

Alicia Vives Pérez

ESTUDIO MEDIANTE ESPECTROSCOPIA MOLECULAR  
UV-VIS-NIR DE LA DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE GOMAS  
VEGETALES

TRABAJO FIN DE GRADO DE QUÍMICA

Dirigido por la Dra. M. Soledad Larrechi

Grado de Química



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

2018

**Abstract**

**Keywords:** vegetal gum,  $\beta$ -galactomannans, spectroscopy, ultraviolet-visible, near infrared

Vegetal gums are products obtained from natural sources. They are rich in  $\beta$ -galactomannans, polysaccharides which reaction with an enzyme named  $\beta$ -mananasa become a new alternative to antibiotics to prevent *Salmonellosis* in animals.

In this work, the enzymatic hydrolysis of three vegetable gums rich in  $\beta$ -galactomannans has been studied by spectroscopy ultraviolet-visible-near infrared (UV-Vis-NIR) and chemometric analysis of the spectra recorded between 400nm and 1100nm for 180min.

The study was carried out using 3 vegetable gums (locus bean, AZO-galactomannan and guar) with different monosaccharide content of their structure. The reaction was studied under different acidity conditions (pH 3 and pH 5.5) and different temperatures (30°C, 40°C and 50°C) in the order to simulate the conditions of the digestive system of the chickens up to the intestine.

In the region between 920nm and 990nm changes of the -OH was observed and in the region between 490nm and 685nm, for the presence of the dye of one of the study gums, changes were observed. It shows the appearance of new oligosaccharides.

It was possible to confirm by analyzing the main components and by analyzing the factor, that the reaction takes place in an average of 7 different chemistry situations; which vary in time depending on the temperature and pH of the medium.

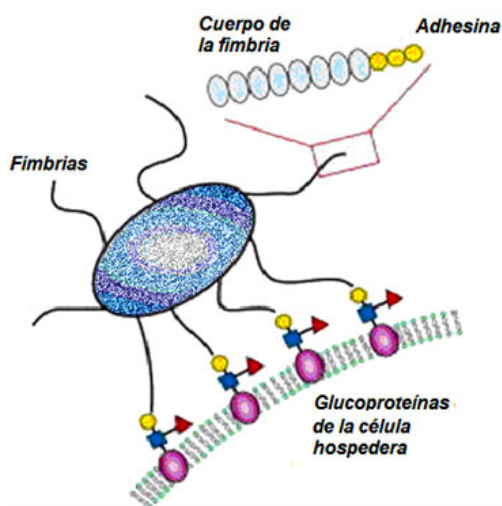
## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	4
2. OBJETIVOS.....	6
3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	6
3.1. Gomas vegetales.....	6
3.2. La reacción en estudio: degradación enzimática de gomas naturales.....	7
3.3. Espectroscopia Molecular: Ultravioleta-Visible-Infrarrojo cercano (UV-Vis-NIR).....	7
3.4. Análisis quimiométrico de datos espectrales.....	8
3.4.1. Pretratamiento de datos espectrales.....	9
3.4.2. Análisis de componentes principales (PCA) .....	9
3.4.3. Análisis de factores emergentes ( <i>Evolving Factor Analysis, (EFA)</i> ).....	11
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	12
4.1. Gomas y reactivos... ..	12
4.2. Casos en estudio.....	13
4.3. Procedimiento de análisis para la monitorización de las reacciones en estudio....	14
4.3.1. Preparación de los reactivos.....	14
4.3.2. Monitorización de la reacción mediante UV-Vis-NIR.....	15
4.3.3. Adquisición de espectros y software empleado.....	15
4.4. Matrices de datos obtenidas.....	17
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
5.1. Análisis espectral.....	17
5.1.1. Análisis espectral de los casos estudiados variando la temperatura.....	17
5.1.2. Análisis espectral de los casos estudiados variando el pH.....	22
5.2. Análisis quimiométrico de las matrices espectrales de la degradación enzimática	25
5.2.1. Análisis quimiométrico de los casos estudiados variando la temperatura...	26
5.2.2. Análisis quimiométrico de los casos estudiados variando el pH.....	30
6. CONCLUSIONES.....	32
7. AGRADECIMIENTOS.....	33
8. BIBLIOGRAFIA.....	34

## 1. INTRODUCCIÓN

Desde la década de los cincuenta, la adición de antibióticos como promotores de crecimiento y control de enfermedades al pienso de los animales ha sido una práctica habitual. A finales de los sesenta se empezó a conocer el riesgo de que esta práctica generase resistencia antibiótica en los animales, y ya en el 1970, la Comunidad Europea (entonces Comunidad Económica Europea), publicó la Directiva 70/524 donde se empezó a regular el uso de aditivos en la alimentación animal; directiva que se ha modificado más de un centenar de veces hasta la actualidad. Finalmente en el 2003, a causa del riesgo a que se desarrollase resistencia a los antibióticos, la Unión Europea prohibió el uso de promotores de crecimiento antibiótico en la alimentación animal (Reglamento [CE] nº 1831/2003) (1). Como consecuencia fue necesario buscar nuevas alternativas para el crecimiento y control de enfermedades.

Una de las enfermedades que se controlaban mediante antibióticos era la salmonelosis, causada por la bacteria *Salmonella*. Esta bacteria se contagia principalmente por vía oral y se adhiere a la pared intestinal como paso previo a la infección. En su estructura contiene fimbrias, apéndices anclados a la membrana externa de la bacteria, que contienen adhesinas, proteínas encargadas de reconocer a un receptor con gran especificidad como son las manosas, ubicadas en la superficie celular de la pared intestinal (2), Fig. 1.1.

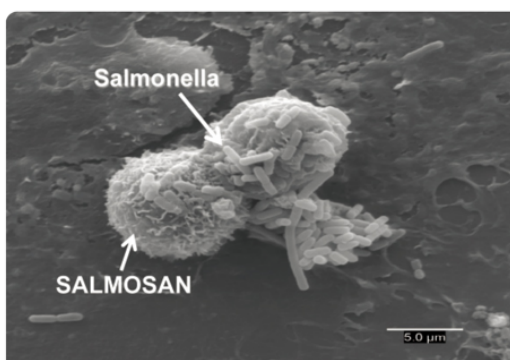


**Fig. 1.1** Adhesión de una bacteria a la célula hospedera (3).

Por tanto cuando se ingieren compuestos que contienen manosas habrá una competencia en la adhesión de la bacteria entre dicho compuesto y las manosas presentes en la pared intestinal. En esta competencia se basa una de las alternativas para combatir el problema de la salmonelosis en los animales.

En la actualidad para la prevención de la salmonelosis se añade en el pienso animal un aditivo que contiene  $\beta$ -galactomananos presentes en las gomas vegetales naturales (fuente rica de manosas), la enzima  $\beta$ -mananasa y dispersantes. Un ejemplo es el denominado SALMOSAN, Fig. 1.2. Vila y col., 2012 estudiaron que los  $\beta$ -galactomananos evitan la instalación de la bacteria en el sistema digestivo (4).

En la bibliografía (5,6) se referencia que los compuestos activos que bloquean la *Salmonella* son los oligosacáridos formados por la hidrólisis de los  $\beta$ -galactomananos mediante la enzima  $\beta$ -mananasa.



**Fig. 1.2.** Microscopía electrónica de SALMOSAN aglutinando la bacteria *Salmonella* en el tejido intestinal de pollo (5).

No obstante, no se conoce el tiempo que transcurre desde su ingesta hasta que empiezan a liberarse, ni en qué parte del intestino ocurre esto, ni tampoco el tipo de oligosacárido presente en cada punto del aparato digestivo.

El conocimiento estricto de los aspectos indicados requeriría la monitorización de la reacción en condiciones representativas del proceso que tiene lugar en el aparato digestivo de los animales para el análisis de los compuestos que se liberan.

Como una primera aproximación en el presente trabajo se pretende establecer una metodología analítica basada en el seguimiento de la reacción mediante espectroscopia UV-Vis-NIR y tratamiento quimiométrico de los datos espectrales a fin de determinar si la reacción transcurre en diferentes etapas y en qué tiempo se producen los cambios.

El estudio se llevó a cabo empleando como fuentes de  $\beta$ -galactomananos diferentes gomas vegetales, las cuales tienen diferente proporción manosa/galactosa en su estructura. Con objeto de analizar cómo puede afectar la temperatura a la reacción el estudio se ha realizado a tres valores en el intervalo de 30°C a 50°C. Dado que los aditivos se van a mover por diferentes condiciones de acidez a lo largo de su paso en el tracto digestivo, se analizó el efecto del pH en la reacción.

## 2. OBJETIVOS

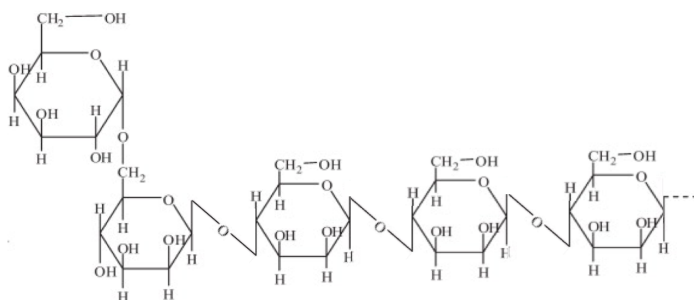
El objetivo general del presente trabajo es establecer una metodología de análisis basada en la espectroscopia UV-Vis-NIR y tratamiento quimiométrico de los datos obtenidos en la monitorización de la hidrólisis enzimática de los  $\beta$ -galactomananos para determinar si la reacción transcurre en diferentes etapas y el tiempo en que estas se producen. Este objetivo general conlleva los siguientes objetivos específicos:

- Analizar el efecto de la temperatura en la reacción estudiada.
- Analizar el efecto de la acidez.

## 3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 3.1. Gomas vegetales

Las gomas vegetales de estudio son fuentes de  $\beta$ -galactomananos, polisacáridos formados por hasta miles de unidades de manosas unidas por enlaces  $\beta$ -1,4 que contienen al menos un 5% de galactosa en la cadena principal y otros monosacáridos unidos a la cadena principal por enlaces  $\alpha$ -1,6 (7), Fig. 3.1.

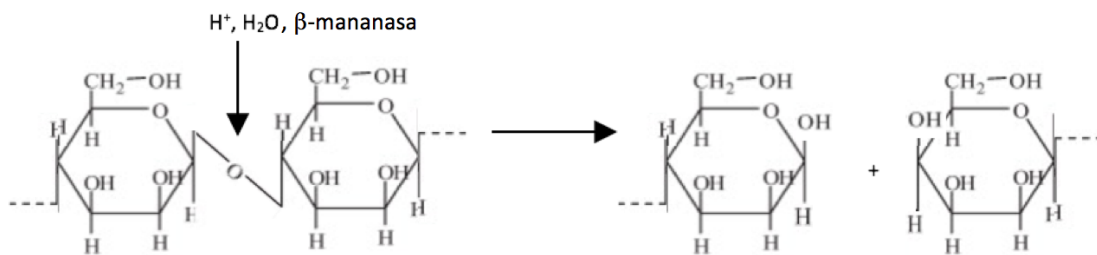


**Fig. 3.1.** Estructura general de los  $\beta$ -galactomananos (8).

Las gomas de estudio proceden del endospermo de las semillas de diversas leguminosas; el algarrobo y el guar. Difieren en las proporciones de los monosacáridos que forman su estructura, siendo de gran importancia la relación manosa/galactosa ya que está directamente relacionada con la capacidad de bloqueo de la *Salmonella* (4). Una de las gomas de estudio está coloreada.

### 3.2. La reacción en estudio: degradación enzimática de gomas naturales

En la revisión bibliográfica no se ha encontrado referenciado el mecanismo de degradación enzimática de los  $\beta$ -galactomananos con la  $\beta$ -mananasa. Como se ha indicado anteriormente, Vilà y colaboradores (4) citan que los agentes bloqueantes de las *Salmonella* son los oligosacáridos, por lo que cabe esperar que en la reacción se rompan los enlaces  $\beta$ -1,4 del  $\beta$ -galactomanano obteniendo como productos de la reacción los oligosacáridos, que a su vez pueden volver a ser hidrolizados por la enzima formando oligosacáridos de menor peso molecular, Fig. 3.2.



**Fig. 3.2.** Hidrólisis enzimática en medio ácido del  $\beta$ -galactomanano (8).

### 3.3. Espectroscopia Molecular: Ultravioleta-Visible-Infrarrojo cercano (UV-Vis-NIR)

En este apartado se presentan los conceptos teóricos de las técnicas instrumentales utilizadas en este trabajo: la espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis) y la espectroscopia del infrarrojo cercano (NIR).

La región espectral del UV-Vis se encuentra entre 160nm ( $62500\text{cm}^{-1}$ ) y 780nm ( $13000\text{cm}^{-1}$ ). Las bandas de absorción en esta región se asocian con las transiciones electrónicas en la capa de valencia. Los electrones involucrados en estas transiciones corresponden a aquellos más débilmente atraídos por el conjunto de núcleos atómicos que componen la

molécula y cuyos estados pueden ser descritos a través de orbitales moleculares que se expresan como combinaciones lineales de orbitales atómicos de la capa de valencia (10).

La absorción de radiación UV o Vis resulta por lo general de la excitación de los electrones de enlace; como consecuencia los picos de absorción pueden correlacionarse con los tipos de enlaces de las especies objeto de estudio. Cabe esperar que la goma coloreada que se analizará de señal en esta región debido a los grupos funcionales presentes en su estructura molecular, explicados en el apartado 5.1.1.

La región espectral del NIR se encuentra desde 780nm ( $13000\text{cm}^{-1}$ ) hasta los 2500nm ( $4000\text{cm}^{-1}$ ). En este trabajo se trabaja en la región de las longitudes de onda más cortas entre 780nm ( $13000\text{cm}^{-1}$ ) y 1100nm ( $9091\text{cm}^{-1}$ ). En esta zona el origen de las bandas de absorción se debe a los terceros sobretones de las vibraciones fundamentales del infrarrojo asociadas a los grupos funcionales C-H, N-H y O-H (10). Todos ellos presentes en los compuestos que intervienen en la reacción en estudio; las gomas vegetales, la enzima y los reactivos que se emplean para ajustar el medio de reacción como se verá en la sección 4.1.

Las medidas se han llevado a cabo por transmisión. En ambas zonas espectrales UV-Vis y NIR la intensidad de la absorción de las especies químicas que son activas en esta región espectral se relaciona con la concentración de dichas especies en la muestra que se analiza a través de la ley de Lambert Beer, Ec.3.1.

$$A = -\log(T) = I_T / I_0 = L \varepsilon C \quad \text{Ec. (3.1)}$$

Siendo A la absorbancia de la muestra, T la transmitancia,  $I_T$  la intensidad de radiación transmitida,  $I_0$  la intensidad de la radiación incidente, L la longitud de la cubeta,  $\varepsilon$  la absorptividad molar del compuesto y C su concentración en la muestra analizada.

### 3.4. Análisis quimiométrico de datos espectrales

La quimiometría es el área de la química que emplea un conjunto de métodos de origen matemático, estadístico y otros procedentes del campo de la lógica formal para conseguir transformar las señales analíticas y datos más o menos complejos en información química (11). En este apartado se describe de forma breve los fundamentos teóricos de las técnicas quimiométricas empleadas en este trabajo.

### 3.4.1. Pretratamiento de datos espectrales

- Ajuste de la línea base

Cuando se trabaja con un espectrofotómetro de un solo haz, como el empleado en el laboratorio, UV-Vis-NIR Cary 8453 UV-Vis, es habitual observar un desplazamiento vertical de los espectros cuando se realizan análisis sucesivos de la misma muestra. Este desplazamiento puede afectar de forma diferente en función de la longitud de onda considerada, ocasionando lo que se conoce como deriva instrumental en el espectro registrado (12). Ambos aspectos deben ser corregidos cuando se trata de monitorizar espectralmente una reacción química.

Aunque pueden ser muchos los algoritmos útiles para tal fin, en el presente trabajo se lleva a cabo la corrección del desplazamiento vertical considerando en cada espectro aquella longitud de onda para la cual el valor de absorbancia es el más bajo y restarle su valor a los valores de absorbancia obtenidos de cada longitud de onda. Este procedimiento se denomina “of set-correction”. Para la deriva espectral la línea base se ajusta a un polinomio de orden 2.

### 3.4.2. Análisis de componentes principales (PCA)

El PCA es un método de reducción de variables mediante el cual se sustituyen las variables originales por unas nuevas variables denominadas componentes principales y que son combinaciones lineales de las variables originales (13).

Cuando este método se aplica a los datos de una matriz **M** de dimensiones ( $n \times m$ ) siendo  $n$  en el conjunto de espectros registrados a lo largo de la reacción en estudio, y  $m$  el número de valores de absorbancia registrado en cada espectro, se calcula un número de componentes principales “ $i$ ” igual al menor valor entre  $n$  y  $m$  (14) y cuya expresión general es la indicada en la ecuación:

$$PC_i = a_{1i}A_{\cdot,1} + a_{2i}A_{\cdot,2} + \dots + a_{mi}A_{\cdot,m} \quad \text{Ec. (3.2)}$$

Siendo  $a_{1i}$ ,  $a_{2i}$ , ...,  $a_{mi}$  los valores de los coeficientes de los vectores propios que se derivan, de acuerdo a la descomposición de valores singulares (singular value decomposition, SVD) (14) de la ecuación:

$$\mathbf{M} = \mathbf{U}\mathbf{W}\mathbf{V}^T \quad \text{Ec. (3.3)}$$

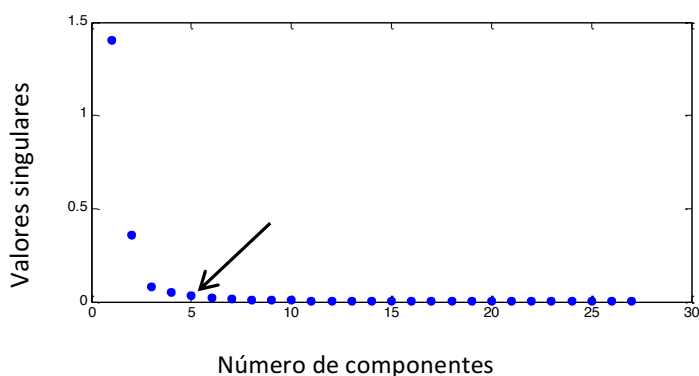
Siendo el producto de las matrices  $\mathbf{U}$  y  $\mathbf{W}$  equivalente a la matriz de scores y  $\mathbf{V}^T$  a la matriz de loadings.

Para una matriz de datos  $\mathbf{M}$  de dimensiones ( $n$ , número de espectros x  $m$ , número de valores de absorbancia en cada espectro) siendo  $n$  menor que  $m$ :

$$\mathbf{M}(n \times m) = \mathbf{U}(n \times n)\mathbf{W}(n \times n)\mathbf{V}^T(n \times m) \quad \text{Ec. (3.4)}$$

Los valores de la diagonal de la matriz  $\mathbf{W}$  son llamados valores singulares y corresponden a la raíz cuadrada de los valores propios ( $\lambda$ ). Cada valor propio, lleva asociado su vector propio.

Cuando los valores singulares se representan frente al número de componentes es posible extraer información acerca del número de factores o componentes que contienen información útil sobre el sistema en estudio. Aquellos factores que tengan asociado valores singulares bajos generalmente recogen información sobre el ruido asociado a las medidas experimentales (14). A modo de ejemplo en la Fig. 3.3 se muestra un gráfico representativo de este análisis.



**Fig. 3.3.** Descomposición del valor singular de una matriz de datos. La flecha indica el nombre de PC significativos.

El número de factores significativos sería aproximadamente igual al rango de la matriz, puesto que la reconstrucción de la matriz de datos a partir de éstos no ocasiona pérdida de información relevante. Cabe resaltar que en algunas ocasiones existen diferencias en la definición del rango matemáticamente exacto (que involucra el número de componentes que permite reconstruir el conjunto de datos sin residual), y el rango aproximado (también llamado rango químico cuando se analizan matrices de datos procedentes de respuestas experimentales correspondientes a un sistema químico) que corresponde al número de componentes significativos del conjunto de datos (15).

La importancia de la determinación del rango de la matriz radica en que se asume que el rango químico corresponde al número de especies químicas que ocasionan la variabilidad en la matriz de respuestas o bien al número de situaciones químicas distintas.

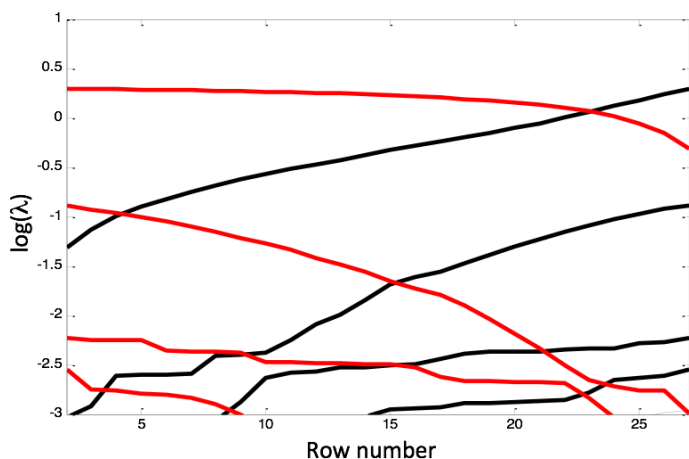
### 3.4.3. Análisis de factores emergentes (*Envolving Factor Analysis, (EFA)*)

Cuando el análisis de componentes principales se realiza en sistemas cuya respuesta varía a incrementos discretos de alguna variable controlada, en nuestro caso el tiempo de reacción, la evolución de los factores o componentes del sistema se puede expresar como función de dicha variable.

Uno de los métodos que permite estimar esta evolución es el análisis de factores emergentes (EFA) (16,17). La idea fundamental de EFA es analizar el cambio en el rango de la matriz de datos ya que un incremento del rango de la matriz será asociado a la aparición de una nueva situación química.

El proceso comienza aplicando la descomposición de los valores singulares a una submatriz que contiene solo las dos primeras filas de la matriz de datos inicial **M**. A continuación se agrega el tercer espectro de la matriz de datos a la submatriz inicial para calcular el número de factores que resultan al agregar una nueva fila. Este proceso se repite hasta completar el total de filas que componen la matriz de datos (en nuestro caso  $n$ ). Este mismo proceso se repite en la dirección contraria, es decir, partiendo de las dos últimas fila de la matriz de datos y yendo de abajo a arriba del conjunto de datos.

Combinando el análisis EFA hacia delante y hacia atrás es posible estimar la cantidad de componentes principales que contribuyen a la variabilidad de los datos experimentales. La Fig. 3.4 muestra un gráfico representativo de este método. Los valores propios (o, más frecuentemente, sus logaritmos decimales) calculados para cada submatriz se representa en función de la variable para la cual se estudia la evolución, en este caso del tiempo de reacción, obteniendo así el gráfico EFA (combinación del gráfico de EFA hacia adelante y EFA hacia detrás).



**Fig. 3.4.** Ejemplo de un gráfico EFA.

Los valores propios obtenidos para el primer PC de cada submatriz se unen con una línea, con el objeto de analizar correctamente su evolución, y lo mismo se realiza para los factores que siguen en jerarquía.

El análisis de factores emergentes (*Envolving Factor Analysis, (EFA)*) permite observar la variación de los factores a lo largo del proceso y estimar el número de componentes que contribuyen a la variabilidad de los datos experimentales. En este trabajo se ha utilizado para determinar el nombre de especies o situaciones químicas presentes en los diversos momentos durante el tiempo de reacción estudiado.

#### 4. PARTE EXPERIMENTAL

##### 4.1. Gomas y reactivos

En el presente trabajo se estudiaron 3 gomas naturales (garrofín, AZO-galactomanano y guar) extraídas de fuentes vegetales. La goma garrofín se extrae de las semillas del algarrobo *Duraio*, el AZO-galactomanano procede de las semillas del algarrobo *Royal* (y está teñido con un colorante llamado Remazol Brilliant Blue R), y la goma guar se extrae de las semillas de la planta *Cyamopsis tetragonoloba*. Como ya se ha comentado las diferentes gomas difieren en los porcentajes de monosacáridos que forman su estructura, Tabla 4.1. Para el trabajo con estas gomas vegetales no es necesario tomar ninguna precaución adicional debido a que no son tóxicas ni presentan ningún peligro de incendio ni explosión.

**Tabla 4.1.** Porcentaje de monosacáridos en las gomas de estudio.

Goma	Arabinosa (%)	Xilosa (%)	Manosa (%)	Galactosa (%)	Glucosa (%)	Man/Gal (%)
AZO-galactomanano	0,81	0,19	51,72	14,94	0,94	<b>3,46</b>
Garrofín	0,90	0,25	50,12	15,04	1,14	<b>3,33</b>
Guar	1,04	0,32	36,02	21,40	0,88	<b>1,68</b>

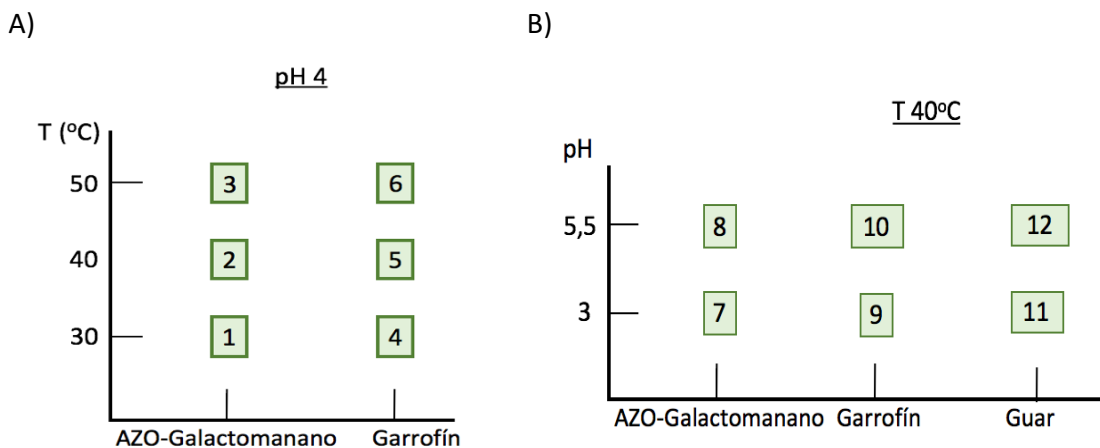
- Se trabaja con la enzima  $\beta$ -mananasa . Las gomas vegetales y la enzima, de igual modo que los datos de la tabla 4.1, fueron suministrados por el laboratorio del instituto de investigación y tecnología agroalimentaria (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentària, IRTA) de Reus.

Para llevar a cabo el análisis experimental se utilizó ácido acético y hidróxido sódico, los cuales se ha de manipular con bata, gafas y guantes. Ambos son reactivos analíticos de la casa Sharlab S.L. de pureza 99,8 y 98% respectivamente.

#### 4.2. Casos en estudio

La Fig. 4.1 recoge de forma esquemática los experimentos llevados a cabo para evaluar la capacidad de monitorizar estas reacciones mediante UV-Vis-NIR y tratamiento quimiométrico y estudiar el efecto de la temperatura y del pH en la reacción.

A pH 4 y tres valores de temperatura: 30°C, 40°C y 50°C; Fig. 4.1A, se realizaron 6 experimentos empleando como fuente de  $\beta$ -galactomanano las gomas AZO-galactomanano, que es coloreada, y la goma de garrofín, que es incolora. Una vez constatado que esta metodología es útil para seguir los cambios que se producen en esta reacción y con la finalidad de evaluar el efecto de la acidez, se llevaron a cabo nuevamente 6 experimentos, 3 a pH=5,5 representativo de las condiciones de acidez del buche y del intestino de los pollos y otros 3 a pH=3, representativo de las condiciones de acidez del la molleja (18). De esta forma se estudia el efecto de la acidez en que se encuentra el aditivo por el sistema digestivo hasta llegar al intestino. En este caso se estudiaron las gomas ya mencionadas y la goma guar, Fig. 4.1B.



**Fig. 4.1.** Casos estudiados variando la temperatura (Fig. 4.1A) y la acidez (Fig. 4.1B).

#### 4.3. Procedimiento de análisis para la monitorización de las reacciones en estudio

La reacción entre el  $\beta$ -galactomanano y la enzima se llevó a cabo siguiendo una modificación del protocolo establecido en el ensayo S-ACGLM (19) y que se detalla a continuación.

##### 4.3.1. Preparación de los reactivos

- Preparación de la  $\beta$ -mananasa

0,2mL del reactivo de la enzima se diluyeron en 10mL de una solución amortiguadora de acetato de sodio 2 M.

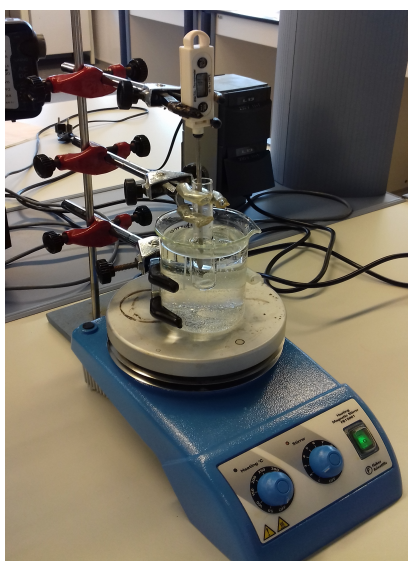
- Preparación del  $\beta$ -galactomanano

0,2g de  $\beta$ -galactomanano se disolvieron en 9mL de agua destilada a 90°C y se agitó vigorosamente durante 10min. A continuación se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadió 1mL de solución amortiguadora de acetato de sodio 2M. En los estudios realizados con el AZO-galactomanano se filtró la solución con un Buchner antes de añadir la solución amortiguadora. Las soluciones preparadas son estables durante 12 meses a 4°C.

Para la reacción se mezclaron volúmenes iguales de ambos reactivos. En nuestro caso se emplearon 3mL de cada reactivo.

#### 4.3.2. Monitorización de la reacción mediante UV-Vis-NIR

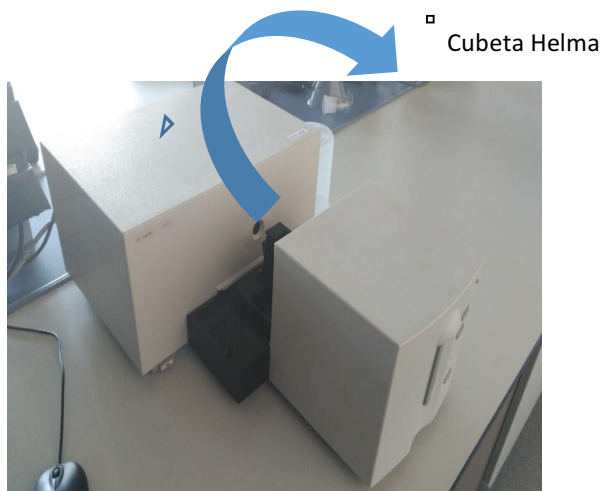
Para monitorizar la reacción de estudio se colocaron en tubos de ensayo los reactivos preparados que fueron sumergidos en un baño de agua, la cual se calentó utilizando una placa calefactora con agitador magnético FB15001 de la casa Fisher Scientific con un intervalo de temperatura entre 0°C y 370°C. La temperatura del baño fue controlada mediante una sonda con un intervalo de temperatura entre 50°C y 280°C. En el tubo de ensayo que contenía la mezcla se introdujo un imán para favorecer la mezcla. La Fig. 4.2 muestra el material empleado.



**Fig. 4.2.** Material empleado para el control de la temperatura.

#### 4.3.3. Adquisición de espectros y software empleado

Se trabajó en un espectrofotómetro Cary 8453 UV-Vis de la casa Agilent, Fig. 4.3. Para realizar la medida, el cero del instrumento (100% de transmitancia) se realizó empleando agua destilada. Los espectros se registraron entre 400nm y 1100nm con un intervalo de medida de 1nm.



**Fig. 4.3.** Espectrofotómetro Cary 8453 UV-Vis (Casa: Agilent).

Para la monitorización de la reacción, se extrajo con una micropipeta Pasteur la cantidad de muestra necesaria para llenar la celda (cubeta Helma) del espectrofotómetro y se realizó la medida. El tiempo transcurrido en la manipulación de la muestra y el registro del espectro no es superior a 60 segundos. Una vez registrado la muestra se vierte en el tubo original hasta la siguiente medida.

Para las condiciones indicadas en el apartado 4.2. se registraron un total de 27 espectros entre el momento en que se inicia la mezcla de la  $\beta$ -mananasa y el  $\beta$ -galactomanano hasta las 3h de la reacción. La Tabla 4.2 describe de forma detallada el número de espectros que se recogieron en función del tiempo.

**Tabla 4.2.** Intervalo de medidas de la reacción de estudio.

Tiempo entre espectros (min)	Tiempo de medida (min)	Espectros obtenidos
1	0-5	6
5	10-60	11
10	70-120	6
15	135-180	4
TOTAL	180	27

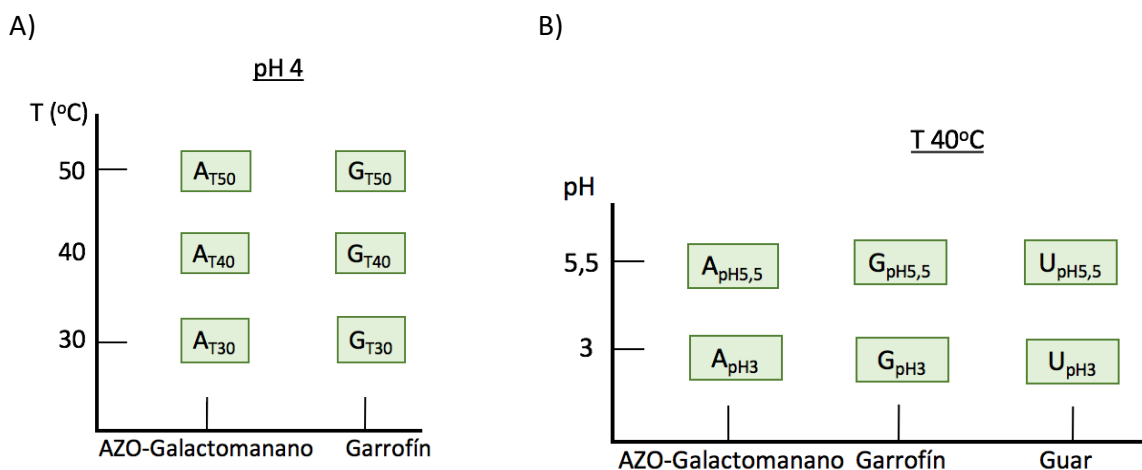
Todos los espectros obtenidos se guardaron en el software 8453UV-VISIBLE ONLINE en formato .SD y se exportaron como archivos .CSV, compatibles con formato MATLAB. Estos archivos se trataron en Excel para poder crear la matriz de datos en MATLAB.

Todos los tratamientos quimiométricos realizados se llevaron a cabo mediante subrutinas de MATLAB.

#### 4.4. Matrices de datos obtenidas

En cada una de las 12 primeras condiciones experimentales mostradas en las Fig. 4.1A y Fig. 4.1B, se registraron un total de 27 espectros. Cada espectro contiene 701 valores de absorbancia asociados a las longitudes de onda registradas. Para facilitar la exposición en las Fig. 4.4A y 4.4B se representa el nombre de cada matriz de datos representativo de las condiciones de cada experimento.

Cada matriz es identificada por la denominación dada a la goma y el valor del factor que se analiza en los experimentos de las Fig. 4.1A y Fig. 4.1B respectivamente. El AZO-galactomanano se identificó como A, la goma de garrofín se identificó como G y la goma guar como U.



**Fig. 4.4.** Matrices de datos espectrales de la reacción variando la temperatura (Fig. 4.4A) y variando el pH (Fig. 4.4B).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

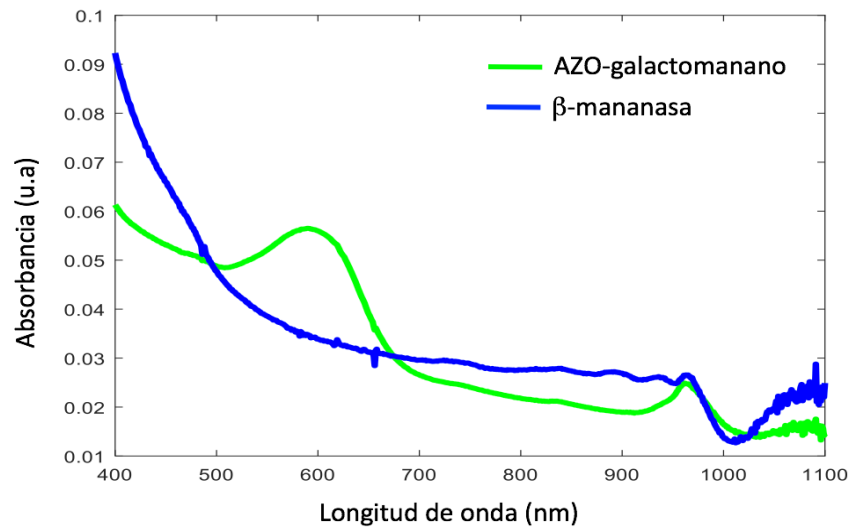
### 5.1. Análisis espectral

#### 5.1.1. Análisis espectral de los casos estudiados variando la temperatura

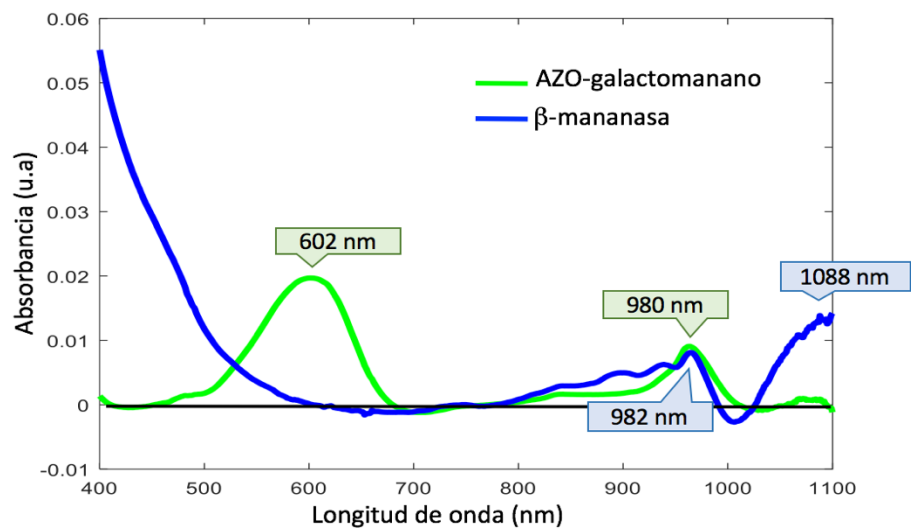
En las Fig. 5.1A, 5.1BA y 5.1C se muestran a modo de ejemplo los espectros originales y pretratados del AZO-galactomanano (coloreado) y la  $\beta$ -mananasa; y el espectro pretratado

de la goma de garrofín (incoloro) y la  $\beta$ -mananasa a pH 4 y 40°C en el intervalo de trabajo de 400nm a 1100nm.

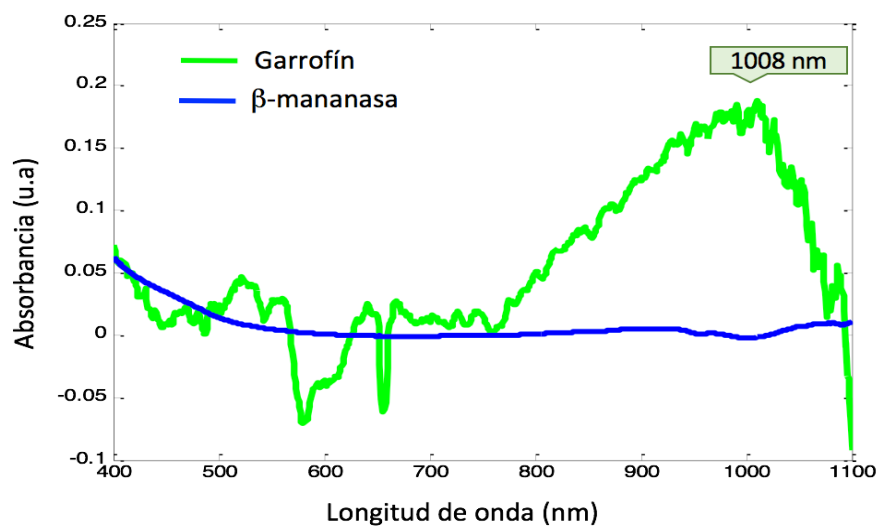
A)



B)

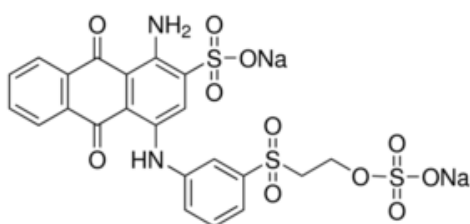


C)



**Fig. 5.1.** Espectro del AZO-galactomanano y la  $\beta$ -mananasa sin pretractar (Fig. 5.1A) y pretratado (Fig. 5.1B) y la goma de garrofín y la  $\beta$ -mananasa pretratado (Fig. 5.1C) a 40°C y pH 4.

La goma AZO-galactomanano está teñida con el colorante Remazol Brilliant Blue R y como cabía esperar teniendo en cuenta su estructura molecular, Fig. 5.2, aparece en la región visible del espectro entre 490nm y 685nm la banda de absorción característica del colorante, con su máximo de absorción en 602nm (20). Este cromóforo absorbe en la región UV-Vis debido a la presencia de enlaces  $\pi$  conjugados y heteroátomos con pares de electrones no compartidos (O, N) en su estructura.

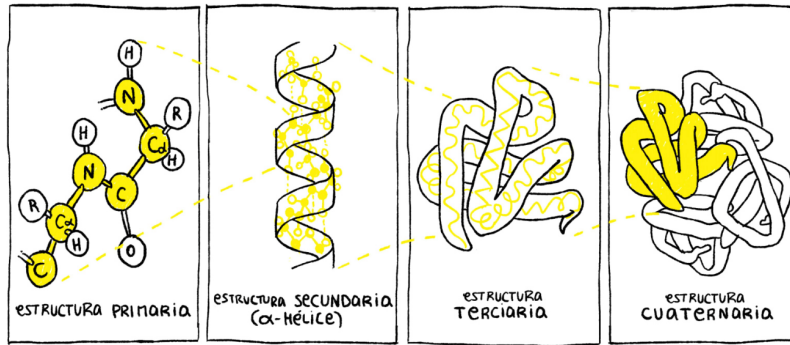


**Fig. 5.2.** Estructura del Remazol Brilliant Blue R (20).

También aparece una banda de absorción en la región de las longitudes de onda más cortas del infrarrojo cercano entre 920nm y 990nm con su máximo en 980nm, asociada a los terceros sobretonos del grupo funcional -OH presente en todos los reactivos; (CH<sub>3</sub>-COOH), H<sub>2</sub>O y el propio  $\beta$ -galatomanano, Fig. 3.1. En negro se ha marcado una línea en el cero para poder ver claramente dicha banda.

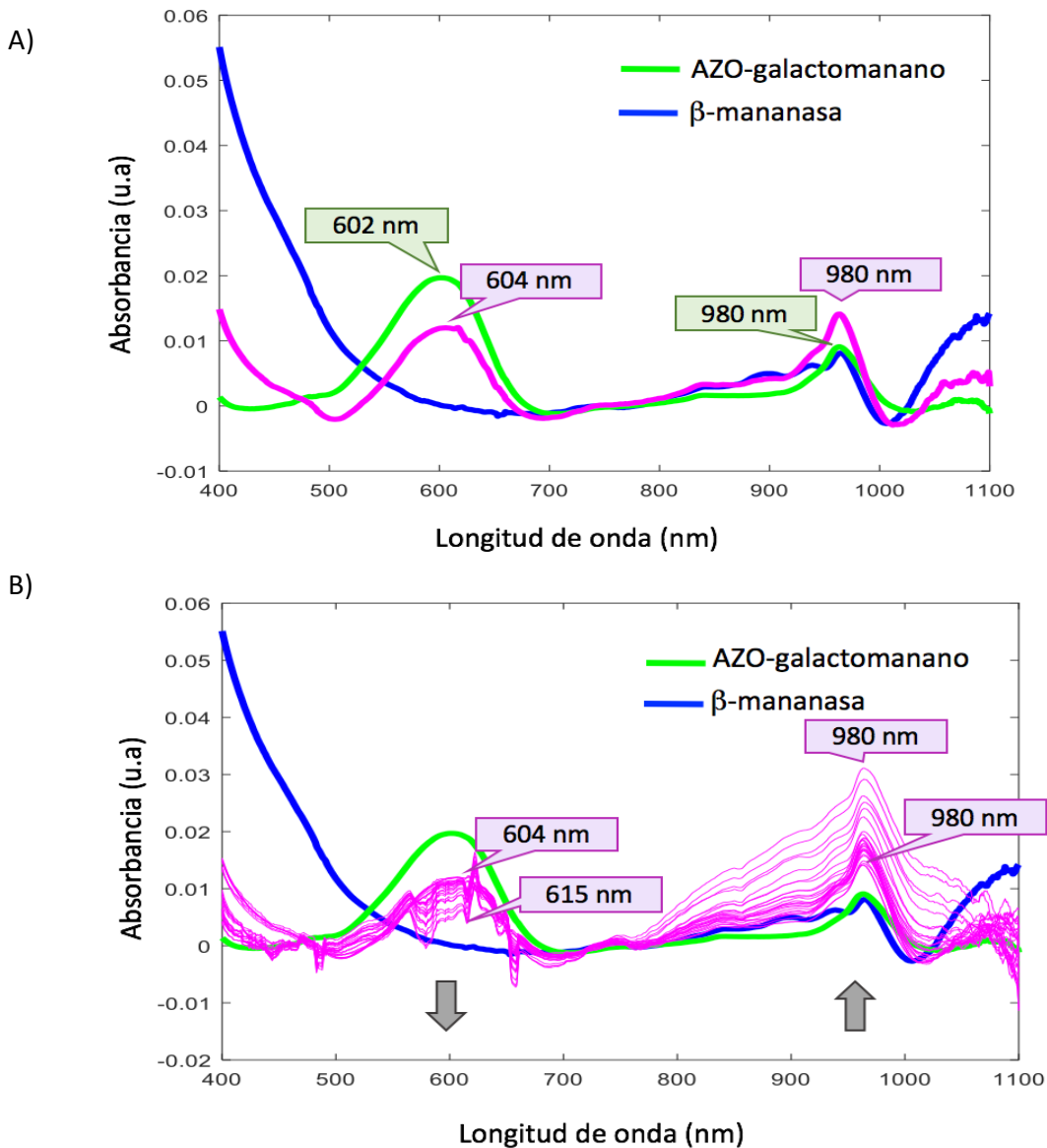
La goma de garrofín, que es incolora, solamente presenta las bandas de absorción asociadas a los grupos -OH ya comentados.

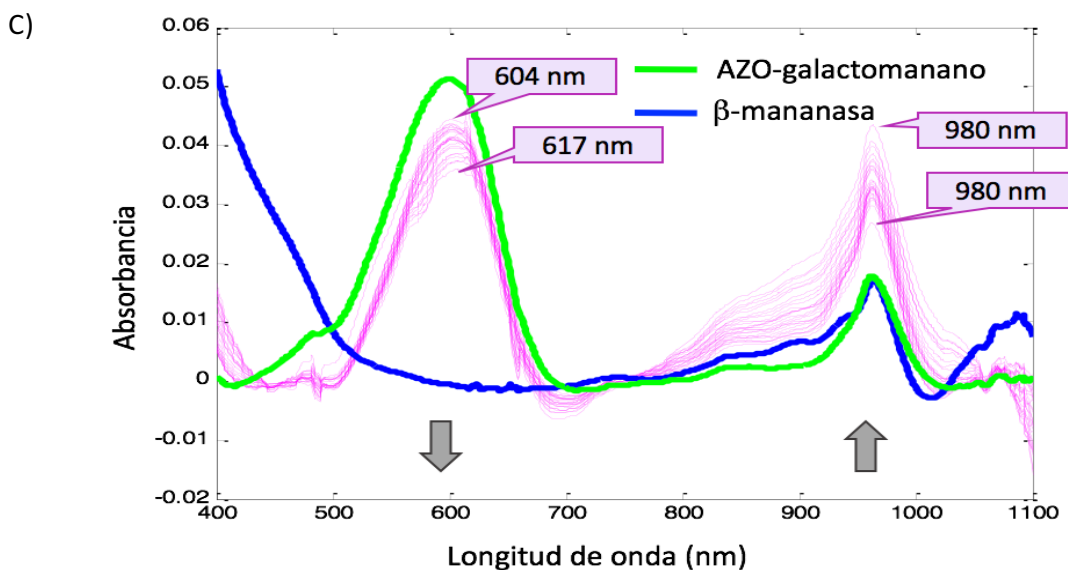
En el espectro de la  $\beta$ -mananasa se observa una banda de absorción con un máximo a 982nm asociadas a los -OH y se perfila una banda entre 1010nm y 1100nm con su máximo en 1088nm característica del grupo funcional -NH presente en su estructura, Fig. 5.3



**Fig. 5.3.** Estructura general de una enzima (21).

Por tal de analizar el efecto de la temperatura de forma clara se muestran los cambios espectrales observados en la reacción con la  $\beta$ -mananasa y la goma AZO-galactomanano a las temperaturas de  $40^{\circ}\text{C}$  (Fig. 5.4B) y  $50^{\circ}\text{C}$  (Fig 5.4C), experimentos 2 y 3 de la Fig. 4.1A. Los cambios son representativos a los observados en la goma garrofin.





**Fig. 5.4.** Espectros de los reactivos AZO-galactomanano y  $\beta$ -mananasa puros junto con la mezcla a pH 4, 40°C y tiempo cero y (Fig. 5.4A); a pH 4, 40°C y a los 27 tiempos de estudio (Fig 5.4B); y pH 4, 50°C y a los 27 tiempos de estudio (Fig. 5.4C).

En la Fig. 5.4A se puede observar como la banda de absorción a 580nm representativa del colorante ha disminuido ligeramente a tiempo cero de la mezcla y se ha desplazado hacia longitudes de onda ligeramente mayores, desplazamiento batocrómico. Los cambios de la banda de absorción a 980nm atribuida a los -OH no parecen apreciables, sin embargo ya no se observa el máximo de la banda a 1050nm de los -NH de la enzima. Una explicación de estos cambios requeriría conocer cómo interacciona la enzima con el  $\beta$ -galactomanano. El hecho de que desaparezca la banda del -NH induce a pensar en que este pueda ser un punto de interacción de la enzima con los  $\beta$ -galactomananos.

En la Fig. 5.4B se muestra el conjunto de los 27 espectros registrados en el transcurso de la reacción (contenido en la matriz de datos  $A_{T30}$  de la Fig. 4.4A). Se acentúa el comportamiento comentado de la banda a 580nm y se observa claramente que aumenta la intensidad de la banda a 980nm atribuida a los grupos -OH. Este comportamiento es congruente con lo que cabe esperar de un proceso de hidrólisis de un polisacárido en el cual se forman nuevas unidades de oligosacáridos, todos ellos con nuevos grupos funcionales -OH en los extremos donde se produce la hidrólisis, Fig. 3.2.

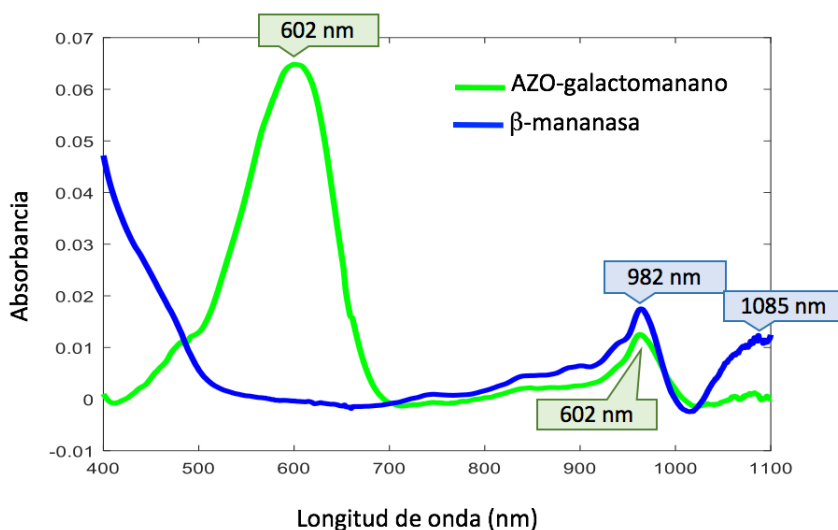
La disminución del valor de la banda característica del colorante, banda de absorción entre 510nm y 690nm, puede ser atribuida al cambio en el valor de la absorptividad molar de esta sustancia en función del tipo de oligosacárido presente en la reacción.

Cuando se monitorizó esta misma reacción a temperatura mayor, experimento 3 de la Fig. 4.1A; y temperatura menor, experimento 1 de la Fig. 4.1A, no se observaron evoluciones espectrales diferentes de las ya comentadas. Pero sí que desde el inicio los cambios en la banda de los -OH eran ligeramente más apreciables a mayor temperatura. A modo de ejemplo en la Fig. 5.4C se incluyen los espectros de los reactivos junto con el experimento realizado a 50°C. Comparando estos espectros con los mostrados en la Fig. 5.2A se observan cómo desde el inicio las variaciones de las bandas son ligeramente mayores.

Cabe pensar que el distinto perfil de las bandas entre 750nm y 1050nm características de los enlaces -OH entre los espectros puede estar relacionada con la cinética de la reacción que depende de las temperaturas de trabajo.

### 5.1.2. Análisis espectral de los casos estudiados variando el pH

A modo de ejemplo la Fig. 5.5 muestra el espectros del AZO-galactomanano (coloreado) y la  $\beta$ -mananasa a 40°C y pH 3; caso de estudio 7 de la Fig. 3.4B.

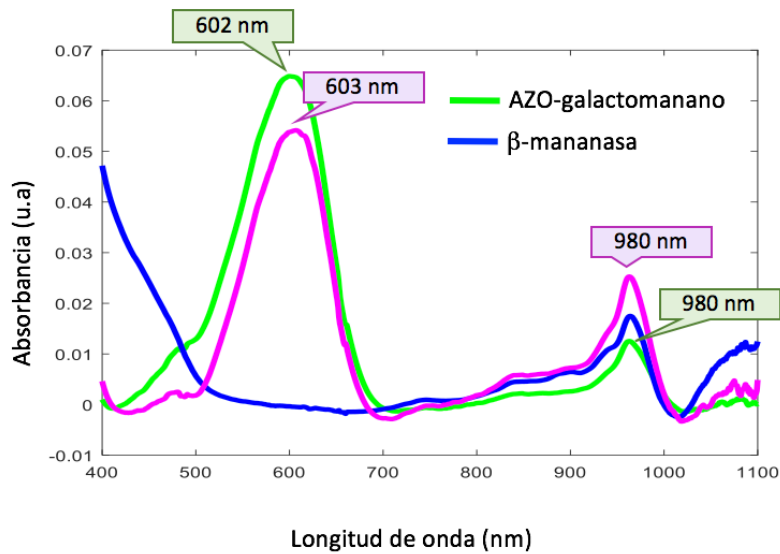


**Fig. 5.5.** Espectros del AZO-galactomanano y la  $\beta$ -mananasa a 40°C y pH 3.

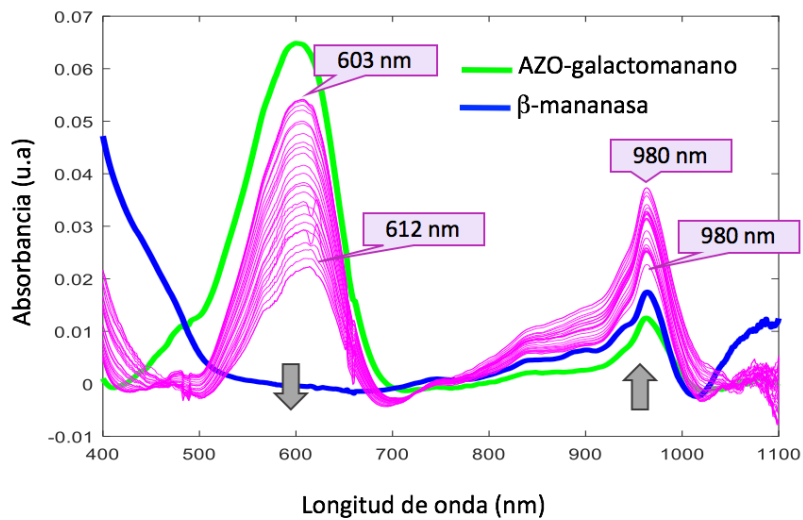
Las bandas características observadas no difieren de las ya comentadas en el apartado anterior.

Para evaluar el efecto del pH en la reacción, a modo de ejemplo en las Fig. 5.6 se muestra la evolución de la reacción del AZO-galactomanano con la  $\beta$ -mananasa a una temperatura constante de 40°C y variando el pH; a **pH 3** (Fig. 5.6B) y **pH 5,5** (Fig. 5.6D). Con el objetivo de ver de forma clara la evolución de las bandas se muestran los espectros de los reactivos puros y a tiempo cero de la mezcla a las mismas condiciones; siendo la Fig. 5.6A a pH 3 y la Fig. 5.6C a pH 5,5. Dichos valores de acidez son representativos del sistema digestivo de los pollos desde el buche hasta el intestino.

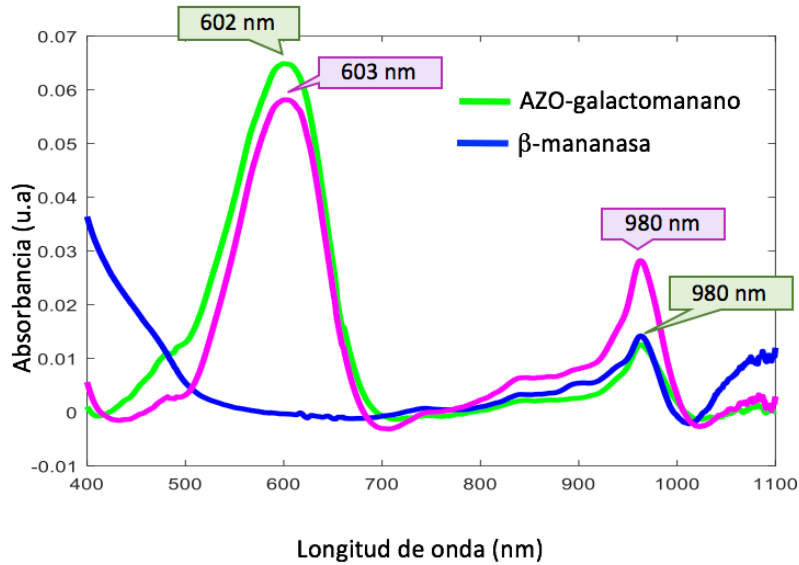
A)



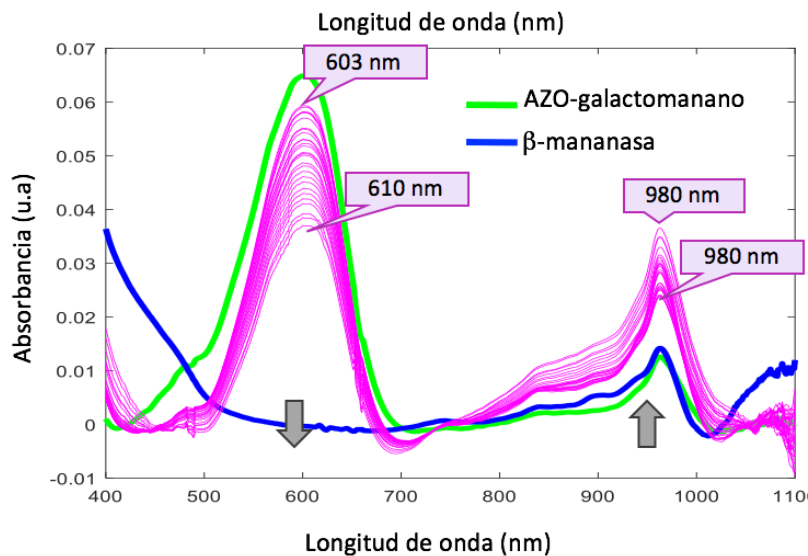
B)



C)



D)



**Fig. 5.6.** Espectros recogidos de la matriz de datos  $A_{pH3}$  de la Fig. 4.4B a tiempo cero de la mezcla (Fig. 5.6A) y a todos los tiempos de estudio (Fig. 5.6B); y espectros recogidos de la matriz de datos  $A_{pH5,5}$  de la Fig. 4.4B a tiempo cero de la mezcla (Fig. 5.6C) y a todos los tiempos de estudio (Fig. 5.6D).

En la Fig. 5.6A se observan las bandas características de los reactivos y la mezcla a tiempo cero, las cuales ya han sido justificadas en el apartado 5.1.1. De igual modo los cambios observados con el tiempo son comparables a los producidos en el apartado anterior.

Haciendo una comparativa de los espectros obtenidos del AZO-galactomanano con la  $\beta$ -mananasa a  $40^\circ\text{C}$  y los diferentes pH no se observa en ningún caso evoluciones espectrales diferentes a las ya comentadas. No obstante, se aprecia como a un mayor pH, desde el inicio, la banda de absorción correspondiente al grupo funcional  $-\text{OH}$  es sutilmente mayor. Este hecho se puede ver al comparar la Fig. 5.6A, correspondiente a un pH 3, con la Fig. 5.6C,

correspondiente a un pH 5; donde la banda de los –OH ha aumentado más respecto al  $\beta$ -galactomanano puro. Estos cambios producidos en el perfil de la banda de los -OH inducen a pensar que a mayor pH se obtienen cinéticas de reacción mayores.

## 5.2. Análisis quimiométrico de las matrices espectrales de la degradación enzimática

En el análisis previo se ha realizado un análisis individualizado de la evolución de las bandas características. La aplicación de las técnicas de análisis del factor (análisis de componentes principales y análisis de los factores emergentes) nos permite un análisis conjunto de la evolución del espectro a fin de determinar cuántas etapas hay involucradas en la reacción de estudio y cuándo se producen. Los resultados se discuten a continuación.

Las tablas 5.1A y 5.1B muestran los valores de los cinco primeros valores propios ( $\lambda$ ) y el porcentaje de varianza explicada por cada factor calculados mediante “singular value decomposition” (SVD), introducida en la sección 3.4.3, de las matrices espectrales recogidas en las figuras 4.4A y 4.4B, respectivamente.

**Tabla 5.1A.** Valores de los 5 primeros valores propios, y (% de varianza explicada); obtenidos mediante SVD de las matrices de datos espectrales recogidos a las diferentes temperaturas.

Matriz de datos	$\lambda_1$ (% varianza explicada)	$\lambda_2$ (% varianza explicada)	$\lambda_3$ (% varianza explicada)	$\lambda_4$ (% varianza explicada)	$\lambda_5$ (% varianza explicada)
$A_{T30}$	1,404 (97,65%)	0,360 (1,23%)	0,077 (0,64%)	0,053 (0,25%)	0,033 (0,11%)
$A_{T40}$	0,894 (82,70%)	0,271 (10,75%)	0,118 (3,91%)	0,068 (0,91%)	0,036 (0,63%)
$A_{T50}$	2,183 (91,05%)	0,293 (5,13%)	0,070 (1,21%)	0,034 (1,15%)	0,031 (0,53%)
$G_{T30}$	4,587 (96,74%)	2,826 (2,90%)	0,223 (0,15%)	0,077 (0,07%)	0,067 (0,05%)
$G_{T40}$	5,948 (95,21%)	3,288 (4,31%)	0,284 (0,25%)	0,187 (0,08%)	0,100 (0,04%)
$G_{T50}$	10,418 (96,56%)	0,325 (1,53%)	0,100 (0,58%)	0,073 (0,29%)	0,054 (0,17%)

**Tabla 5.1B.** Valores de los 5 primeros valores propios, y (% de varianza explicada); obtenidos mediante SVD de las matrices de datos recogidas a diferentes pH.

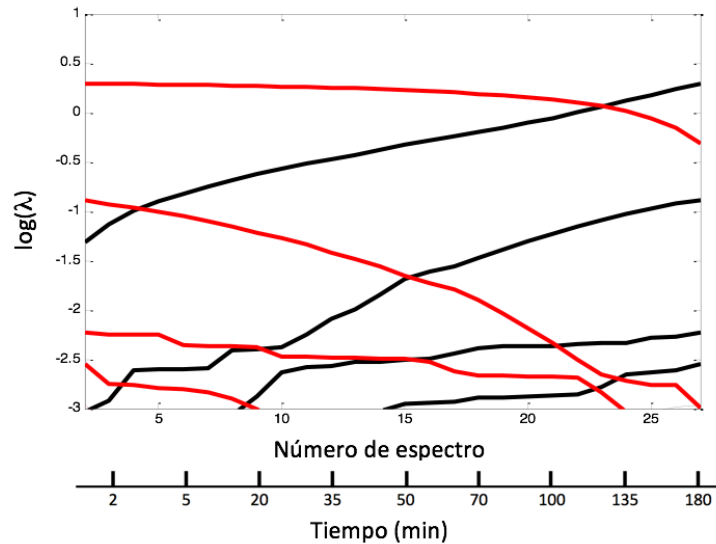
Matriz de datos	$\lambda_1$ (% varianza explicada)	$\lambda_2$ (% varianza explicada)	$\lambda_3$ (% varianza explicada)	$\lambda_4$ (% varianza explicada)	$\lambda_5$ (% varianza explicada)
$A_{pH3}$	2,040 (98,62%)	0,472 (0,50%)	0,040 (0,35%)	0,032 (0,29%)	0,018 (0,07%)
$A_{pH5,5}$	2,440 (92,46%)	0,296 (6,63%)	0,054 (0,37%)	0,018 (0,14%)	0,014 (0,11%)
$G_{pH3}$	6,825 (84,31%)	0,773 (14,68%)	0,286 (0,59%)	0,136 (0,11%)	0,061 (0,09%)
$G_{pH5,5}$	7,780 (82,53%)	0,580 (9,49%)	0,263 (4,02%)	0,158 (1,13%)	0,103 (0,60%)
$U_{pH3}$	5,610 (86,38%)	0,918 (11,65%)	0,147 (1,25%)	0,051 (0,23%)	0,044 (0,17%)
$U_{pH5,5}$	7,982 (97,92%)	0,587 (0,91%)	0,185 (0,65%)	0,123 (0,17%)	0,080 (0,09%)

En todos los casos, en los cinco primeros componentes siempre hay un porcentaje de varianza no inferior al 97,77% y aunque se pueden aplicar criterios estadísticos para determinar cuántos de estos valores propios son significativos, se puede observar que el número del factor a partir del cual no se observan grandes variaciones en su valor varía en función de las condiciones experimentales en cada matriz. Su evolución a lo largo del tiempo de reacción se puede analizar a partir de los gráficos EFA que se discuten a continuación.

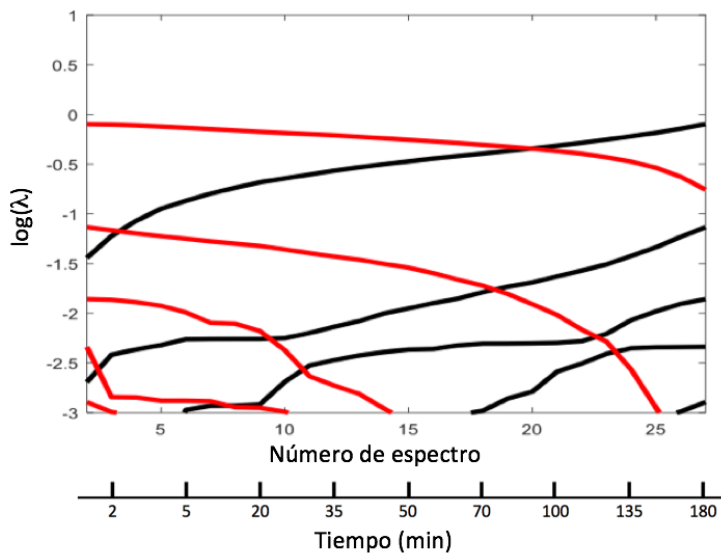
### 5.2.1. Análisis quimiométrico de los casos estudiados variando la temperatura

La Fig. 5.7 muestra la evolución del valor del logaritmo de los valores singulares en función del número de espectros del AZO-galactomanano con la  $\beta$ -mananasa a **30°C** y **40°C** respectivamente. Dado que existe una relación entre el número de espectros de la matriz y el tiempo de reacción, se introduce este parámetro para su discusión.

A)



B)



**Fig. 5.7.** Resultado del análisis EFA de la matriz de datos  $A_{T30}$  recogida en la Fig. 4.4A (Fig. 5.7A) y la matriz de datos  $A_{T40}$  (Fig. 5.7B).

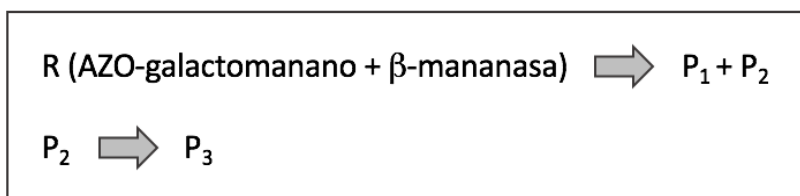
Se ha considerado como valor umbral de  $\log(\lambda) = -3$ , representativo del ruido. Dicho valor se ha sacado de hacer la medida de un espectro de una goma durante 180min siguiendo el mismo procedimiento que para la reacción (estos datos no son mostrados en el trabajo).

Se observa desde el tiempo inicial (primeros dos espectros), que para explicar la variabilidad de los datos analizados es necesario considerar dos factores. En el tiempo estudiado, 180min, emergen un total de 4 factores en la reacción a 30°C (Fig. 5.7A), y un total de 5 factores en el estudio a 40°C (Fig. 5.7B). Además, se observa como los tiempos a los que emergen los nuevos factores son menores cuanto mayor es la temperatura de trabajo. A

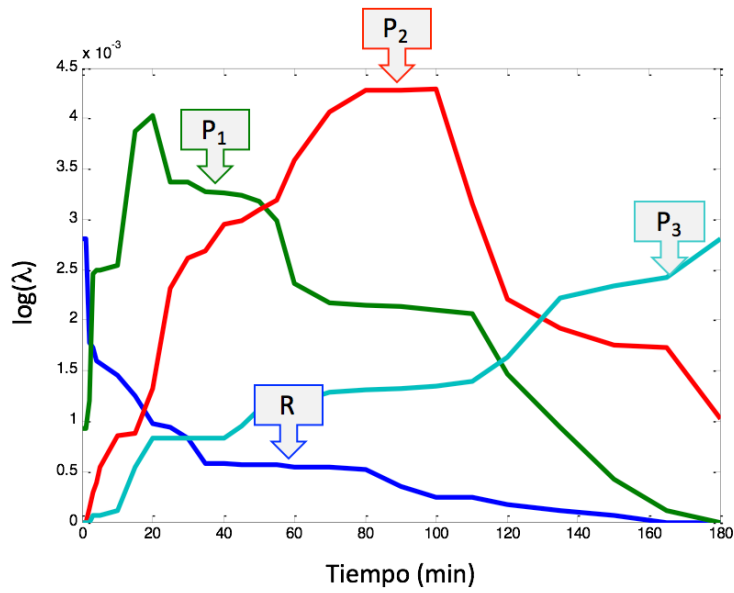
modo de ejemplo, se observa como en el inicio de la reacción a 30°C y 40°C, ambas se pueden explicar con dos factores, y a partir de los 15min (correspondiente al número de espectro 8) en la reacción a 30°C y a los 5min (correspondiente al número de espectro 6) en la reacción a 40°C, aparece otra fuente de variabilidad.

En el caso en el que los datos (espectros) que se analizan proceden de la monitorización de una reacción química, el número de factores se puede relacionar con el número de situaciones químicas diferentes presentes (22) o con el número de especies químicas activas. El hecho de que este número varíe a lo largo de la reacción indica que la hidrólisis de los  $\beta$ -galactomananos transcurre de forma secuencial a través de un conjunto de reacciones simultáneas.

La Fig. 5.8 es una representación de los valores de cada espectro en los componentes que se calculan a lo largo del tiempo y mostrados en la Fig. 5.9A. Estos perfiles pueden ser considerados como una primera estima de los perfiles de concentración de las especies químicas que contribuyen a la variación experimental de los datos. El perfil etiquetado como R es típico de la evolución de un reactivo, mientras que los etiquetados como P1, P2 y P3 representarían diferentes productos, finales o intermedios de reacción, que se forman a diferentes tiempos. Una posibilidad acerca del camino por el que transcurre la reacción es el representado en el esquema 5.1.



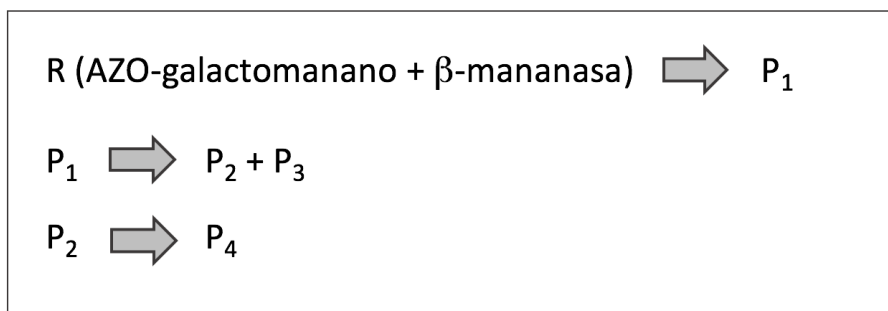
**Esquema 5.1.** Posible secuencia de reacciones del AZO-galactomanano con la  $\beta$ -mananasa a pH 4 y 30°C.



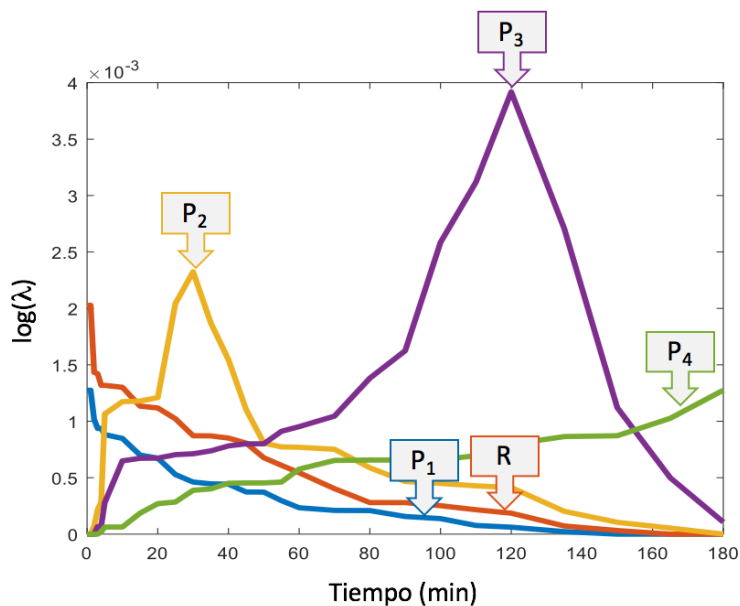
**Fig. 5.8.** Estima de los perfiles de concentración de las especies químicas de la reacción del AZO-galactomanano con la  $\beta$ -mananasa a pH 4 y 30°C.

En este punto cabe insistir en el hecho de que esto es una estima inicial de los denominados perfiles de concentración de las especies químicas involucradas en la reacción química y que sería necesario un análisis más profundo para su completa caracterización.

Un gráfico análogo al mostrado en esta figura, se obtienen en el caso de la Fig. 5.9; sólo que ahora habría un paso más en la sucesión de reacciones, planteadas en el esquema 5.2.



**Esquema 5.2.** Posible secuencia de reacciones del AZO-galactomanano con la  $\beta$ -mananasa a pH 4 y 40°C.



**Fig. 5.9.** Estima de los perfiles de concentración de las especies químicas de la reacción del AZO-galactomanano con la  $\beta$ -mananasa a pH 4 y 40°C.

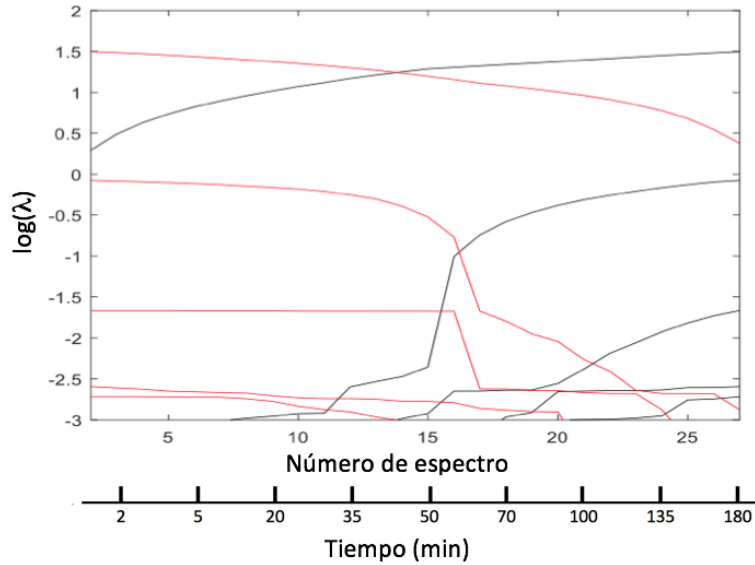
A partir de los resultados obtenidos es razonable considerar que la cinética de la reacción esté directamente relacionada con el aumento de la temperatura de trabajo.

En la goma de garrofín se ha observado que a 30°C emergen un total de 7 factores y a 50°C un total de 9 factores. Siguiendo la misma argumentación, deberíamos de pensar que para esta goma, la hidrólisis es más rápida y en el mismo tiempo de análisis aparecerían un número mayor de fragmentos de polisacárido.

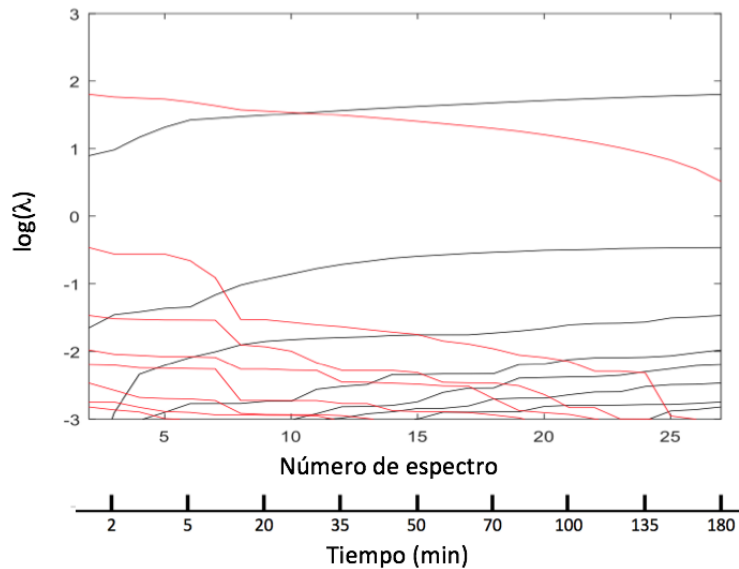
### 5.2.2. Análisis quimiométrico de los casos estudiados variando el pH

En la Fig. 5.10 se muestran a modo de ejemplo los resultados del análisis de componentes principales realizado mediante EFA de la goma guar con la  $\beta$ -mananasa a pH 3 y pH 5,5 (casos de estudio 11 y 12 de la Fig. 4.1B) asumiendo, como en el estudio del apartado anterior, un valor umbral de  $\log(\lambda)$  de -3.

A)



B)



**Fig. 5.10.** Resultado del análisis EFA de la matriz de datos  $U_{pH3}$  recogida en la Fig. 4.4B (Fig. 5.10A) y la matriz de datos  $U_{pH5,5}$  (Fig. 5.9B).

Es fácil divisar diferencias entre los gráficos de la Fig.5.10, los cuáles sugieren que el número de factores dependen del pH al que se encuentre. En el tiempo de estudio, 180min, aparecen un total de 5 fuentes de variabilidad para el estudio de la reacción en condiciones de pH 3, y un total de 8 fuentes de variabilidad para el estudio a pH 5,5.

Cabe notar como emergen nuevos factores a tiempos más cortos cuanto menor es la acidez del medio de reacción. En el gráfico de resultados a pH 3 (Fig. 5.10A), a tiempo inicial (dos primeros espectros) se puede explicar la variabilidad de los datos por un solo factor hasta el tiempo de 15min (correspondiente al número 7,5) donde aparece una segunda fuente de

variabilidad. En el gráfico de resultados a pH 5,5 (Fig. 5.10B), se observa como a tiempo inicial la variabilidad de los datos se puede explicar por dos factores hasta el tiempo de 2 min (correspondiente al número 2). Por tanto, cabe pensar que en el medio de reacción con pH 5,5 la hidrólisis del polisacárido es más rápida apareciendo un mayor número de fragmentos en el mismo tiempo. Resultados análogos a los comentados fueron encontrados cuando el análisis se verificó con los datos de las matrices que contenían los datos del garrofin y AZO-galactomanano a pH 3 y pH 5,5.

## 6. CONCLUSIONS

In the present work it can be concluded that the method to monitoring the enzymatic hydrolysis of  $\beta$ -galactomannans by UV-Vis-NIR spectroscopy and data treatment by spectral analysis and factor analysis is useful for the proposed objective.

Results of the study varying the temperature to constant pH shows that the number of factors that appears in EFA graphics and their times increase with temperature. These facts are also observed when the acidity of the medium of reaction decrease from pH 3 to pH 5.5.

The previous observations conclude that the time at which new factors appear in EFA graphics indicates the presence of new chemical environments and the times at which they appear may be related to the appearance of new oligosaccharides. In both cases, the number of factors that explained the variability of the reaction to the different study times it's between 4 to 9. This indicate that it's a chain reaction, which has a greater kinetics when the temperature increases or acidity on the medium of reaction decrease.

Changes can occur due to small temperature fluctuations in the intestinal tract of chickens around 40°C and acidity conditions are significant.

In order to make the reaction mechanism, it would be necessary to make a liquid chromatography or masses at the average times of the graphs obtained by means of EFA. In addition, it would be interesting for future studies to follow the reaction by modifying the acidity of the solution to build more precise reproduction to the digestive tract of the chickens.

## 7. AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a la Dra. Maria Soledad Larrechi, directora del trabajo, por su constante guía y apoyo; y a la Dra. Anna Pérez Vendrell, responsable del laboratorio de nutrición monogástrica del centro Mas Bober (Laboratorio del IRTA en Reus), por su disponibilidad tanto para facilitarme las gomas en estudio como por el soporte recibido para entender desde un punto de vista práctico el problema abordado en este estudio.

## 8. BIBLIOGRAFIA

1. Aecosan - Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición [Internet]. [cited 2017 Oct 23]. Available from: [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/subdetalle/salmonela.htm](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/salmonela.htm)
2. Oyofa B, DeLoach J, Corrier D, Norman J, Ziprin R, Mollenhauer H. Prevention of *Salmonella typhimurium* colonization of broilers with D-mannose. *Poultry Science*. 1989;68:1357–136060.
3. Adhesinas [Internet]. [cited 2017 Dec 12]. Available from: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/images/adhesinas.jpg>
4. Vilà B, de Queiroz D, Badiola I, Pérez-Vendrell A, Brufau J. Effects of carob bean gum on performance, nutrient digestibility and *Salmonella enterica* var. *Enteritidis* colonisation in chickens. *Food Research International*. 2012;45(2):1133–1138.
5. Badia R, Zanello G, Chevalere C, Lizardo R, Meurens F, Martinez P, et al. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* var. *Boulardii* and beta-galactomannan oligosaccharide on porcine intestinal epithelial and dendritic cells challenged in vitro with *Escherichia coli* F4 (K88). *Vet Res* [Internet]. 2012 Jan 25 [cited 2017 Oct 26];43(1):4. Available from: <http://www.veterinaryresearch.org/content/43/1/4>
6. Zaaboune ML. Eficacia de la aplicación de productos ricos en b-galactomananos en dietas para pollos infectados o no con *Salmonella* [Internet]. Universidad de Zaragoza, Facultad de Veterinaria; 2013 [cited 2017 Oct 31]. Available from: <http://zaguan.unizar.es/record/11582?ln=en>
7. Moreira L, Filho E. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008;2(79):165–78.
8. Kaity S, Isaac J, Ghosh A. Interpenetrating polymer network of locust bean gum-poly (vinyl alcohol) for controlled release drug delivery. *Carbohydr Polym*. 2013 Apr 15

9. Rios Y. Espectroscopia UV-Visible. 2012;31–65.
10. Osborne B, Fearn T, Hindle P. Practical NIR Spectroscopy with applications in food and beverage analysis, 2nd ed. Longman Sci Tech. 1993.
11. Massart D, Vandeginste B, Buydens L, De Jong S, Lewi P, Smeyers-Verbeke J. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A. Elsevier. 1997.
12. Instrumentación para espectroscopia [Internet]. [cited 2017 Dec 12]. Available from: <http://fcq.uach.mx/index.php/docencia/columna-2/material-de-estudio/category/15-analisis-instrumental?download=50:lectura3>.
13. Mardia K, Kent J, Bibby J. Multivariate Analysis. Acad Press. 1980.
14. Vandeginste B, Massart D, Buydens L, De Jong S, Lewi P, Smeyers-Verbeke J. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B. Elsevier. 1998.
15. Brereton R. Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant. Wiley. 2003.
16. Gampp H, Maeder M, Meyer C, Zuberbühler A. Talanta 12. 1985;1133.
17. Keller H, Massart D. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems. 1992;12:209.
18. Fernández Moreira E. Bacterias Actuaciencia: ¡Qué complicadas son de tratar las infecciones en el tubo digestivo de gallinas con fagos! [Internet]. 2014 [cited 2017 Oct 31]. Available from: <http://bacteriasactuaciencia.blogspot.com.es/2014/05/que-complicadas-son-de-tratar-las.html>
19. ASSAY OF endo-1,4-b-mannanase using AZO-CAROB GALACTOMANNAN. Megazyme. 2007;1–3.
20. Yamazaki M, Krishnadasan S, DeMello AJ, DeMello JC. Non-emissive plastic colour filters for fluorescence detection. Lab Chip. 2012 Oct 2;12(21):4316.
21. Villanueva J. Science for Bunnies [Internet]. 2015 [cited 2017 Oct 25]. Available from: <http://scienceforbunnies.tumblr.com/post/125934959042/introduccionaproteinas>

22. M. Maeder, *Anal. Chem.* 1987; 59.