en un lapso de tiempo de 18 h.

Para extraer los derivados metilados, se agregaron al reactival 2 mL de diclorometano (Sigma-Aldrich, USA) y el contenido de este se transfirió a un tubo de ensaye con tapón medido 18x150mm. Se utilizaron 4 mL de ácido acético 0.5M para neutralizar los remanentes de NaOH. Posteriormente, se agregaron 5 gotas de tiosulfato de sodio (Sigma-Aldrich, USA) para eliminar el exceso de yoduro en la muestra. Finalmente, se eliminó la fase acuosa y la fase orgánica se sometió a secado a 60°C/ 90 min.

Cromatografía de capa fina. El análisis de las muestras por cromatografía de capa fina se realizó utilizando como fase móvil isopropanol/agua en una proporción de 12:8. Para la fase estacionaria se utilizaron placas de sílica gel (Merck-Millipore, USA). Para el revelado de placas se utilizó H₂SO₄ al 2%, las cuales se sometieron a secado durante 20 min a 80°C.

Espectroscopia infrarrojo. Para el análisis de las bandas por infrarrojo, se utilizó el equipo IR (Perkin Elmer), modelo Spectrum GX. Para ello, se preparó una mezcla de producto de reacción con bromuro de potasio, en una relación 1:100. El espectro se obtuvo en una ventana espectral de 400-4000 cm⁻¹.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al realizar el análisis de los productos metilados utilizando la cromatografía en capa fina (Figura 2) y la absorción de bandas de la espectroscopia de infrarrojo (Figuras 3 y 4) se confirma la obtención de los fructanos metilados por la identificación de las bandas correspondientes al grupo metoxilo, las cuales se encuentran en el rango de 2800 cm^{-1} . Por su parte, los R_f 's obtenidos en las placas de cromatografía en capa fina fueron diferentes al reactivo de partida, por lo que es un indicativo de que se realizó una conversión completa del sustrato de partida a productos metilados⁶.

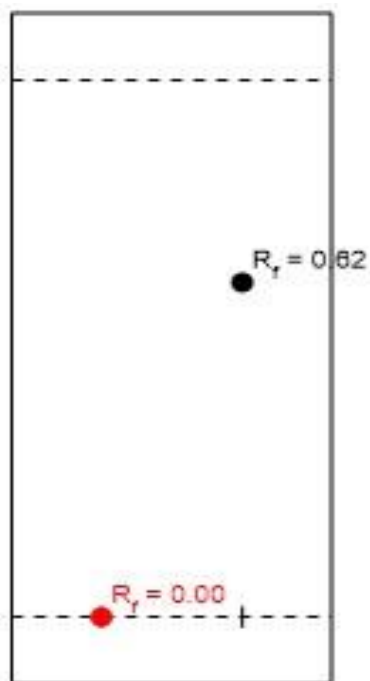


Figura 2. Cromatografía en capa fina de los fructanos de agave metilados (derecha, negro) y fructanos de agave sin metilar (izquierda, rojo), R_f : factor de retención.

Sims y col.⁷, reportan la desaparición de las bandas características de los grupos hidroxilo de los carbohidratos al término de la reacción de metilación. Sin embargo, debido a la dificultad para mantener las condiciones anhidras (uso de reactivos altamente higroscópicos), la banda debida a la vibración del enlace O-H está presente en los productos de reacción.

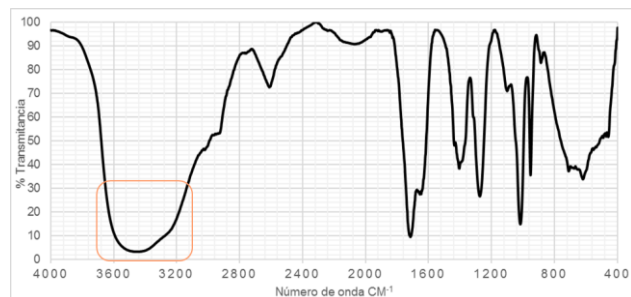


Figura 3. Espectro IR de fructanos de agave, el recuadro indica la absorción de los grupos hidroxilo cercana a 3500 cm^{-1} .

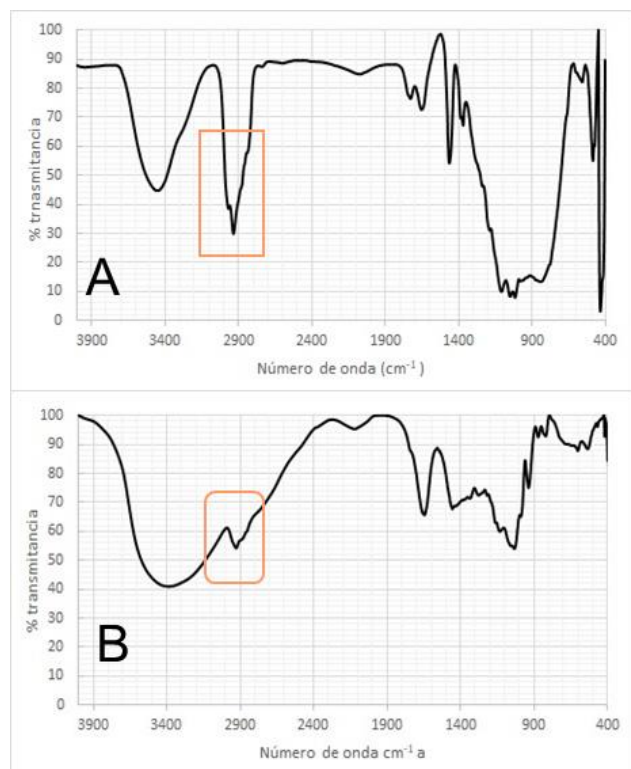


Figura 4. Espectro IR **A)** fructanos de achicoria metilados, **B)** fructanos de agave metilados. Se muestran las bandas del grupo metoxilo en el rango de 2800 cm^{-1} y la reducción de las bandas características de los grupos OH ($3,500\text{ cm}^{-1}$).

Los resultados obtenidos (aparición de la banda perteneciente al grupo metoxilo y reducción de la banda de absorción de los grupos hidroxilo) son similares a los reportados por Sims y col.⁷, en donde se describen los cambios realizados a los métodos, las dificultades para disolver las muestras en DMSO, los tiempos de reacción, y las dificultades para mantener las condiciones anhidras. Debido a estas dificultades, se busca la optimización de la

metilación, mediante el uso de agua como disolvente, la reducción del tiempo de reacción a través de la aplicación de tecnologías emergentes como microondas y reactivos considerados amigables con el ambiente.

Los resultados obtenidos (aparición de la banda perteneciente al grupo metoxilo y reducción de la banda de absorción de los grupos hidroxilo) son similares a los reportados por Sims y col.⁷, en donde se describen los cambios realizados a los métodos, las dificultades para disolver las muestras en DMSO, los tiempos de reacción, y las dificultades para mantener las condiciones anhidras. Debido a estas dificultades, se busca la optimización de la metilación, mediante el uso de agua como disolvente, la reducción del tiempo de reacción a través de la aplicación de tecnologías emergentes como microondas y reactivos considerados amigables con el ambiente.

CONCLUSIONES

Las modificaciones realizadas a la metodología ideada por Ciucanu y Kerek⁵, permitieron obtener un método repetible, esto facilita la obtención de los derivados metilados de los fructanos de agave y achicoria, aunque no fue posible reducir el tiempo de reacción.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a la UAEH por permitir la realización de este trabajo al facilitar el uso del equipo e instalaciones. Al proyecto SEP-CONACYT 287926 del CIATEJ por proporcionar los recursos financieros.

REFERENCIAS

1. López, M.G., Mancilla-Margalli N.A., & Mendoza-Diaz G. (2003). Molecular structures of fructans from Agave tequilana Weber var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 7835-40.
2. Moreno-Vilet L., Camacho-Ruiz R.M. & Portales-Pérez D.P. (2016). Prebiotic Agave Fructans and Immune Aspects. En: *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics*. Watson R. Academic Press, USA. 165-179.
3. Crispín-Isidro, G., Lobato-Calleros, C., Espinosa-Andrews, H., Alvarez-Ramirez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2015). Effect of inulin and agave fructans addition on the rheological, microstructural and sensory properties of reduced-fat stirred yogurt, *LWT - Food Science and Technology*, 62, 438-444.
4. Arizmendi D. (2016). Elaboración de polímeros naturales injertados con compuestos antioxidantes y evaluación de sus propiedades funcionales. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma del Estado de México.
5. Ciucanu, I., & Kerek F. (1984). A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate research*. Vol. (131). 209-217.
6. García-Curbelo, Y., López, M., Bocourt, R., Collado, E., Albelo, N., & Núñez, O. (2015). Caracterización estructural de los fructanos de *Agave fourcroydes* (Lem.) con potencialidades como prebiótico. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 49 (1), 75-80.
7. Sims, I., Carnachan, S., Bell, T., & Hinkley, S. (2018). Methylation analysis of polysaccharides: Technical advice. *Carbohydrate polymers*, 188, 1-7.