



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MÉXICO**

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

**MODIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE FLAVONOIDES CON LAS  
CARBOXILESTERASAS DE BACILLUS PUMILUS GMA1**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

P R E S E N T A

**EVA PATRICIA BERMÚDEZ GARCÍA**



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Dr. Agustín López Munguía Canales

**VOCAL:** Dra. Amelia Farrés González-Saravia

**SECRETARIA:** Dr. Francisco Ruiz Teran

**1er SUPLENTE:** Profesor: Marco Antonio Ortiz Jiménez

**2° SUPLENTE:** Dra. Maricarmen Quirasco Baruch

Este trabajo se realizó en el laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología. Conjunto E. Facultad de Química. UNAM.

---

Dra. Amelia Farrés González-Saravia  
**Asesora del tema**

---

Dra. Carolina Peña Montes  
**Supervisora Técnica**

---

Eva Patricia Bermúdez García  
**Sustentante**

*A mis padres porque sin ellos, no me hubiera sido posible alcanzar este momento tan anhelado. Los amo muchísimo, gracias por todo.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Amelia Farrés por darme la oportunidad de estar bajo su asesoría y en su equipo de trabajo. Por toda la paciencia que me tuvo y por escucharme y orientarme siempre que lo necesite y sobre todo por la grandísima ayuda que me proporcionó en los momentos difíciles que tuve a lo largo de esta etapa. La quiero y admiro muchísimo.

A la Dra. Carolina Peña por su valiosa asesoría y sus múltiples consejos brindados que siempre fueron de mucha ayuda. Por la paciencia que siempre me tuvo y por animarme cuando las cosas no iban bien. Eres una gran persona, te quiero mucho.

Agradezco de manera especial al Dr. Arturo Navarro, por abrirme las puertas de su laboratorio y por todas las enseñanzas que me dio, para poder llevar a cabo la parte de biocatálisis de este trabajo.

A mis niñas QA's por ser las mejores amigas del mundo, por todos los momentos que vivimos y por hacer más divertida toda la carrera: Cindy, Eri, Fer, Jaky, Joss, Lili, Mary, Myrna, Rom. Y especialmente a Pao y a Lu por aguantarme toda la carrera, por todos los consejos que me han dado y por siempre estar junto a mí cuando lo necesito, las adoro niñas, gracias por su amistad. A todos mis amigos de la facultad y de la prepa por su gran cariño y los buenos momentos que compartimos.

A todos los integrantes del laboratorio 312: Isra, Denisse, Mirna, Blanca, Sergio, Lalo, Mary, Lau, y todos los demás por hacer un ambiente de trabajo tan

agradable, por sus consejos y ayuda y también por los buenos momentos que hemos pasado dentro y fuera del laboratorio.

A los chicos del laboratorio 321: Joanna, Raúl, Emilio, Carlitos, Rod, Viri, Tania, por adoptarme como una más de ustedes, por su ayuda dentro del laboratorio, y por todos los buenos momentos que pasamos fuera.

Agradezco los miembros del jurado por su amabilidad para la revisión de la tesis y por las observaciones hechas a esta.

Por último, a la máxima casa de estudios, la UNAM que es el lugar que me ha formado como profesionista y como ser humano. Siempre le tendré un cariño infinito y todo mi agradecimiento. A los profesores de la Facultad de Química, que marcaron mi vida con sus enseñanzas y con su gran apoyo, nunca los voy a olvidar.

## DEDICATORIAS

A mi madre Patricia García Ortiz, por ser el motor de mi vida; la que siempre me ha impulsado y apoyado a cosa de sus propios sacrificios. Gracias mamita por todos tus consejos y el infinito amor que me has dado. Gracias por estar siempre junto a mí porque sin ti hubiera sido imposible alcanzar mi este sueño.

A mi padre Guillermo Bermúdez Almada por todo su cariño y su apoyo a través de todos estos años, porque pese a la distancia siempre me sentí respaldada por ti. Gracias por todos los esfuerzos que has hecho para ayudarme a concluir mi carrera profesional.

A toda mi familia, a mis abuelitos, a mis tíos y primos por su cariño y apoyo en las diferentes etapas de mi vida. Los quiero mucho y estoy muy agradecida por tener una familia como la que tengo.

A Mario, porque fue un pilar y un gran apoyo durante toda mi carrera. Te quiero mucho.

## INDICE GENERAL

1. RESUMEN .....	1
2. INTRODUCCIÓN .....	3
3. MARCO TEÓRICO .....	5
3.1 Las enzimas y su importancia en biocatálisis.....	5
3.1.1 Generalidades de las lipasas.....	5
3.1.2 Fuentes de lipasas .....	6
3.2 Importancia de los microorganismos termófilos.....	6
3.2.1 El género <i>Bacillus</i> .....	7
3.2.2 Lipasas del género <i>Bacillus</i> .....	7
3.2.3 Lipasas de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1.....	8
3.3 Desarrollo de un biocatalizador .....	8
3.4 Inmovilización de la enzima.....	8
3.4.1 Ventajas y desventajas de la inmovilización de enzimas.....	8
3.4.2 Principales métodos de inmovilización.....	9
3.4.2.1 Inmovilización de enzimas por retención física .....	9
3.4.2.2 Inmovilización de enzimas por unión química .....	11
3.5 Inmovilización por adsorción para lipasas .....	15
3.6 Principales carboxilesterasas comerciales inmovilizadas.....	17
3.6.1 La lipasa B de <i>Candida antarctica</i> .....	18
3.7 Flavonoides .....	19
3.7.1 Estructura de los flavonoides.....	19
3.7.2 Importancia de los flavonoides .....	20



3.7.3 Propiedades antioxidantes de los flavonoides .....	20
3.7.4 Estabilidad de los flavonoides .....	21
3.7.5 Flavonoides modificados .....	22
3.8 Reacciones de biocatálisis .....	22
3.8.1 Reacciones de desacetilación enzimática (hidrólisis) .....	22
3.8.2 Reacciones de esterificación enzimática .....	23
3.8.3 Reacciones de transesterificación enzimática .....	24
4. ANTECEDENTES .....	25
4.1 Inmovilización de lipasas de <i>Bacillus pumilus</i> y su aplicación.....	25
4.2 Desarrollo del biocatalizador.....	25
4.3 Optimización del medio de cultivo .....	26
4.4 Reacciones preliminares .....	27
5. JUSTIFICACIÓN .....	28
6. OBJETIVOS .....	29
7. MATERIALES Y REACTIVOS .....	30
8. METODOLOGÍA .....	32
8.1 Diseño experimental .....	32
8.2 Conservación de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 .....	33
8.2.1 Reactivación de la cepa y verificación morfológica .....	33
8.3 Verificación de la actividad enzimática .....	34
8.4 Producción enzimática .....	34
8.5 Concentración del extracto enzimático .....	34
8.6 Electroforesis .....	35
8.6.1 Preparación de los geles de electroforesis .....	35
8.6.2 Preparación de las muestras para geles SDS-PAGE .....	35
8.6.3 Preparación de las muestras para geles nativos .....	36
8.6.4 Tinciones para geles de electroforesis .....	36
8.7 Inmovilización de la enzima .....	37
8.7.1 Acondicionamiento del soporte .....	37
8.7.2 Acondicionamiento del extracto .....	37
8.7.3 Inmovilización de la enzima .....	37

8.8 Reacciones de biocatálisis .....	38
8.8.1 Reacciones de síntesis .....	38
8.8.2 Reacciones de hidrólisis .....	39
8.9 Recuperación de los productos .....	40
8.10 Cromatografía en capa fina (TLC) .....	40
8.10.1 Reveladores para TLC .....	41
8.11 Purificación de los productos de reacción .....	41
8.12 Determinación de la estructura de los compuestos .....	42
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	43
9.1 Verificación de la pureza de la cepa .....	43
9.2 Verificación de la actividad lipolítica .....	43
9.3 Producción enzimática .....	44
9.4 Perfil de electroforesis .....	46
9.5 Inmovilización del extracto enzimático .....	47
9.6 Reacciones de biocatálisis .....	49
9.7 Reacciones de desacetilación (hidrólisis) .....	49
9.7.1 Preparación de sustratos acetilados .....	49
9.7.2 Optimización de las condiciones de reacción .....	50
9.7.3 Identificación de los productos de desacetilación enzimática..	52
9.8 Reacciones de síntesis .....	56
9.8.1 Optimización de las condiciones de reacción .....	56
9.8.2 Esterificación directa .....	57
9.8.3 Transesterificación .....	60
10. Conclusiones .....	67
11. Bibliografía .....	69
ANEXOS .....	73
Espectros de RMN de los sustratos y productos de reacción	

# MODIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE FLAVONOIDES CON LAS CARBOXILESTERASAS INMOVILIZADAS DE *BACILLUS PUMILUS* GMA1

## 1. RESUMEN

La utilización de biocatalizadores ha aumentado considerablemente ya que presentan grandes ventajas en comparación con los procesos químicos convencionales. Son selectivos y específicos, presentan condiciones de trabajo fáciles de conseguir y evitan la formación de productos secundarios. Entre las enzimas más utilizadas industrialmente están las lipasas cuya función es catalizar la hidrólisis de triglicéridos para obtener como productos finales ácidos grasos libres y glicerol. Este tipo de enzimas permite llevar a cabo reacciones de biocatálisis en medios no convencionales, un ejemplo de esto es la desacetilación regioselectiva de compuestos naturales bioactivos como los flavonoides, así como la esterificación regioselectiva de los mismos. En años recientes, la inmovilización de las enzimas, proceso de insolubilización cuyas condiciones deben ser determinadas para cada caso en particular, conlleva a la reducción de costos en procesos a nivel industrial.

En esta tesis, se produjo un biocatalizador a partir de un extracto enzimático inmovilizado de *Bacillus pumilus* GMA1 que presenta actividad lipolítica con una actividad final de 2.17U/mg de soporte y se buscó su aplicación en la síntesis e hidrólisis de flavonoides, para aumentar así su estabilidad en matrices lipofílicas y su bioactividad sin disminuir su poder antioxidante. Una vez encontradas las condiciones óptimas de reacción, se purificaron y caracterizaron los productos de reacción.

Se encontró que el extracto inmovilizado es capaz de llevar a cabo reacciones de desacetilación sobre diferentes flavonoides como la quercetina y la naringina generando los mismos productos que la lipasa comercial más utilizada proveniente de *Candida antarctica*. Así mismo se comprobó la capacidad del biocatalizador para esterificar regioselectivamente a flavonoides como la

naringina y la rutina con ácidos grasos de cadena media como el octanoico de la misma manera que actúa la lipasa comercial.

## 2. INTRODUCCIÓN:

Las enzimas son sustancias de naturaleza proteica que catalizan reacciones químicas que ocurren en los organismos vivos. Como todos los catalizadores, actúan disminuyendo la energía de activación para aumentar sustancialmente la velocidad de una reacción. A diferencia de los catalizadores comunes, las enzimas son más específicas y su actividad se ve afectada por diversos factores ambientales como pH, temperatura, presión y disponibilidad de oxígeno.

La utilización de estos biocatalizadores ha aumentado considerablemente ya que presentan grandes ventajas en comparación con los procesos químicos convencionales. Son selectivas y específicas, requieren condiciones de trabajo fáciles de conseguir, evitan la formación de productos secundarios y por lo tanto reducen el número de pasos de purificación del producto a obtener y generan menos residuos ya que no suelen necesitar grandes cantidades de solventes orgánicos. Por todas estas razones, las enzimas son usadas comercialmente en un sinnúmero de aplicaciones.

Entre las enzimas más utilizadas industrialmente están las lipasas cuya función más conocida es catalizar la hidrólisis de triglicéridos para obtener como productos finales ácidos grasos libres y glicerol. Este tipo de enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y permiten llevar a cabo reacciones de biocatálisis en medios no convencionales, permitiendo así la desacetilación regioselectiva de compuestos naturales bioactivos, así como la esterificación regioselectiva de ésteres en compuestos polihidroxilados como los flavonoides.

Los compuestos fenólicos se encuentran en gran variedad de frutos y vegetales, así como en granos de cereales y son considerados compuestos biológicamente activos gracias a que presentan alta capacidad antioxidante. Dada su estructura, estos compuestos fenólicos son poco solubles en medios no acuosos, lo que constituye una gran limitante en su uso en alimentos hechos a base de aceites. Sin embargo, se ha demostrado que la hidrofobicidad de estos compuestos puede aumentarse mediante métodos químico-enzimáticos, esterificando regioselectivamente con algún ácido graso el alcohol correspondiente en el

flavonoide. Con esto se logró obtener una molécula anfifílica que no pierde su capacidad bioactiva. La utilización de las lipasas para desacetilar regioselectivamente a los flavonoides amplía la posibilidad de usar estos compuestos naturales como antioxidantes en un gran número de procesos industriales.

### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1 Las enzimas y su importancia en biocatálisis**

Las enzimas son sustancias de naturaleza proteica indispensables para llevar a cabo numerosas reacciones dentro de los sistemas biológicos. Actúan como catalizadores, incrementando la velocidad de las reacciones metabólicas sin sufrir ningún cambio permanente. Al no ser consumidas durante la reacción continúan catalizándola siempre y cuando los sustratos se encuentren disponibles. Otra propiedad de las enzimas es su alto grado de especificidad; solamente catalizan la reacción en la que participa un sustrato (especificidad absoluta) o un grupo de sustratos con ciertas características químicas y geométricas comunes (especificidad de grupo).

La cinética de las reacciones enzimáticas puede explicarse mediante el modelo de Michaelis-Menten; y se ajusta a una cinética de primer orden a concentraciones bajas de sustrato y a una de orden cero cuando se eleva la concentración.

El mercado de las enzimas está creciendo constantemente debido a la diversificación de sus numerosas aplicaciones en diferentes campos tecnológicos. En la química pura son de gran utilidad ya que permiten la obtención de compuestos puros dada su alta regioselectividad. Entre las enzimas más utilizadas para este fin se encuentran aquellas con capacidad hidrolítica como las lipasas, las proteasas, las celulasas y las amilasas entre otras (Villeneuve, 2007).

##### **3.1.1 Generalidades de las lipasas**

Las lipasas (triacilglicerol éster hidrolasas, EC. 3.1.1.3.) pertenecen al grupo de las carboxilesterasas, enzimas que catalizan la hidrólisis de un enlace éster. Este grupo de enzimas comprende a las esterasas que hidrolizan ésteres pequeños parcialmente solubles en agua, a las lipasas que actúan sobre ésteres de cadena larga insolubles en agua, a varios tipos de fosfolipasas y a las cutinasas. La principal función de las lipasas dentro del organismo es catalizar la hidrólisis de

triglicéridos para obtener como productos finales ácidos grasos libres y glicerol o sus productos intermedios como mono y diglicéridos.

Las carboxilesterasas se encuentran entre las enzimas más utilizadas, no solo debido a su bajo costo, sino también a su disponibilidad a partir de diversas fuentes. En general han demostrado ser altamente selectivas durante las reacciones de síntesis de ésteres y desacetilación, además de mostrarse estables en solventes orgánicos (Liese, 2000).

Además catalizan otras reacciones no hidrolíticas debido a que son capaces de mantener su actividad en medios no acuosos. Esto permite llevar a cabo eficientemente reacciones de esterificación, transesterificación e interesterificación (Jaeger et al, 1994).

### **3.1.2 Fuentes de lipasas**

Las lipasas y carboxilesterasas se encuentran ampliamente distribuidas en animales, vegetales y microorganismos, sin embargo, la forma más sencilla para obtenerlas y que garantiza un mejor rendimiento es sin duda mediante un proceso fermentativo fácilmente optimizable a partir de bacterias y hongos.

Algunas de las lipasas bacterianas provienen de microorganismos extremófilos como diversas especies de *Bacillus* y frecuentemente estas enzimas presentan actividad en un amplio rango de pH y a elevadas temperaturas; esto permite ampliar aun más sus aplicaciones comerciales y su vida media.

### **3.2 Importancia de los microorganismos termófilos**

Los microorganismos termófilos son aquellos capaces de crecer a altas temperaturas, superiores a 40° C generalmente. Estos microorganismos son de particular interés ya que permiten simplificar las condiciones de los procesos de producción de bienes de consumo (Jeong, *et al*, 2002). Junto con los resistentes a medios alcalinos han sido el foco de atención en investigaciones debido a que son fuentes de obtención de enzimas que tienen gran estabilidad a condiciones



extremas. Las carboxilesterasas de *B. subtilis* y *B. pumilus* muestran actividad óptima a valores de pH superiores a 9 y temperaturas por encima de los 40°C (Nthangeni *et al*, 2001).

### 3.2.1 El género *Bacillus*

El género *Bacillus*, pertenece a la familia *Bacillaceae* y agrupa a bacilos gram positivos, aerobios, móviles, catalasa positivos y con capacidad para esporular. Sus esporas pueden ser termorresistentes y son capaces de metabolizar una gran variedad de sustratos gracias a sus enzimas hidrolíticas (Berkeley *et al*, 1984).

Entre los diversos microorganismos productores de enzimas, el género *Bacillus* presenta ventajas respecto a otros, ya que muy pocas especies son patógenas, tiene una alta capacidad de secreción de enzimas (Harwood, 1992), y muchas enzimas industriales se producen a partir del mismo, por lo que las condiciones de manejo a gran escala son conocidas (Chaplin, 1992).

### 3.2.2 Lipasas del género *Bacillus*

En la tabla 1.1 se observan las lipasas y carboxilesterasas que se han reportado a partir del género *Bacillus*. Las carboxilesterasas que producen son muy parecidas entre sí en su secuencia de aminoácidos, salvo las de 2 cepas, específicamente de *B. subtilis* y de *B. pumilus* que son mucho más pequeñas que las otras (aprox 20kDa) y tienen poca similitud en su secuencia (15%) con las lipasas de otros microorganismos del género.

**Tabla 1.1 Carboxilesterasas reportadas del género *Bacillus***

<i>Microorganismo</i>	<i>pH de máxima actividad</i>	<i>Temperatura máxima de actividad (°C)</i>	<i>Peso Molecular</i>	<i>Referencia</i>
<i>B. pumilus</i> DSM5776	9.5	30	19.3	Möller y col., 1991
<i>B. pumilus</i> B26	8.5	35	19.2	Kim y col., 1991
<i>B. subtilis</i> 168, Lip A	10.0	37	19.3	Lesuisse y col., 1993
<i>B. pumilus</i>	10.5	50	<b>20.5</b>	Bustos, 1995

GMA1				
<i>B. lichenformis</i>	10.0 – 11.0	50 – 60	19.2	Nthangeni y col., 2001
<i>Bacillus sp.</i>	6.4	60	22.0	Dharmsthiti y Luchai, 1999

### 3.2.3 Lipasas de *Bacillus pumilus* GMA1

Estudios anteriores reportan que el microorganismo termófilo de estudio, *B. pumilus* GMA1, produce una enzima con actividad lipasa presentando máximos de actividad a 50°C y pH 10.5 en la región de 21 kDa (Bustos, 1995) y tiene actividad en solventes orgánicos por lo cual es de interés en la industria y en procesos de química fina (Wong, 2001). Además, se optimizó un medio de cultivo (Ibáñez, 2007) donde se observó un incremento en la actividad de las carboxilesterasas.

### 3.3 Desarrollo de un biocatalizador

Un biocatalizador es un sistema que permite la reutilización de la enzima por su unión a diferentes soportes, lo que permite mantenerla insoluble en el medio de reacción. Dependiendo de la aplicación buscada; en el desarrollo de un biocatalizador se pueden emplear extractos crudos, o se puede purificar la enzima de interés para evitar interferencias de otras enzimas y facilitar su caracterización. Por lo tanto, es preferible utilizar métodos de inmovilización selectivos para la enzima que permitan realizar una purificación al mismo tiempo que se inmoviliza. (Degrassi *et al*, 1998).

### 3.4 Inmovilización de enzimas

La inmovilización de una enzima consiste en su localización en una región definida de espacio para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser utilizadas repetidamente. Esta definición se amplía para cualquier proceso por el cual se restringen los grados de libertad de movimiento de las enzimas por la unión a un soporte (Arroyo, 1998)

### **3.4.1 Ventajas y desventajas de la inmovilización de enzimas.**

La inmovilización de un biocatalizador presenta una serie de ventajas respecto al catalizador sin inmovilizar tales como:

- Aumento en la estabilidad de la enzima frente a temperatura y pH
- La reutilización de la enzima
- La flexibilidad de operación
- La facilidad para separar el producto de la reacción

Estas ventajas conllevan a una mejora en la producción que desemboca en la obtención de un sistema económicamente más rentable.

Sin embargo, también es necesario mencionar las desventajas tales como:

- Posible alteración del estado nativo de la proteína lo que afectaría significativamente a la actividad catalítica
- La gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte donde pueden existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas con un diferente número de uniones al soporte.

### **3.4.2 Principales métodos de inmovilización**

En general, los métodos de inmovilización pueden dividirse en dos grandes grupos: inmovilización por retención física e inmovilización por unión química.

#### **3.4.2.1 Inmovilización de enzimas por retención física**

##### **Atrapamiento**

Consiste en la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por pre-polímeros fotoentrecruzables o por polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato o resinas de poliuretano. El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una solución del monómero, seguidamente se inicia la polimerización por un cambio de temperatura o por la adición de un agente químico. El atrapamiento puede darse en geles o en fibras.

Por lo general los geles son más resistentes. En el primer caso, la enzima queda atrapada en un gel y en el segundo caso se encuentra ocluida dentro de las microcavidades de una fibra sintética (Klei, *etal* 1985).

Ventajas de la inmovilización por atrapamiento:

- Muy sencillo de llevar a cabo
- Requiere poca cantidad de enzima para obtener derivados activos
- La enzima no sufre ninguna alteración en su estructura

Desventajas:

- Requiere un control riguroso de las condiciones de polimerización
- No es posible regenerar el soporte
- Se debe comprobar que la naturaleza química del proceso no altere los grupos reactivos de la proteína.

### **Inclusión en membranas**

Se lleva a cabo de dos maneras:

Microencapsulación: En esta técnica las enzimas están rodeadas de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y de producto pero no de la enzima. Estas membranas semipermeables pueden ser permanentes (originadas por polimerización interfacial) o no permanentes (originadas por surfactantes, también llamadas micelas reversas). Las microcápsulas obtenidas son de forma esférica con tamaños comprendidos entre 1 y 100 $\mu$ m de diámetro. Mediante este método se pueden encapsular simultáneamente una gran variedad de enzimas permitiendo que se lleven a cabo determinadas reacciones que suceden en múltiples pasos.

Reactores de membrana: el desarrollo de reactores o sistemas que contengan enzimas atrapadas ha despertado gran interés en la industria. Estos reactores emplean membranas permeables al producto final pero no al sustrato inicial ni mucho menos a la enzima. Mediante una bomba se establece un flujo líquido de sustrato que atraviesa el reactor.

En general, en esta metodología se procede inicialmente a la adsorción de la enzima sobre la membrana que formará el reactor. Esta adsorción puede hacerse de dos formas:

- Mediante el paso de una solución tamponada de la enzima a través de la membrana
- Por contacto continuo de una solución de enzima con la membrana

### **3.4.2.2 Métodos de inmovilización de enzimas por unión química**

#### **Unión a soportes**

Son los métodos generalmente más utilizados y de los que se dispone de una mayor información. La elección del soporte y tipo de enlace resultan determinantes en el comportamiento final del biocatalizador. Se debe procurar que la inmovilización amplíe el intervalo de pH de actividad y reduzca las posibles contaminaciones microbianas. Además el soporte debe tener resistencia mecánica a las condiciones de trabajo y debe ser fácilmente separable del medio líquido para su posterior reutilización. Se han utilizado una gran variedad de materiales como soportes para la inmovilización de numerosas enzimas. Estos materiales difieren en tamaño, densidad, porosidad y forma, aunque generalmente nos los encontramos en forma de cilindro, hojas, fibras y más sencillamente en forma de esferas. Los soportes pueden clasificarse en dos grandes grupos:

1. Soportes inorgánicos. Dentro de este grupo tenemos una gran variedad de soportes, que pueden ser *naturales* (arcillas como la bentonita, piedra pómez, sílice, etc.) o *materiales manufacturados* (óxidos de metales y vidrio de tamaño de poro controlado, vidrio no poroso, alúmina, cerámicas, gel de sílice, etc.)

2. Soportes orgánicos. Se pueden clasificar en:

*Polímeros naturales*: a su vez divididos en:

Polisacáridos (celulosa, almidón, dextranos, agar-agar, agarosa, alginatos, quitina, quitosán, etc).

Proteínas fibrosas (colágeno, queratina, etc).

*Polímeros sintéticos*: divididos en:

Poliiolefinas (como el poliestireno)

Polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliacrilamidas, polimetacrilatos, etc.)

Otros tipos (alcohol polivinílico, poliamidas, etc).

Las enzimas se pueden unir a estos soportes mediante adsorción o por unión covalente.

### **Adsorción**

En la adsorción, la enzima se une al soporte sin funcionalizar mediante interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals y por puentes de hidrógeno. Los principales factores que influyen en la adsorción son:

- El pH del medio: controla el número y naturaleza de las cargas que presenta la superficie de la proteína y del sólido.
- La fuerza iónica: al aumentar la fuerza iónica se produce la desorción de la enzima, ya que los iones inorgánicos se unen con más fuerza al soporte que la proteína.
- El diámetro del poro: debe ser aproximadamente dos veces el tamaño del eje mayor de la enzima.
- La presencia de iones que actúen como cofactores de la enzima ya que pueden incrementar la carga enzimática del inmovilizado.

Las principales ventajas de este método son:

- su preparación sencilla,
- su bajo costo,
- no hay cambios de especificidad enzimática,
- los derivados son estables en medios de trabajo con bajo contenido en agua.

Los inconvenientes que presenta son:

- la optimización de las variables que controlan la adsorción,

- los derivados obtenidos son poco estables desde el punto de vista mecánico,
- la unión al soporte no es muy fuerte.

Una variante dentro de la técnica de la adsorción consiste en emplear *resinas de intercambio iónico*, las cuales contienen grupos funcionales y contraiones móviles. Estos contraiones se pueden intercambiar reversiblemente por otros iones de la misma carga, sin que se produzcan cambios en la matriz insoluble.

### **Unión covalente**

La unión covalente de una enzima a un soporte es quizá el método de inmovilización más interesante desde el punto de vista industrial. La metodología de la unión covalente se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas. De entre los 20 aminoácidos diferentes que se encuentran en la estructura de las enzimas, los más empleados para la formación de enlaces con el soporte son principalmente la lisina, la cisteína, la tirosina y la histidina, y en menor medida la metionina, el triptófano, la arginina y el ácido aspártico y glutámico. El resto de aminoácidos, debido a su carácter hidrófobo, no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica, y no pueden intervenir en la unión covalente.

Este método presenta las siguientes *ventajas*:

- La manipulación de los derivados inmovilizados es sencilla;
- La carga de enzima permanece constante después de la inmovilización;
- Los derivados pueden utilizarse en reactores en continuo, empaquetados, de lecho fluidizado o tanque agitado.
- Una mayor resistencia a la desactivación por el efecto de la temperatura, de los disolventes orgánicos o del pH, al tener estabilizada su estructura terciaria.

En cambio la inmovilización por enlace covalente también presenta una serie de *inconvenientes*:

- Es necesario conocer la densidad de grupos activos por unidad de superficie, ya que condiciona el número de uniones enzima-soporte y su geometría, que puede ser distorsionante y conducir a derivados inactivos.
- El proceso de inmovilización puede alterar la estructura del centro activo. Para evitar esta posible alteración, se realiza la inmovilización en presencia de un inhibidor que bloquee el centro activo.
- La inmovilización covalente no es aconsejable en aquellas enzimas muy sensibles a cambios de pH, fuerza iónica, etc.

### **Reticulado**

También llamado de entrecruzamiento o cross-linking, es una técnica que ha sido usada ampliamente en la estabilización de varias enzimas. Consiste en uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de enzima. Como reactivos bifuncionales se pueden emplear dialdehídos, diiminoésteres, diisocianatos, sales de bisdiazonio e, incluso, diaminas si están activadas con carbodiimida (Wong, 1992). El resultado del reticulado son enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura. El co-reticulado, permite eliminar las pérdidas de actividad enzimática debidas a efectos difusionales, mediante el entrecruzamiento de las enzimas con una proteína sin actividad enzimática y rica en residuos de lisina (por ejemplo, la albúmina bovina). Un procedimiento mixto de inmovilización muy común consiste en inmovilizar la enzima por adsorción sobre una resina de intercambio iónico o un soporte polimérico (con lo que se consigue una elevada carga enzimática) y posteriormente añadir el reactivo bifuncional.



A continuación se presenta un resumen de los métodos de inmovilización:

**Tabla 1.2 Comparación de los métodos de inmovilización**

<i>Método</i>	<i>Métodos físicos</i>			<i>Métodos químicos</i>	
	<i>Inclusión en Membrana</i>	<i>Atrapamiento</i>	<i>Reticulado</i>	<i>Adsorción química</i>	<i>Unión covalente</i>
<b>Preparación</b>	Intermedia	Difícil	Intermedia	Sencilla	<b>Difícil</b>
<b>Fuerza de Unión</b>	Débil	Media	Débil-Media	Media	<b>Fuerte</b>
<b>Actividad enzimática</b>	Media-Alta	Baja	Baja	Media	<b>Alta</b>
<b>Regeneración del soporte</b>	Posible	Imposible	Imposible	Posible	<b>Difícil</b>
<b>Costo del proceso</b>	Medio-Alto	Medio	Medio	Bajo	<b>Alto</b>
<b>Estabilidad</b>	Media	Alta	Alta	Baja	<b>Alta</b>
<b>Validez</b>	General	General	Limitada	General	<b>Limitada</b>
<b>Resistencia microbiana</b>	<b>Si</b>	<b>Si</b>	<b>Si</b>	<b>No</b>	<b>No</b>

(Godia, et al., 1998)

### 3.5 Inmovilización por adsorción para lipasas

La inmovilización por adsorción es el método más simple de todos. Consiste en poner en contacto una solución acuosa de la enzima con un adsorbente activo y después de un tiempo, una vez efectuada la adsorción, lavar el soporte para eliminar cualquier cantidad de biocatalizador que no se haya inmovilizado. Las interacciones que favorecen la adsorción son de tipo iónico y también otras formas de enlace débil como puentes de hidrógeno o fuerzas de van der Waals.

La mayoría de las lipasas presenta gran afinidad por superficies hidrofóbicas, por lo que generalmente se utilizan este tipo de columnas para realizar la inmovilización. Una de las más usadas es la de Accurel que es un soporte hidrofóbico hecho de polipropileno y formando gránulos (Hita, et al, 2009).

**Tabla 1.3- Propiedades físicas del Accurel MP100**

Propiedades físicas	Soporte
	Accurel MP1000
Composición	Polipropileno
Naturaleza	Hidrofóbica
Área superficial (m <sup>2</sup> /g)	55.9855
Densidad de partícula (g/cm <sup>3</sup> )	1.992
Tamaño del poro (μm)	5-20
Tamaño de partícula (μm)	<1500

Fuente: Sher, 2007

Para describir la afinidad del soporte por la lipasa pueden construirse isotermas de adsorción que reflejan la distribución de la lipasa en la superficie del soporte. El equilibrio de adsorción se representa por una isoterma donde se grafica la carga de la enzima (es decir, la cantidad adsorbida)  $Q_{ev}$  (mg / g) en función de la concentración residual de la lipasa en la solución  $C_e$  (mg/dm<sup>3</sup>) después de la inmovilización. El análisis del equilibrio evalúa la afinidad (o capacidad) de la lipasa hacia las partículas del soporte. Además, la forma de la isoterma proporciona una descripción cualitativa de la naturaleza de la superficie del soporte (homogénea o heterogénea) . Para las lipasas en general, estas isotermas presentan la forma mostrada en la figura 1.1 cuando se utiliza como soporte el Accurel.

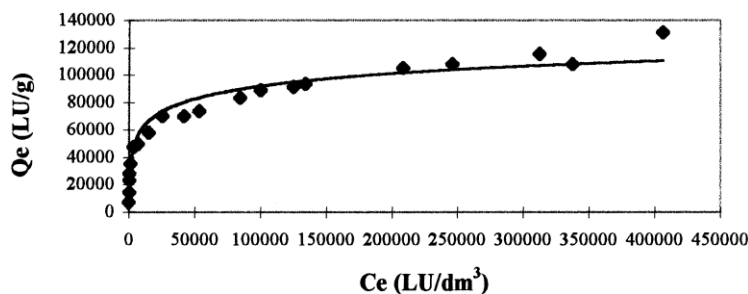


Fig. 1.1- Isotherma de adsorción para una lipasa en Accurel

Y se basa en la suposición de una estructura homogénea adsorbente en donde todos los sitios de adsorción son idénticos y energéticamente equivalentes, por lo que llevan el mismo número de moléculas (Al-Duri, 2000).

La inmovilización en soporte hidrofóbico ha tenido éxito cuando se trata de lipasas microbianas, según lo reportan numerosos trabajos; pero es necesario encontrar las condiciones bajo las cuales la enzima inmovilizada actúa más eficazmente (pH, Temperatura, y tipo de soporte). Se ha demostrado que para muchas de estas lipasas, el rango de pH bajo el que presentan actividad es amplio y al provenir de microorganismos termófilos alcanzan temperaturas de hasta 60°C.

### 3.6 Principales carboxilesterasas comerciales inmovilizadas

La mayoría de las carboxilesterasas termofílicas que han sido purificadas y caracterizadas han sido inmovilizadas para mejorar su actividad y facilitar su uso en procesos industriales. En la tabla 1.4 se muestran las principales lipasas que han sido inmovilizadas para su uso comercial:

Tabla 1.4 Principales carboxilesterasas inmovilizadas

Fuente	Proveedor	Usos	Referencias
<i>Candida antarctica</i>	Novo Nordisk	Síntesis de ésteres de ácidos	Ducret et al, 1995

<b>(Novozyme 435)</b>		grasos y azúcares
<b><i>Thermomyces lanuginosus</i></b>	Novo Nordisk	Síntesis de <i>Ferrer et al 2005</i>
<b>(Lipozyme TL IM)</b>		grasos y azúcares
<b><i>Rhizomucor miehei</i> (Lipozyme IM60)</b>	Novo Nordisk	Síntesis de <i>Ward et al 1997</i>
		ésteres de ácidos grasos y azúcares

### 3.6.1 La lipasa B de de *Candida antarctica*

La lipasa inmovilizada más utilizada actualmente proviene de *Candida antarctica*. Esta levadura produce dos diferentes lipasas, la lipasa A y la lipasa B. De estas, la lipasa B (CAL-B) es probablemente la hidrolasa más empleada en el campo de la biocatálisis.

Comercialmente, la lipasa B de *Candida antarctica* es distribuida por Novozyme bajo el nombre de Novozym® 435. Esta lipasa (lipasa B) es producida por una fermentación sumergida de un microorganismo del género *Aspergillus* y adsorbido sobre una resina macroporosa.

Novozym 435 es un catalizador de gran versatilidad que presenta actividad hacia una gran variedad de sustratos diferentes desde compuestos naturales como los flavonoides y los ácidos grasos hasta fármacos complejos. La enzima inmovilizada es un catalizador termoestable con una temperatura media de y resistente con una alta actividad en disolventes orgánicos como el dioxano, el tolueno, el isopropanol y la acetona.

### 3.7 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioleta, la contaminación ambiental y las sustancias químicas presentes en los alimentos. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. Están ampliamente distribuidos en plantas, frutas, verduras y en diversas bebidas y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana (Chebil, 2006).

#### 3.7.1 Estructura de los flavonoides

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6'.

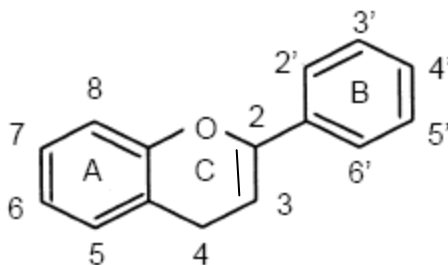


Figura 1: Estructura básica de los flavonoides

La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química. Esta estructura básica permite una

multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C. En función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

1. Flavanos, como la catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
2. Flavonoles, representados por la quercitina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
3. Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.
4. Antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.

Tres características estructurales son importantes para su función:

- a) La presencia en el anillo B de la estructura catecol u O-dihidroxi;
- b) La presencia de un doble enlace en posición 2,3

### **3.7.2 Importancia de los flavonoides**

Los flavonoides son un importante grupo de compuestos naturales ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Son usados en alimentos, cosméticos y en otros sectores ya que presentan propiedades farmacéuticas, biológicas y médicas extensamente estudiadas. Se ha reportado que además de su capacidad antioxidante y de atrapar radicales libres, los flavonoides tienen múltiples actividades biológicas como vasodilatadores, anticarcinogénicos, antiinflamatorios, antibacteriales, anti alergénicos, antivirales, así como inhibidores de varias enzimas como las fosfolipasas (Mellou, 2006).

### **3.7.3 Propiedades antioxidantes de los flavonoides**

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de

daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer.

Sus propiedades anti-radicales libres se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica y se ha descrito su capacidad de modificar la síntesis de eicosanoides (con respuestas anti-prostanoide y anti-inflamatoria), de prevenir la agregación plaquetaria (efectos antitrombóticos) y de proteger a las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación (prevención de la placa de ateroma).

Además de sus efectos antioxidantes, los flavonoides presentan otras propiedades que incluyen el impacto sobre la regulación del crecimiento celular y la inducción de enzimas de detoxificación tales como las monooxigenasas dependientes del citocromo P-450, entre otras.

#### **3.7.4 Estabilidad de los flavonoides**

El uso de los flavonoides en muchas matrices está limitado por su baja estabilidad y solubilidad en fases oleosas (Rice-Evans, 1996). Para mejorar sus propiedades, muchos autores han estudiado la modificación de su estructura mediante reacciones químicas, enzimáticas o químico-enzimáticas.

La glicosilación y la acetilación son dos de las reacciones de biocatálisis que más atención han recibido cuando se trata de aumentar el carácter hidrofílico o hidrofóbico, añadiendo azúcares o ácidos grasos respectivamente (Xanthakis, 2010). La acetilación es una reacción que permite a los flavonoides hacerse más hidrofóbicos, al esterificarse con algún ácido graso y permite también aumentar la estabilidad del flavonoide en diversos medios. (Chebil, 2006)

### **3.7.5 Flavonoides modificados**

La modificación enzimática de flavonoides ha permitido mejorar sus propiedades de solubilidad en lípidos así como su estabilidad. Estas modificaciones consisten en la combinación con compuestos hidrofóbicos para generar moléculas anfifílicas. Los flavonoides glicosilados han sido esterificados con ácidos grasos o con ésteres vinílicos de ácidos grasos mediante la utilización de enzimas lipolíticas. También se han utilizado técnicas químico-enzimáticas para acetilarlos totalmente y hacerlos más hidrofóbicos; aunque se ha observado una disminución en su capacidad antioxidante (Mellou, 2006).

## **3.8 Reacciones de biocatálisis**

### **3.8.1 Reacciones químico enzimáticas: acetilación química y desacetilación enzimática (hidrólisis)**

En este tipo de reacciones, el flavonoide es acetilado químicamente y posteriormente se realiza una desacetilación enzimática de manera regioselectiva, para mejorar la estabilidad y solubilidad del compuesto sin perder su capacidad antioxidante.

En la presencia de un exceso de agua las lipasas catalizan la hidrólisis de los triacilglicérols de cadena larga y actúan sobre el enlace éster del carboxilo presente en los acilglicérols para liberar ácidos grasos y glicerol. La hidrólisis del sustrato comienza con el ataque del átomo de oxígeno procedente del grupo hidroxilo del residuo nucleofílico de serina, sobre el carbonilo del enlace éster del lípido. Se ha demostrado que las lipasas microbianas presentan una alta quimio, regio y estereo selectividad, lo que permite la modificación de compuestos naturales de interés. La desacetilación enzimática es complementaria a la



hidrólisis química. Las lipasas catalizan la desacetilación de los grupos acetilo de las posiciones 3' y 5' del anillo B, que son los que se ven involucrados en la actividad biológica. Los resultados de la desacetilación, contrastan con los obtenidos mediante la hidrólisis química debido a que los productos obtenidos por esta última no son regioselectivos (Virinder, *et al*, 1998).

### **3.8.2 Reacciones de esterificación enzimática**

La esterificación química de flavonoides con diferentes ácidos grasos ha sido patentada, pero este proceso no es regioselectivo y conduce a una funcionalización no deseada de los grupos hidroxifenólicos que son responsables actividad biológica. La esterificación enzimática utilizando lipasas y diferentes ácidos es más regioselectiva que la reacción química y permite mejorar no sólo la solubilidad en varios medios sino también su estabilidad y su papel antioxidante (Chebil, *etal*, 2006).

En este tipo de reacciones se aprovecha la capacidad de las enzimas para actuar en medios no acuosos evitando así la hidrólisis del enlace éster resultante en el flavonoide modificado. El uso de solventes orgánicos es altamente ventajoso sobre soluciones acuosas en reacciones que involucran reactivos con baja solubilidad en agua. Lo mismo ocurre cuando el agua participa como reactivo, permitiendo una modificación radical en el equilibrio a favor de la síntesis.

Además es necesario controlar el  $a_w$  del medio, utilizando diferentes estrategias como la adición de mallas moleculares, desecar los solventes utilizando soluciones saturadas de sales o llevando a cabo la reacción bajo condiciones de vacío para eliminar el agua formada durante la misma (Lambusta, *etal*, 2003)

Los resultados de la acilación enzimática de algunos flavonoides indican la viabilidad de estas reacciones y señalan el fuerte efecto del contenido de agua, la estructura del donador de acilo, la estructura básica de los flavonoides, el origen de la enzima y la naturaleza del solvente así como las condiciones de reacción

(temperatura y tiempo) con que se trabaje (Ardhaoui, *etal*, 2004). Sin embargo se ha observado que muchas de las enzimas necesitan que el donador de acilo esté activado para poder llevar a cabo la reacción.

### **3.8.3 Reacciones de transesterificación enzimática**

Otra de las estrategias usada para la lipofilización de compuestos bioactivos, es la transesterificación. Es una reacción catalizada que involucra el desplazamiento de un alcohol por un grupo acetilo de un éster, generando un nuevo éster. Convencionalmente, la transesterificación se puede realizar usando álcalis, ácidos o enzimas catalizadoras. Este tipo de reacciones utiliza a un donador de acilo activado, lo que facilita el reconocimiento de la enzima y genera mejores rendimientos (Dalla Rosa, *etal*, 2008)

## 4. ANTECEDENTES

### 4.1 Inmovilización de lipasas de *Bacillus pumilus* y su aplicación

En el grupo de trabajo se aisló un microorganismo lipolítico, en las aguas termales de la región de los Azufres, Michoacán Este microorganismo se identificó como *Bacillus pumilus* y se denominó a la cepa como GMA1. Se describió como un bacilo largo gram positivo esporulado que presenta diversas actividades hidrolíticas (xilanolítica y proteolítica), además de producir una lipasa extracelular (19.5kDa) que presenta preferencia por ácidos grasos de cadena corta como sustrato (Bustos, 1995).

El microorganismo de estudio produce una lipasa con características de interés ya que su pH y su temperatura óptimos son 10.5 y 50°C respectivamente. Se realizó la caracterización de un extracto enzimático de *Bacillus pumilus* GMA1 y se llevó a cabo su purificación parcial mediante cromatografía en columna de filtración, Superosa 12 de Pharmacia y el perfil electroforético reveló la presencia de un doblete con actividad lipolítica en la región correspondiente a 21 kDa y el punto isoeléctrico se localizó en la región correspondiente al intervalo de 8.68 – 9.3 de pH (Wong, 2001). Arpigny y Jaeger también reportaron la presencia de 2 enzimas lipolíticas con peso aproximados de 21kDa.

### 4.2 Desarrollo del biocatalizador

En el grupo de trabajo se desarrolló un biocatalizador con el extracto crudo de *B. pumilus* GMA1 y se determinaron las condiciones óptimas de inmovilización en un soporte microporoso de polipropileno (Accurel® MP1000) que incrementó la actividad lipolítica específica en un 55% en comparación con el extracto crudo libre al medirlo espectrofotométricamente mediante la hidrólisis de *p*-nitro fenil ésteres. La concentración del extracto crudo es de 2 mg proteína / mL, pH y fuerza iónica del buffer de reacción fueron de 9.0 y 50mM respectivamente, en un tiempo de 5 h a 4°C (Zúñiga, 2004).

### 4.3 Optimización del medio de cultivo

Posteriormente se optimizó un medio de cultivo para la producción de la lipasa, regulando las condiciones de incubación, siendo estas de 50°C durante 24 h, con una agitación de 100 rpm (Ruiz, 2007).

Tabla 12. Medio Optimizado para la producción de lipasa de *B. pumilus* GMA1

Componente	g/L
NaCl	5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.5
Tween 80	0.005
Glucosa	0.43
Glicerol	9.7
Sulfato de Amonio	3.26
Extracto de Levadura	2.94
Extracto de Carne	17.5
Aceite de Olivo	1.3
Condiciones	Cultivo 50°C, 24h, 100rpm Medio preparado en Buffer de fosfatos 0.05M pH 7.2 (Ibáñez, 2007)

En el genoma de *B. pumilus* existen 24 enzimas con actividad de carboxilesterasa. Sin embargo, la expresión de éstas depende del medio en el que se cultive el microorganismo y de la fuente utilizada como inductor. En el trabajo de Ibáñez (2007) no se determinó si el incremento de actividad específica se debió a la sobreproducción de la enzima termófila reportada anteriormente (Bustos, 1995), o bien a la expresión de otras enzimas con la misma actividad.

### 4.4 Reacciones preliminares

Se llevaron a cabo reacciones de síntesis e hidrólisis en compuestos con actividad biológica. Se hizo la reacción de transesterificación de tricaprilina con CLA y la desacetilación de ácido ferúlico (Ruíz,2008, Galindo y Álvarez, 2009).

## 5. JUSTIFICACIÓN

Las enzimas son biocatalizadores que favorecen la obtención de productos estereoespecíficos. Existe un número elevado de lipasas y estererasas, que permiten explorar diversas propiedades como termoestabilidad, esterreo-especificidad, regioselectividad de acuerdo a su origen. En el laboratorio se cuenta con una cepa de *Bacillus pumilus* GMA1 que es termófila y cuyo extracto enzimático muestra actividad a altas temperaturas y pH alcalino (Álvarez, Galindo 2009). Se desconoce su especificidad posicional. Por lo tanto, el presente trabajo pretende usar al extracto enzimático obtenido de *Bacillus pumilus* GMA1 que presenta actividad de lipasa para probar reacciones de desacetilación sobre compuestos antioxidantes naturales, cuyo poder se incrementa al desacetilarlos. Una vez desacetilados, se caracterizarán los productos de la reacción y se probará su poder antioxidante. El contar con nuevos métodos de producción de antioxidantes es útil para el sector alimentario, preocupado por diseñar nuevos productos funcionales.

## 6. OBJETIVOS:

### Objetivos generales:

- Evaluar las reacciones de esterificación, transesterificación y desacetilación de flavonoides con el biocatalizador obtenido a partir de la inmovilización de las carboxilesterasas de *Bacillus pumilus* GMA1 cultivado en el medio optimizado.
- Estudiar la regioselectividad del biocatalizador en las reacciones de esterificación, transesterificación y desacetilación de flavonoides.
- Conocer la estructura de los productos obtenidos de estas reacciones.

### Estrategias experimentales:

- Producción del extracto enzimático en el medio optimizado
- Acondicionamiento de la enzima, ajuste de pH y fuerza iónica
- Inmovilización de la enzima en Accurel MP1000
- Evaluar las reacciones de síntesis y de hidrólisis de flavonoides con el biocatalizador
- Caracterización de los productos de reacción de las reacciones de modificación enzimática de flavonoides

## 7. MATERIALES Y REACTIVOS

### Reactivos

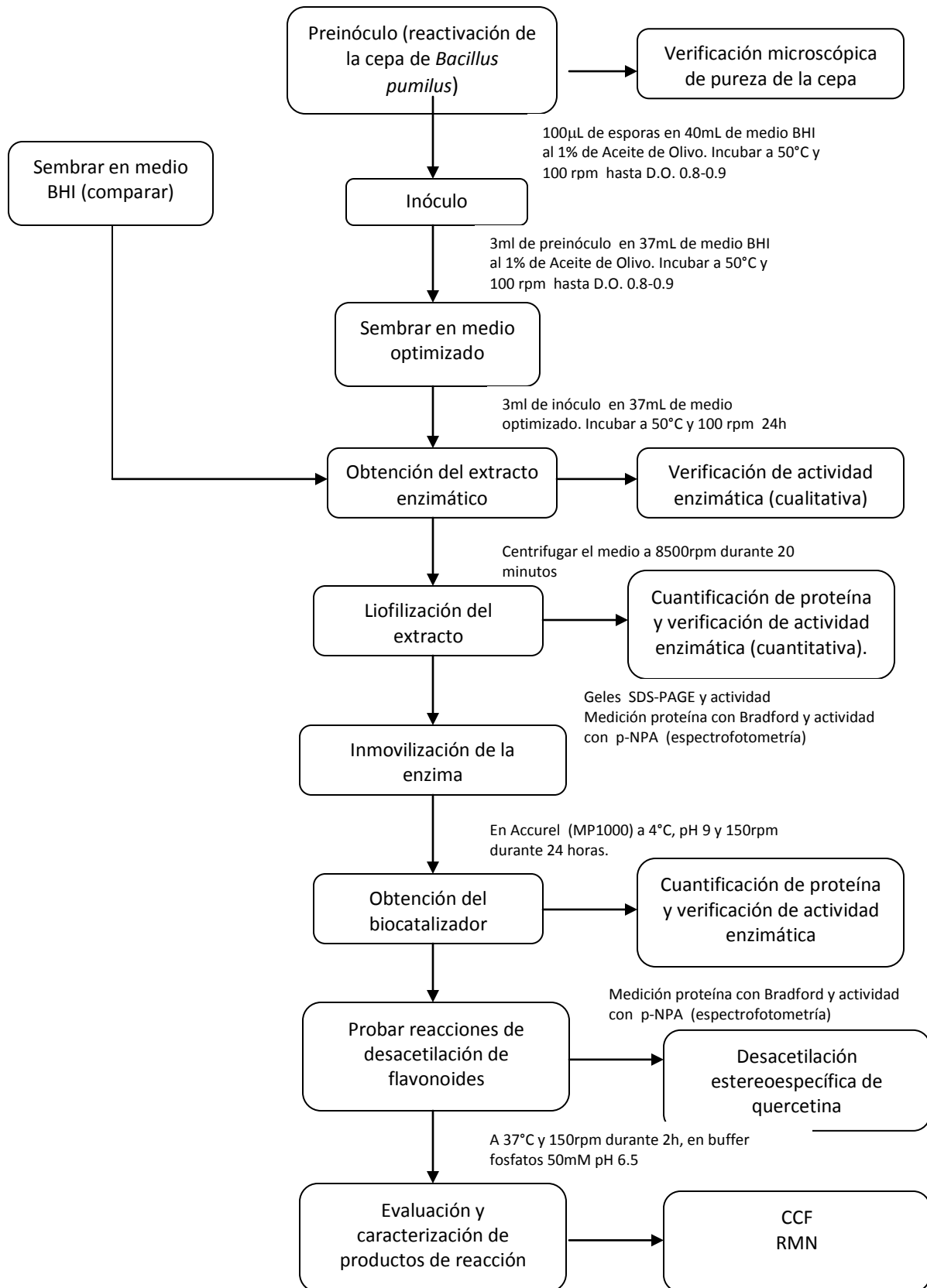
<i>Reactivo</i>	<i>Marca</i>
$\alpha$ -naftil acetato	Sigma
Aceite de Olivo	Sigma
Acetato de etilo	Sigma
Acetona	Sigma
Ácido acético glacial	Baker
Ácido clorhídrico	Baker
Acrilamida/bisacrilamida	BioRad
Accurel MP 1000®	
Agar	Disco
Anhídrido acético	Baker
BHI	Disco
BSA	Sigma
Caldo nutritivo	Bioxon
Cloroformo	Baker
Cloruro de amonio	Baker
Cloruro de fierro hexahidratado	Técnica Química
Cloruro de magnesio hexahidratado	Baker
Cloruro de manganeso tetrahidratado	Baker
Cloruro de sodio	Baker
<b>1,1-Difenil-dipicril</b> -hidrazil (DPPH)	Sigma
Éter de petróleo	Baker
Extracto de carne	Bioxon
Extracto de levadura	Oxoid
Fast Red	Sigma
Fosfato básico de sodio heptahidratado	Baker
Fosfato dibásico de sodio anhidro	Baker
Glicerol	Baker
Hidróxido de sodio	Baker
Hexano	Baker
Isopropanol	Mallinckrodt RA



Lipasa CAL-B	Novozyme
Metanol	Sigma
Mallas moleculares 4A	Sigma
Marcadores de bajo peso molecular	Fermentas
Naringina	Sigma
Nitrato de amonio	Baker
Piridina	Aldrich
<i>p</i> -nitrofenil acetato	Sigma
Quercetina	Sigma
Rutina	Sigma
Sílica gel G	Macherey-Nagel
SDS	BioRad
Sulfato de sodio	Sigma
Sulfato de amonio	Sigma
Sulfato sérico	Sigma
Tert-Butanol	Sigma
Tributirina	Sigma
Tolueno	Sigma

## 8. METODOLOGÍA

### 8.1 Diagrama de flujo del diseño experimental:



## 8.2 Conservación de *Bacillus pumilus* GMA1

La cepa de la que se partió, se encontraba congelada a  $-70^{\circ}\text{C}$  en agua destilada a partir del medio para esporulación. Para su posterior conservación se preparó un medio de cultivo para esporulación (Gerhardt, 1994).

Se prepararon 20mL de agar nutritivo al 1.5% y las soluciones A y B para esporulación. Una vez estériles se añadieron el agar y 160 $\mu\text{L}$  de la solución B a la solución A previamente esterilizada por filtración, se vació esta mezcla en una caja Petri y se dejó solidificar.

- Solución A: 0.0830 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.1979 g de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.0089 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  disuelto en 10mL de agua destilada. No se esteriliza por autoclave, sino por filtración y se almacenó a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Solución B: 0.535 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.106 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 0.068 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.097 g de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  disuelto en 8mL de agua destilada, se ajustó a pH 7 y se aforó a 10mL. Se esterilizó en autoclave al momento de preparar el agar y se almacenó a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### 8.2.1 Reactivación de la cepa y verificación morfológica

A partir de los viales de esporulación se inocularon 100 $\mu\text{l}$  de esporas en un matraz con 40mL de medio BHI al 1% de aceite de oliva preparado en un buffer de fosfatos de potasio 0.1M a pH 7.2 y se incubó a  $50^{\circ}\text{C}$  y 100rpm durante 24h. A partir de este matraz se realizó una tinción de Gram para verificar la pureza y la estabilidad de la cepa.

### **8.3 Verificación de la actividad enzimática**

Se preparó una caja con medio agar tributirina al 0.5% para observar la actividad enzimática mediante la presencia de halos en el medio por la hidrólisis de tributirina. Se inoculó una asada del preinóculo de *Bacillus pumilus* GMA1 con 24 horas de incubación y se incubó durante 24h a 50°C.

### **8.4 Producción enzimática**

Para obtener el inóculo, se inocularon 3mL del preinóculo en un matraz de 50mL con 37mL de medio BHI en buffer de fosfatos 0.1M a pH 7.2 con el 1% de aceite de oliva. Este matraz se incubó a 37°C y 100rpm hasta alcanzar una D.O. entre 0.8-0.9. Una vez obtenida esta densidad, se tomaron 3mL del inóculo y se sembraron en un matraz de 50mL con 37mL de medio optimizado. Se incubaron a 50°C durante 24h a 100rpm en una incubadora New Brunswick Scientific con agitación orbital.

Las células obtenidas de este medio se concentraron por centrifugación durante 20 min a 8,500 rpm y 4°C en centrífuga Beckman J2-MC, rotor JA10. El pellet se eliminó y se recolectó el extracto, el cual fue sometido a una extracción con éter 2:1 para desengrasar. Se eliminó la fase orgánica y se colectó la fase acuosa, la cual se mantuvo en agitación a 4°C durante 24h para eliminar los restos de solvente utilizado en la extracción. Se verificó cualitativamente la actividad enzimática del extracto utilizando  $\alpha$ -naftil acetato y un reactivo revelador de color (Fast Red®). La reacción se hizo en pozos y se incubó a 37°C durante 15 minutos.

### **8.5 Concentración del extracto enzimático.**

Después de evaporar todo el éter, el extracto se dividió en envases de plástico, distribuyendo 40mL de extracto en cada envase y se congeló utilizando hielo seco. Los envases ya congelados se almacenaron a -70°C durante 24h y se liofilizaron en una liofilizadora Labconco®. Una vez obtenido el liofilizado se almacenó a 4°C y se midió la cantidad de proteína por el método de Bradford así como la actividad

enzimática cuantitativamente por espectrofotometría utilizando como sustrato p-NPA.

## **8.6 Electroforesis**

### **8.6.1 Preparación de los geles de electroforesis**

Para corroborar la presencia de las enzimas de *B. pumilus* GMA1, se realizó una electroforesis en geles de SDS-PAGE y nativos (si SDS). Se utilizaron concentraciones de acrilamida/bis-acrilamida de 4% para el gel concentrador y 12% para el gel separador.

### **8.6.2 Preparación de las muestras para geles SDS-PAGE desnaturizante**

Se pesó 1g de liofilizado y se resuspendió en 4mL de buffer de fosfatos 0.1M pH 7.2. De esta solución se tomó 1mL para precipitar las proteínas con TCA. Una vez obtenido el pellet, se añadieron 100 $\mu$ l de buffer de fosfatos 0.1M pH 7.2 y 100 $\mu$ l del buffer de muestra 2x (0.0751 g de Tris, 0.2 g SDS, 1 mL glicerol, 0.001 g de Azul de Bromofenol aforados a 5 mL con agua destilada), el cual se mezcló en las siguientes proporciones con un agente desnaturizante (DTT 0.5 M o beta-mercaptoetanol): 400  $\mu$ L de buffer de corrida + 100  $\mu$ L de agente desnaturizante (DTT 0.5 M o beta-mercaptoetanol). Se resuspendió el pellet mezclando vigorosamente en un vortex y se calentó la mezcla durante 3 min a 70°C para desnaturizar las proteínas tras lo cual se almacenaron los tubos a -20°C hasta el momento de cargar en el gel.

Para los geles denaturalizantes que se revelaron para actividad, se tomaron 100mL de la muestra precipitada con TCA y se mezclaron con 25 $\mu$ l de buffer desnaturizante 4x sin  $\beta$ -mercaptoetanol y sin DDT y se cargaron 30 $\mu$ l sin calentar.

### **8.6.3 Preparación de las muestras para geles nativos**

Se pesó 1 g de liofilizado y se resuspendió en 4mL de buffer de fosfatos 0.1M pH 7.2. Se tomaron 100µl de muestra y se mezclaron con 25µL del buffer nativo 6x . Se cargaron 30µL en cada pozo.

En los geles se utilizaron marcadores de bajo peso molecular (Fermentas), cuyo rango está entre 116 a 14 kDa. La electroforesis se corrió a 80 mA durante 3 h, en una cámara de electroforesis Miniprotean II de BioRad. Los geles se tiñeron dependiendo el método deseado y para determinar el peso de las bandas se utilizó el densitómetro modelo GS 700 BioRad® y el programa Quantity-One®.

### **8.6.4 Tinciones para geles de electroforesis**

Dependiendo de las características finales que se quisieran observar en los geles de electroforesis, se emplearon distintas tinciones.

- Tinción con Azul de Coomassie

Al terminar la electroforesis, el gel se sumergió durante toda la noche, en agitación constante en 20 mL de solución teñidora de Coomassie. Pasado este tiempo, el gel se mantuvo inmerso en la cantidad de solución desteñidora necesaria hasta lograr la eliminación del excedente de tinción.

### **8.6.5 Revelado de actividad enzimática**

Para poder observar actividad enzimática en geles, se corrió un gel SDS-PAGE semidesnaturalizante (no DTT, no calor). Al terminar la electroforesis, el gel se lavó con buffer de fosfatos de sodio 0.05 M, pH 7.2 y se incubó en solución A de  $\alpha$ -naftil durante 20 min a 37°C. Transcurrido este tiempo, se agregó una solución B de Fast Red con la cual se reveló la actividad enzimática como una banda color marrón. El gel se guardó en buffer de fosfatos de sodio 0.05 M, pH 7.2 durante la noche a 4°C para seguir desarrollando la coloración.

*Solución A:* Se pesaron 5 mg de  $\alpha$ -naftil acetato, se disolvieron en 1.25mL de acetona y se llevó a un volumen final de 12.5 mL con buffer de fosfatos de sodio 0.05 M, pH 7.2.

*Solución B:* Se pesaron 12.5 mg de FastRed, se adicionaron 12.5  $\mu$ L de Tritón X-100 (0.1%) y se llevó a un volumen final de 12.5 mL con buffer de fosfatos de sodio 0.05 M, pH 7.2.

## **8.7 Inmovilización de la enzima**

### **8.7.1 Acondicionamiento del soporte**

Se inmovilizó la enzima mediante el método de adsorción, usando como soporte Accurel Mp 1000 el cual se sometió a un pretratamiento para acondicionarlo:

Se pesaron 2g del soporte y se mantuvieron en agitación constante en

- Etanol absoluto durante 30 minutos
- Etanol:Agua (1:1) durante 30 minutos. Tras lo cual se filtró al vacío para eliminar la mezcla.
- Agua desionizada durante 30 minutos.

Se volvió a filtrar al vacío para eliminar el agua y se colocó el Accurel en la estufa a 37°C durante 24h para secarlo.

### **8.7.2 Acondicionamiento del extracto**

Se prepararon 10mL de extracto a una concentración de 2mg/mL en un buffer Tris pH 9 50mM. Y se dejó acondicionar durante 24h para que la enzima se adaptara al nuevo medio.

### **8.7.3 Inmovilización de la enzima**

El extracto liofilizado se inmovilizó usando como soporte Accurel MP 1000 bajo las condiciones previamente reportadas: con una concentración del extracto de 2mg proteína/mL, bajo un pH de 9 y una fuerza iónica de 50mM durante 24 horas

a 4°C (Zúñiga, 2004): se pesó en un matraz de 50mL 1g de Accurel pretratado y se añadieron los 10mL de extracto previamente acondicionado. El matraz se colocó a 4°C y en agitación a 150rpm durante 24 h.

Una vez transcurridas las 24h se midió la cantidad de proteína por el método de Bradford y la actividad lipolítica se cuantificó mediante espectrofotometría utilizando como sustrato p-NPA.

## 8.8 Reacciones de biocatálisis de flavonoides

Una vez obtenido inmovilizada la enzima se llevaron a cabo las reacciones de biocatálisis en tres flavonoides: la quercetina, la rutina y la naringina para evaluar la efectividad del biocatalizador y caracterizarlo según su regioselectividad. Se realizaron 2 tipos de reacciones: de síntesis y de hidrólisis

### 8.8.1 Reacciones de síntesis

#### Esterificación directa

Se evaluó la capacidad de la enzima para llevar a cabo la esterificación directa de flavonoides con ácidos grasos de cadena media, específicamente el ácido octanoico. Se probaron diferentes condiciones de reacción, variando la cantidad de enzima, la  $a_w$  y el solvente.

**Tabla 1.5 Ensayo de condiciones de reacción para la esterificación directa**

Cantidad de enzima/ Unidades	Aw	Solvente		
		t-Butanol	THF	Acetona
10mg/22U	0.33	t-Butanol	THF	Acetona
	0.57	t-Butanol	THF	Acetona
20mg/ 43U	0.33	t-Butanol	THF	Acetona
	0.57	t-Butanol	THF	Acetona



La mezcla de reacción consistió en 50mg del flavonoide (quercetina, rutina o naringina) y 25% más del ácido octanóico (en relación molar). La  $a_w$  se controló mediante soluciones saturadas de sales: NaCl para lograr el valor de 0.33 y  $MgCl_2$  para el valor de 0.57. Estas soluciones saturadas se colocaron en un desecador junto con los solventes y la malla molecular durante 4 días hasta que se alcanzó el equilibrio deseado, siguiendo la metodología reportada (Kontogianni *et al*, 2003). Además a los viales de reacción se agregaron 100mg de malla molecular/mL de solvente para mantener la  $a_w$  constante.

Se corrió la reacción durante 72 horas a 40°C y 200rpm en una incubadora con agitación orbital Innova 4000 .

### **Transesterificación**

Se siguió la misma metodología que para la esterificación directa, para optimizar las condiciones de reacción, pero se utilizaron como donadores de acilo vinil acetato y vini isopropilato.

La mezcla de reacción consistió en 50mg del flavonoide y 25% más del donador de acilo (en relación molar). Se agregaron 100mg de malla molecular/mL para mantener la  $a_w$  constante según lo reportado previamente por Kontogianni *et al*, 2003.

Se corrió la reacción durante 72 horas a 40°C y en agitación a 200rpm en una incubadora con agitación orbital Innova 4000 .

## **8.8.2 Reacciones de hidrólisis**

### Acetilación de los sustratos

Para probar las reacciones de desacetilación enzimática fue necesario partir de los sustratos acetilados. El procedimiento consistió en calentar a 60-70°C durante 12 horas la siguiente mezcla de reacción: 100mg del sustrato, 1mL de anhídrido acético y 2mL de piridina.

## Desacetilación enzimática

Para evaluar la capacidad de hidrólisis de la enzima se emplearon 10mg (22U) del biocatalizador con 50mg de sustrato acetilado. Nuevamente se optimizaron las condiciones de reacción, evaluando diferentes solventes y tiempos de reacción. Se incubaron los viales de reacción a 37°C y 200rpm en una incubadora con agitación orbital Innova 4000, variando los tiempo de reacción.

**Tabla 1.6 Optimización de las condiciones de reacción para la desacetilación enzimática**

Tiempo	Solvente			
12h	Buffer pH7 + Acetona	Buffer pH6 + Acetona	Tolueno-butanol	Isopropanol
24h	Buffer pH7 + Acetona	Buffer pH6 + Acetona	Tolueno	Isopropanol
48h	Buffer pH7 + Acetona	Buffer pH6 + Acetona	Tolueno	Isopropanol

## 8.9 Recuperación de los productos

Transcurrido el tiempo de reacción, los viales se filtraron para separar la enzima y/o la malla y el filtrado se pasó a un embudo de separación para hacer una extracción con 3mL de acetato de etilo y recuperar la fase orgánica con la que se realizó la cromatografía en placa fina.

## 8.10 Cromatografía en capa fina (TLC)

Para evaluar si el biocatalizador preparado en el laboratorio era capaz de llevar a cabo las reacciones tanto de acetilación como de desacetilación, se corrieron cromatografías en capa fina (TLC) para observar si los compuestos resultantes de

la reacción tenían una polaridad diferente a los sustratos. Dependiendo de la reacción, se utilizaron diferentes sistemas de elución.

#### 8.10.1 Reveladores para TLC

Estas placas se revelaron con sulfato sérico para observar los compuestos orgánicos en general y con DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), un radical libre que reacciona con las sustancias con capacidad antioxidante generando una mancha de color amarillo sobre la superficie púrpura.

El DPPH es un radical estable que presenta una coloración violeta y que absorbe a 517nm. Al reaccionar con un compuesto bioactivo con capacidad antioxidante, se pierde la coloración violeta y da lugar a una amarilla. De esta forma es posible visualizar cualitativamente si el compuesto generado en la reacción presenta capacidad antioxidante.

#### 8.11 Purificación de los productos de reacción

Los ésteres obtenidos de las diferentes reacciones de síntesis se purificaron mediante una columna cromatográfica en sílica gel (grado 60). Se utilizaron diferentes sistemas de elución dependiendo del flavonoide que sirvió como sustrato. En el caso de la naringina, se utilizó un sistema de Hexano: Acetato de etilo: Acetona (5:4:1), para la rutina se usó Cloroformo: Metanol (8:2) y para la Quercetina Hexano:Acetato de Etilo: Acetona (5:4:1).

Para los productos de desacetilación enzimática se usó una columna de sílica gel G y los eluyentes fueron: para la Quercetina y Rutina Hexano:acetato de etilo (1:1) y para la naringina, cloroformo:metanol (8:2).

#### 8.12 Determinación de la estructura de los compuestos

Una vez purificados los productos de las diferentes reacciones, se analizaron mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  para conocer las estructuras. Este trabajo lo llevó a cabo el personal de la USAI, Facultad de Química.

## 9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

**9.1 Verificación de la pureza de la cepa:** A partir del preinóculo, se realizó una tinción de Gram para verificar la morfología y la pureza de la cepa de la que se partió. Como se observa en la figura 3, fue posible observar bacilos largos Gram positivos. También fue posible observar algunas formas esporuladas que al ser birrefringentes no fijaron el colorante.

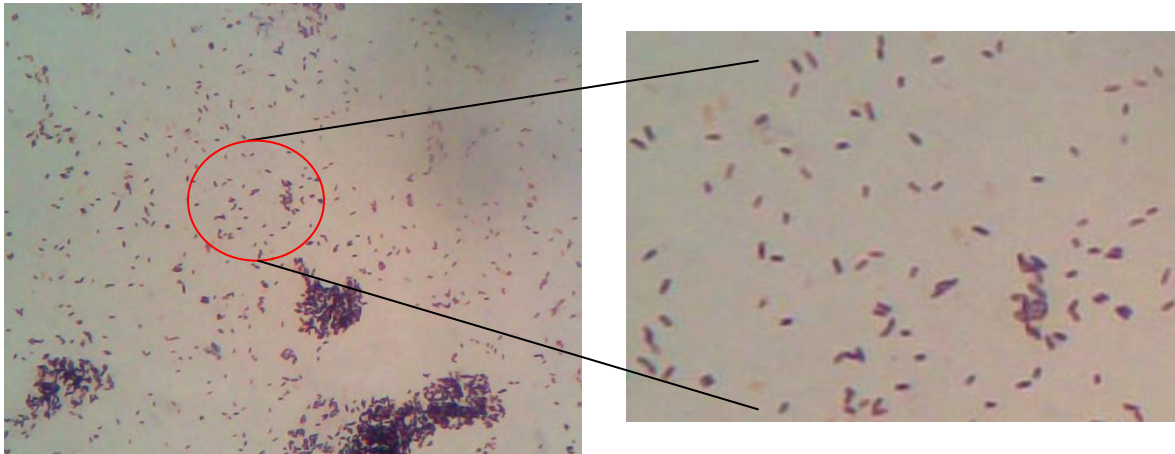


Figura .3: Observación al microscopio con objetivo 100x de la cepa de *B. pumilus* GMA1 y su respectiva ampliación

### 9.2 Verificación de la actividad lipolítica

Además, para verificar la actividad lipolítica de *Bacillus pumilus* GMA1, se sembró el preinóculo en una caja con agar tributirina al 0.5% y se incubó durante 24h a 37°C en una incubadora estática y fue posible observar la formación de halos lipolíticos alrededor de las colonias.

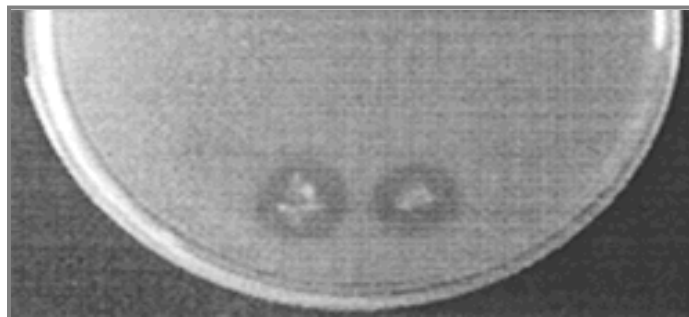


Figura 4.2: Observación de halos lipolíticos en agar con tributirina al 0.5%

### 9.3 Producción enzimática

Una vez verificada la pureza de la cepa, se sembró el inóculo y posteriormente se sembró en el medio optimizado (usando aceite de olivo como inductor de la producción de la lipasa). Luego de obtener el extracto enzimático se verificó que tuviera actividad, mediante una prueba cualitativa utilizando  $\alpha$ -naftil acetato y un reactivo revelador de color que es el Fast Red. La reacción se hizo en pozos y se incubó a 37°C durante 15 minutos.

Paralelamente al medio optimizado, también se sembró la cepa en medio BHI para el preinóculo y en medio BHI al 1% de Aceite de Olivo para el inóculo y la producción enzimática. También se obtuvo el extracto enzimático por centrifugación y se le realizó una la prueba de actividad cualitativa junto con el extracto obtenido del medio optimizado para verificar que la actividad en el medio optimizado fuera mayor.

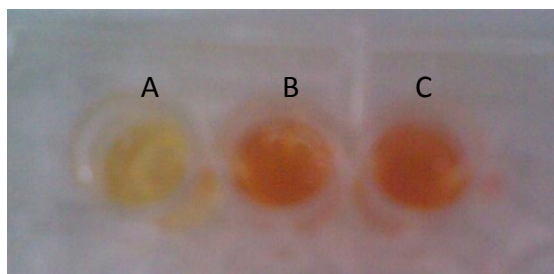


Figura 4.3: Verificación cualitativa de la actividad lipolítica de los extractos. A: control negativo (agua), B: medio BHI + 1% Aceite de olivo, C: medio optimizado

La figura 4.3 nos permite observar que si existe actividad lipolítica en ambos extractos, sin embargo se puede observar a simple vista que el extracto obtenido del medio optimizado tiene una coloración roja más intensa y por lo tanto presenta una mayor actividad. Para comprobar lo anterior, se liofilizaron ambos extractos y se midió nuevamente la actividad lipolítica cualitativamente.

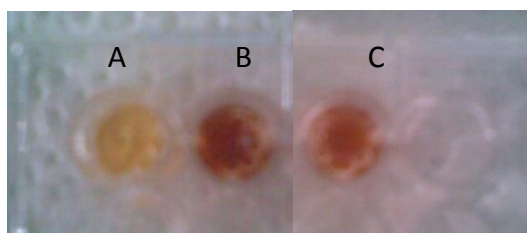
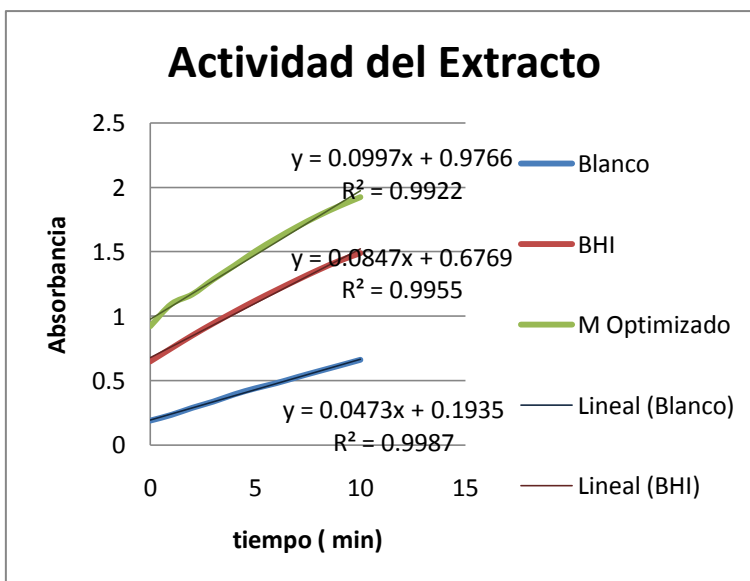


Figura 4.4: Verificación cualitativa de la actividad lipolítica de los liofilizados. A: control negativo (agua), B: medio Optimizado, C: medio BHI + 1% Aceite de olivo

Además se cuantificó proteína por el método de Bradford y la actividad lipolítica espectrofotométricamente utilizando como sustrato el p-NPA para tener valores numéricos mediante los cuales comparar la cantidad de proteína y actividad presente en el Medio Optimizado y en el BHI.

Tiempo (min)	Abs Blanco	Abs BHI	Abs M Opt
0	0.189	0.647	0.92
1	0.233	0.749	1.092
2	0.288	0.849	1.168
3	0.336	0.943	1.285
4	0.392	1.033	1.392
5	0.439	1.12	1.504
6	0.479	1.202	1.603
7	0.526	1.282	1.696
8	0.571	1.359	1.781
9	0.615	1.43	1.857
10	0.66	1.49	1.926



Gráfica 4.1: Actividad lipolítica contra p-nitrofenil-acetato de los extractos enzimáticos probados. En azul se observa el blanco de autohidrólisis, en rojo el extracto enzimático obtenido en medio BHI y en verde el extracto obtenido en medio optimizado.

A partir de las gráficas obtenidas, fue posible calcular la actividad enzimática de cada uno de los extractos. En la tabla 1.7 se muestran estos resultados:

Tabla 4.2: Comparación en el contenido de proteína y Actividad específica de los extractos obtenidos de los 2 medios de cultivo utilizados

Medio	Proteína (mg P/mL)	Actividad específica (U/mg P)
<b>Optimizado</b>	1.045	386.32
<b>BHI</b>	0.8812	318.32

\*Nota para preparar los extractos se pesó 1g de cada liofilizado y se disolvió en 4mL de buffer de fosfatos pH 7.2

Se realizó la prueba estadística de la T de student para ver si existían diferencias significativas con los resultados de ambos medios y se encontró que ni para la

cantidad de proteína, ni para la actividad específica se puede decir que hay diferencias significativas. Sin embargo, se decidió manejar el extracto obtenido del medio optimizado.

#### 9.4 Perfil de electroforesis

Después se corrieron geles de electroforesis para verificar que las enzimas corresponden en su PM a las reportadas anteriormente (Arpigny, Jaeger, 1999), y que no se expresaron otras que pudieran interferir con la actividad lipolítica, además de comprobar que el patrón de expresión era el mismo en los 2 medios (Optimizado y BHI).

Se corrieron 4 tipos de geles: 2 Desnaturalizantes (uno teñido con azul de Coomasie y el otro revelado como zimograma para ver las bandas de actividad) y 2 Nativos (uno teñido con azul de Coomasie y el otro como zimograma para actividad).

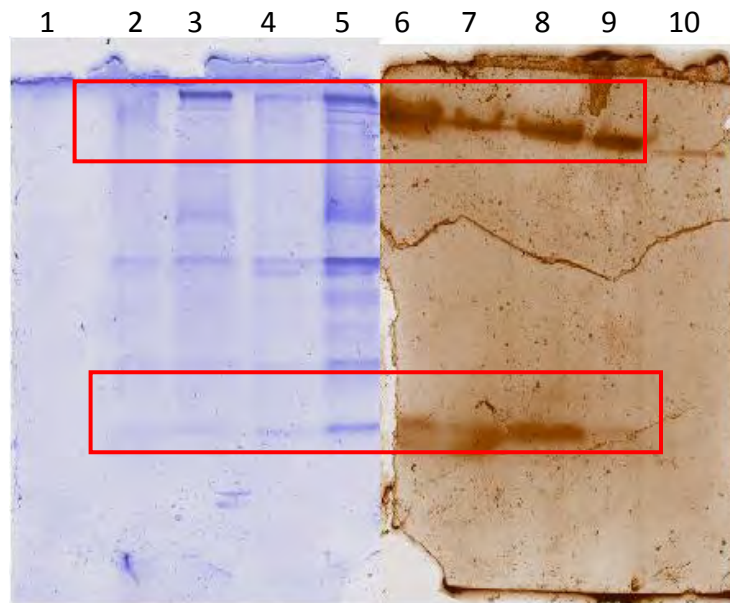


Figura 4.5: Gel Nativo Coomasie-Actividad

En el gel nativo, se pueden observar 2 regiones de bandas donde hay actividad, una cercana a los 21KDa y otra de peso molecular mucho mayor (160 kDa) que se



cree que corresponde a un agregado de las enzimas, porque no existen reportes en el genoma de Bacillus de enzimas lipolíticas con tan alto peso molecular.

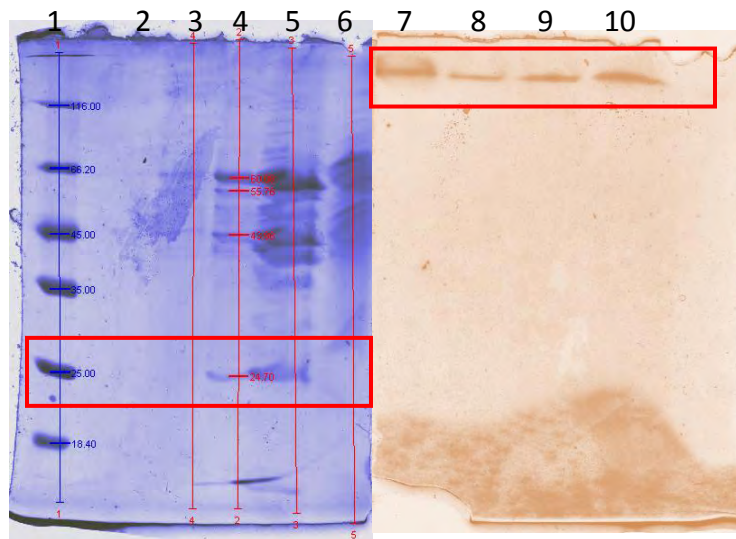


Figura 4.6: Gel Desnaturalizante Coomassie-Actividad

## 9.5 Inmovilización del extracto enzimático

Una vez que se comprobó la presencia de la banda de 21KDa que se esperaba, se realizó la inmovilización de la enzima, utilizando una columna de Accurel MP1000 como soporte. Se utilizó una relación de 10mL de extracto en 1g de soporte y la inmovilización se llevó a cabo durante 24h a 4°C y 150rpm

Tabla 1.8 Cuantificación de proteína y actividad para los 2 inmovilizados.

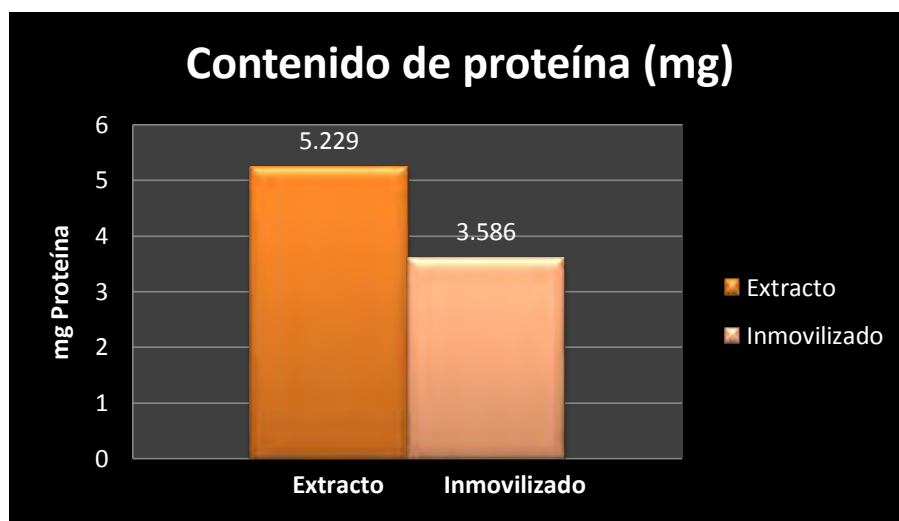
	Proteína (mg)	Actividad (U/mL)	Actividad específica
<b>Extracto</b>	5.229	194.5	371.96
<b>Sobrenadante</b>	1.643	74.028	
<b>Inmovilizado</b>	3.586	120.472	605.13
<b>Rendimiento</b>	<b>68.57</b>	<b>61.94</b>	

Nota: en ambos casos, el extracto se preparó utilizando el liofilizado y resuspendiéndolo en un buffer Tris pH 9 50mM según lo recomendó Zuñiga (2004). Los extractos se dejaron acondicionando durante 24h antes de inmovilizarlos.

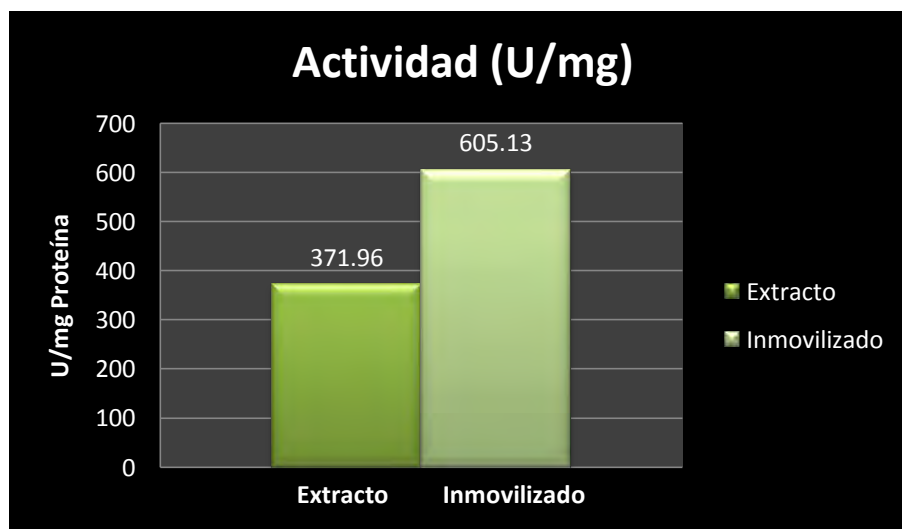
Los resultados plasmados en la tabla 1.8 dejan ver que la inmovilización en Accurel MP1000 permitió realizar una purificación del extracto crudo del medio

optimizado; ya que la cantidad de proteína es menor en el biocatalizador que en el extracto crudo; es decir; que hubo proteínas presentes en el extracto que no se unieron al soporte y por otro lado, la actividad específica se elevó. Con esto se demuestra que este tipo de inmovilización es selectiva para las lipasas dada la naturaleza hidrofóbica del soporte. Al final, se obtuvo un biocatalizador con una actividad de 2.17U por mg de Accurel.

En las siguientes tablas se observa una comparación entre la enzima libre y la inmovilizada en el contenido de proteína y la actividad específica, para que sea más fácil observar las diferencias:



Gráfica 4.2: Comparación en el contenido de proteína entre el extracto crudo y el biocatalizador



Gráfica 4.3: Comparación en la actividad específica entre el extracto crudo y el biocatalizador

En las gráficas anteriores se observa primeramente que el contenido de proteína en el inmovilizado es menor al contenido en el extracto. Esto puede explicarse porque en el extracto aun hay muchas otras proteínas (ya que no se realizaron pasos de purificación) y al inmovilizar, al usar una columna hidrofóbica como el Accurel que tiene una alta afinidad por enzimas como las lipasas (Al-Duri, 2000) se eliminaron en el sobrenadante muchas de las otras enzimas contenidas en el extracto. Al medir la actividad específica (U/mg proteína) ésta aumenta 1.62 veces para el inmovilizado. Y por lo tanto, se obtuvo un biocatalizador con **2.17U** por gramo de soporte.

## **9.6 Reacciones de biocatálisis**

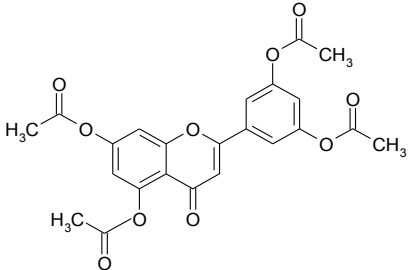
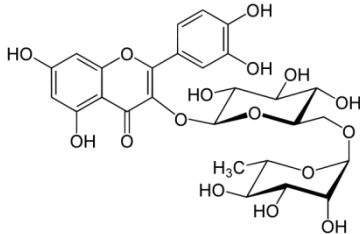
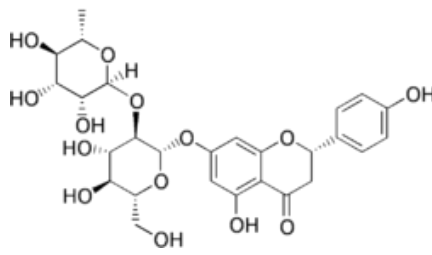
Dentro de las múltiples aplicaciones que existen para los biocatalizadores, se decidió probar las reacciones de desacetilación, esterificación y transesterificación de compuestos antioxidantes naturales. Con esto se busca generar moléculas anfifílicas bioactivas. (Nyaradzo, *etal*, 2009). Se realizó la acetilación y desacetilación enzimática de tres flavonoides: la quercetina la rutina y la naringina.

## **9.7 Reacciones de desacetilación (hidrólisis)**

### **9.7.1 Preparación de sustratos acetilados**

Se evaluó la capacidad de modificar sustratos acetilados por parte de la enzima de *Bacillus pumilus* GMA1 y de la lipasa comercial de *Candida antarctica*. Los sustratos utilizados fueron acetilados químicamente y se evaluó su pureza mediante TLC.

*Flavonoides:*

SUSTRATO ACETILADO	PUNTO DE FUSIÓN (°C)	PESO MOLECULAR (g/mol)	ESTRUCTURA QUÍMICA
Quercetina	181	412.36	
Rutina	102	610.53	
Naringina	165.85	580.54	

### 9.7.2. Optimización de las condiciones de reacción (solvente y tiempo)

Se probaron las diferentes condiciones de reacción utilizando como sustrato a la quercetina acetilada. a continuación se muestran las placas de TLC para las diferentes condiciones evaluadas tanto de tiempo como de solvente:

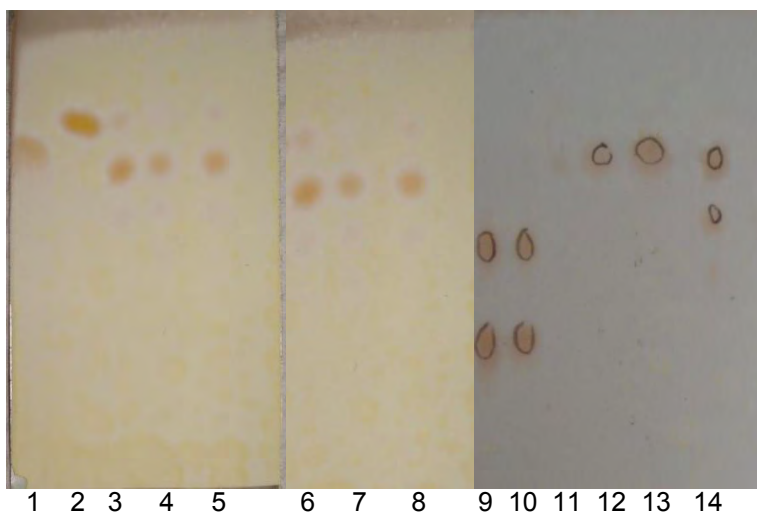


Figura 4.8: Cromatografía en capa fina de la optimización de solvente para reacción de desacetilación de quercetina revelada con sulfato sérico. 1: Quercetina, 2: Quercetina Acetilada, 3: Reacción con buffer pH7 B. pumilus, 4: Reacción con buffer pH7 C. antarctica, 5: Reacción con buffer pH 7 Autohidrólisis 6: Reacción con buffer pH6 B. pumilus, 7: Reacción con buffer pH 6 C. antarctica, 8: Reacción con buffer pH 6 Autohidrólisis, 9: Reacción con Isopropanol B. pumilus, 10: Reacción con Isopropanol C. antarctica, 11: Reacción con Isopropanol Autohidrólisis, 12: Reacción con Tolueno-Butanol B. pumilus, 13: Reacción con Tolueno-Butanol C. antarctica, 14: Reacción con Tolueno-Butanol Autohidrólisis

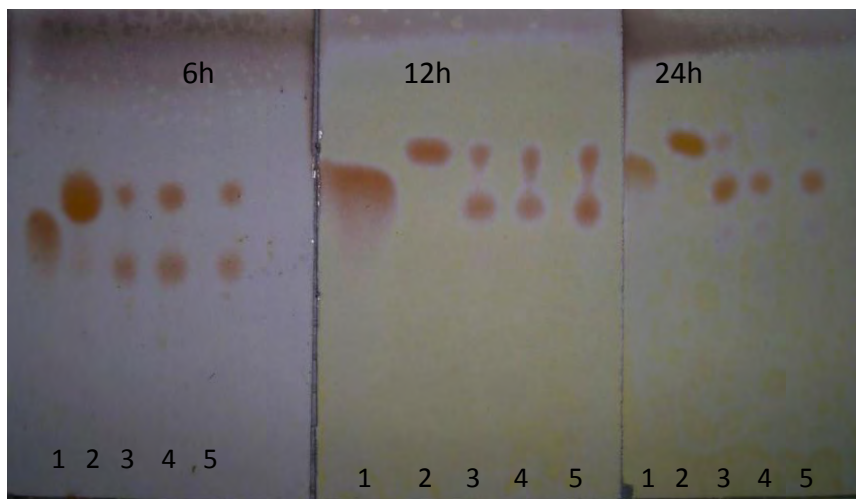


Figura 4.9: Cromatografía en capa fina de la cinética de reacción de desacetilación de quercetina revelada con sulfato sérico. 1: Quercetina, 2: Quercetina Acetilada, 3: Reacción con B. pumilus, 4: Reacción con C. antarctica, 5: Reacción de Autohidrólisis

En el caso de la prueba de solventes, se observa que la reacción llevada a cabo con buffer de fosfatos y acetona genera siempre un producto de autohidrólisis, que

nos impide verificar la acción enzimática. Por lo tanto, se utilizaron diferentes solventes orgánicos para eliminar la autohidrólisis. Como se observa, sólo se llevó a cabo la reacción al utilizar isopropanol.

En cuanto al ensayo cinético, se observa que la mejor conversión se da a las 48 horas ya que en este tiempo prácticamente ha desaparecido todo el sustrato.

Por lo tanto, las condiciones óptimas dentro de las que se probaron para la reacción de desacetilación enzimática son utilizando isopropanol como solvente e incubando la reacción durante 48 horas.

### 9.7.3 Identificación de los productos de desacetilación enzimática

A continuación se muestran los resultados de la CCF para las reacciones de desacetilación:

**Quercetina:** La placa se corrió en la siguiente fase móvil: Hexano:Acetato de etilo:Acetona (5:4:1 v:v:v)

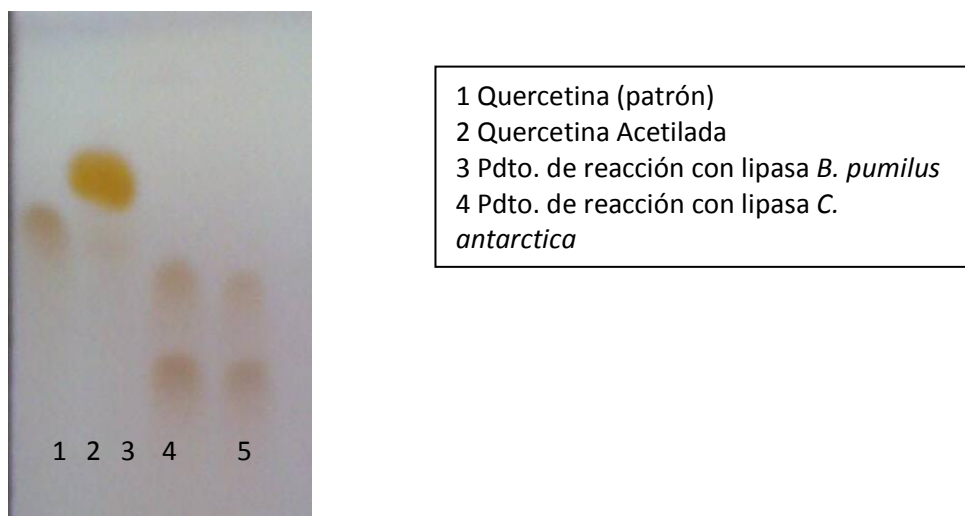
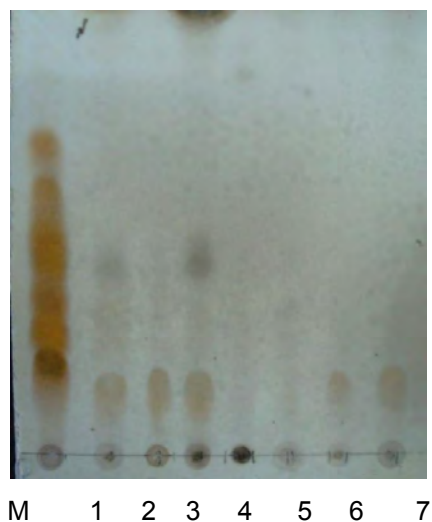


Figura 4.10: Cromatografía en capa fina de la reacción de desacetilación de quercetina revelada con sulfato sérico. 1: Quercetina,  $R_f = 0.60$ , 2: Quercetina Acetilada,  $R_f = 0.66$ , 3 Reacción con lipasa de *B. pumilus*,  $R_f = 0.597$ , 4: reacción con lipasa *C. antarctica*,  $R_f = 0.599$ ,

La placa cromatográfica reveló la presencia de tres productos de desacetilación lo que significa que la desacetilación se efectuó en posiciones distintas por lo que

se puede afirmar que esta enzima presenta estereoespecificidad en este tipo de sustratos. Además se observa que estos productos corresponden a los generados cuando se utiliza la lipasa comercial de *Candida antarctica*. Para purificar los productos de la reacción, se utilizó una columna cromatográfica de sílica gel.

Los productos de desacetilación se purificaron mediante una cromatografía en columna utilizando sílica 60 en una relación 1:50 utilizando como eluyente Acetato de etilo: Hexano: Acetona (5:4:1v:v:v)



Se recuperaron las fracciones 3 y 6, las cuales se mandaron a analizar mediante RMN.

Naringina: La placa se corrió usando como fase móvil Cloroformo: Metanol (8:2 v:v)



- 1 Naringina (patrón)
- 2 Naringina Acetilada
- 3 Pdto. de reacción con lipasa *B. pumilus*
- 4 Pdto. de reacción con lipasa *C. antarctica*
- 5 Reacción de autohidrólisis

Figura 4.12: Cromatografía en capa fina de la reacción de desacetilación de naringina revelada con sulfato sérico. 1: Naringina, Rf = 0.60, 2: Naringina Acetilada, Rf = 0.66, 3 Reacción con lipasa de *B. pumilus*, Rf = 0.597, 4: reacción con lipasa *C. antarctica*, Rf = 0.599,

En el caso de la naringina, se observa un único producto de desacetilación, sin embargo también se observa que la conversión no es total ya que en la placa se observa todavía un poco de sustrato. Para purificar el producto de desacetilación nuevamente se utilizó una columna de sílica 60 y se eluyó con Cloroformo: Metanol (8:2 v:v). se colectaron fracciones de 40mL y se encontró el producto entre las fracciones 3 y 6. Estas fracciones se concentraron a presión reducida y se mandaron a analizar por RMN.

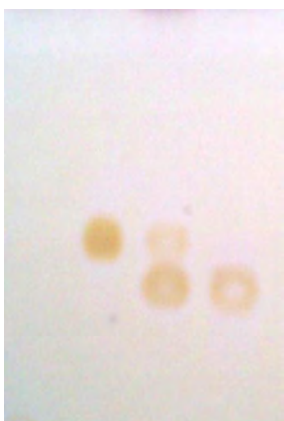


Figura 4.12: Resultado de la purificación del producto de desacetilación enzimática de la naringina. 1: Naringina, 2: Naringina acetilada 3: Concentrado de las fracciones 1-2, 4: Concentrado de las fracciones 3-6.

Rutina: se utilizó como fase móvil Cloroformo: Metanol (8:2 v:v)



Figura 4.13: Reacción de desacetilación de la Rutina. 1: Rutina, 2: Rutina acetilada 3: Reacción de autohidrólisis, 4: Reacción con *B. pumilus*, 5: Reacción con *C. antarctica*



En la TLC se observa que la reacción da como resultado varios productos, por lo que fue necesario separarlos mediante una columna de sílica gel, utilizando como fase móvil hexano:acetato de etilo en un gradiente de proporciones de 9:1 hasta 1:1. Las diferentes fracciones se concentraron y se mandaron a analizar por RMN.

En general, se puede observar que para la reacción de desacetilación enzimática con los tres flavonoides los productos obtenidos al utilizar el biocatalizador son los mismos que los obtenidos al utilizar la enzima comercial de *Candida antarctica*.

Se tienen reportes previos donde se utilizan otras enzimas comerciales que logran desacetilar regioselectivamente a algunos flavonoides como la rutina y a otros arabinonucleósidos; entre las enzimas utilizadas están las lipasa de *Candida rugosa* (CRL, Sigma), *Pseudomonas* sp (PSL, Sigma), *Pseudomonas cepacia* (PCL, Sigma), la esterasa de hígado de cerdo (PLE, Sigma) y la proteasa de *Bacillus licheniformis* (subtilisina, Sigma) (Sabaini, 2010) y sólo la enzima PLE pudo llevar a cabo la desacetilación enzimática.

Con base en estos reportes previos, se puede asegurar que la desacetilación enzimática de los flavonoides glicosilados se lleva a cabo preferencialmente sobre la parte del azúcar ( Sabaini, 2010), lo que permite generar moléculas anfífilas que conserva su poder antioxidante. En el caso de la quercetina que sólo presenta la parte del aglucón, la desacetilación se lleva a cabo en las posiciones 3' y 7 que son las que intervienen para dar la actividad antioxidante.

## **9.8 Reacciones de síntesis**

### **9.8.1 Optimización de las condiciones de reacción**

Tras probar las diferentes condiciones de reacción reportadas en la tabla 1.7 utilizando como sustrato a la rutina, se hicieron TLC para observar los resultados:

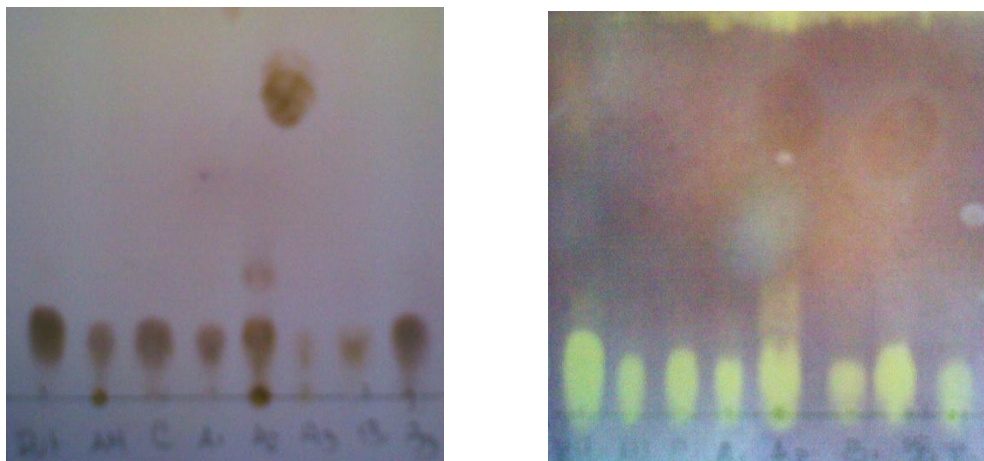


Figura 4.14: Optimización de las condiciones de reacción. Las placas fueron reveladas con sulfato sérico y con DPPH 1: Rutina, 2: Autohidrólisis, 3: THF 40mg, 4: THF 20mg, 5:t-BuOH 40mg, 6:t-BuOH 20mg, 7: Acetona 40mg, 8:Acetona 20mg

Los resultados mostrados en las placas, indican las condiciones óptimas son con ter-butanol, utilizando 20mg de enzima y con una  $a_w$  de 0.33 ya que con la  $a_w$  de 0.57 no hubo reacción bajo ninguna condición.

### 9.8.2 Esterificación directa

Quercetina: Se eluyó la placa con Acetato de etilo: Hexano: Acetona (5:4:1 v:v:v)

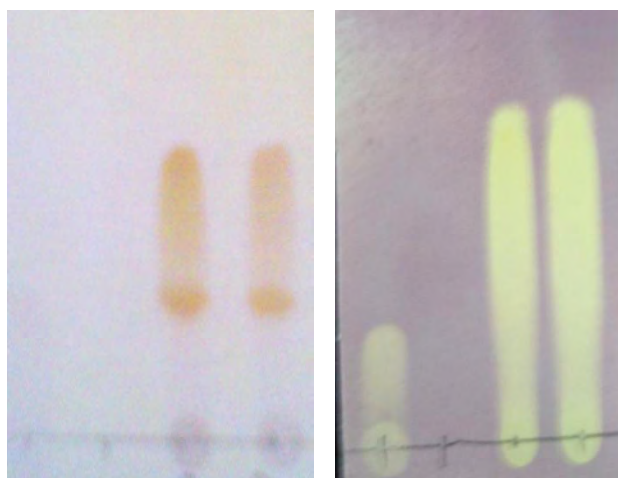


Figura 4.15: Esterificación directa Quercetina. 1: Quercetina, 2: Acido octanoico 3: Reacción con *B. pumilus*, 4: Reacción con *C. antarctica*

Como el porcentaje de conversión no es del 100%, fue necesario purificar el producto mediante una columna cromatográfica de sílica gel en una relación 1:40, usando el mismo eluyente usado para las TLC. Se colectaron fracciones de 40ml. El producto puro se obtuvo en las fracciones 5-8 las cuales se concentraron a presión reducida.

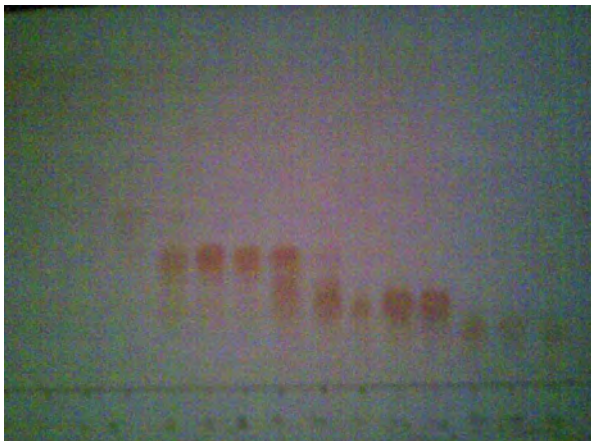


Figura 4.16: Purificación de la quercetina esterificada con ácido octanoico. 1: Fracción 4, 2: Fracción 5

Se mandó a analizar mediante RMN.

**Naringina:** la placa se corrió utilizando como fase móvil Cloroformo: Metanol (8:2 v:v)



Figura 4.17: Reacción de esterificación de la naringina con ácido octanoico. 1: Naringina, 2: Reacción con *B. pumilus*, 3: Reacción con *C. antarctica*

Para purificar el producto esterificado, se realizó una columna cromatográfica con sílica gel (relación 1:40). Se eluyó con Cloroformo: Metanol (8:2 v:v) y se colectaron fracciones de 40mL

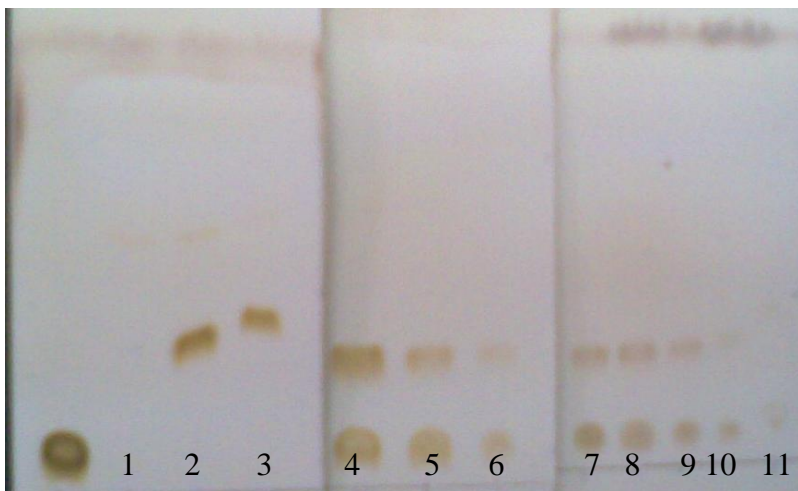


Figura 1.18: Purificación de la naringina esterificada con ácido octanoico.

Las fracciones donde el producto se encuentra puro son la 2 y la 3. Estas se concentraron a presión reducida y se mandaron a analizar por RMN.

**Rutina:** se utilizó como fase móvil Cloroformo: Metanol (8:2 v:v)

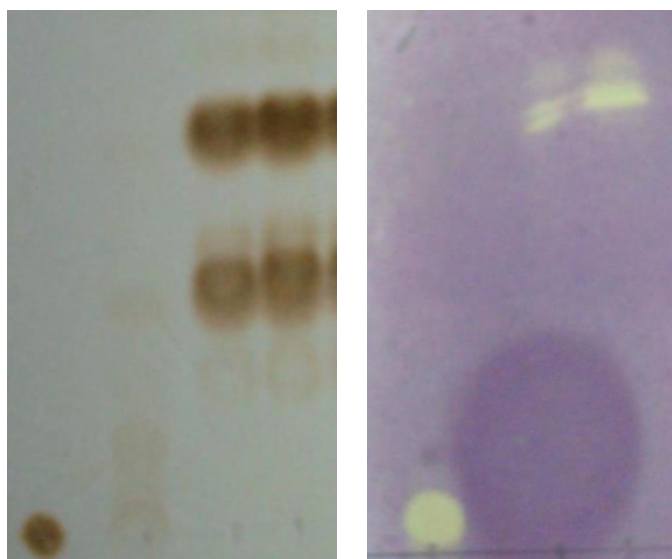


Figura 4.19: Reacción de esterificación de la rutina, revelada con sulfato sérico y DPPH. 1: Rutina, 2: Acido octanoico, 3: Reacción con *B. pumilus*, 4: Reacción con *C. antarctica*

En el caso de la rutina, se observa que la esterificación nos da 2 productos, sin embargo sólo uno de ellos presenta actividad antioxidante como se puede observar al revelar la placa con DPPH. Los productos se purificaron mediante una columna cromatográfica con sílica gel (relación 1:40). Se colectaron fracciones de 40mL.

En la literatura existen numerosos reportes sobre la esterificación directa de flavonoides utilizando diferentes enzimas como la subtilisina, la lipasa PS de *Pseudomonas cepacea*, y la lipasa B de *Candida antarctica*. En la mayoría de estos reportes, los flavonoides son esterificados con donadores de acilo activados, generando rendimientos bajos para la mayoría de las enzimas utilizadas ( Chebil 2006). Además se ha reportado que al utilizar ácidos grasos de cadena media los rendimientos más altos se observan al utilizar la lipasa B de *Candida antarctica* y con tiempos de reacción largos de hasta 240h ( Kontogianni et al 2003).

Por otro lado, los reportes indican que la naturaleza y tipo de la enzima va a afectar directamente en la regioselectividad de la reacción, pero para la rutina y la naringina sólo se obtienen monoésteres sustituidos en el hidroxilo de la posición 6 de la glucosa (Danieli, et al 1990) al utilizar la lipasa de *C. antarctica*. Dado que los productos de reacción para la esterificación directa obtenidos al utilizar el biocatalizador de *Bacillus pumilus*, son los mismo que se obtienen al utilizar la enzima comercial podemos confirmar que los flavonoides glicosilados (rutina y naringina) están sustituidos en la posición 6 de la glucosa.

En el caso de la quercetina se propone nuevamente que la esterificación se lleva a cabo en la posición 3, dado que esta posición no entra en juego para la actividad antioxidante del flavonoide y no está impedida estéricamente ni forma puentes con el carbonilo del anillo central.

### 9.8.3 Transesterificaciones

**Quercetina:** Se utilizó como eluyente Acetato de etilo: Hexano: Acetona (5:4:1 v:v:v).

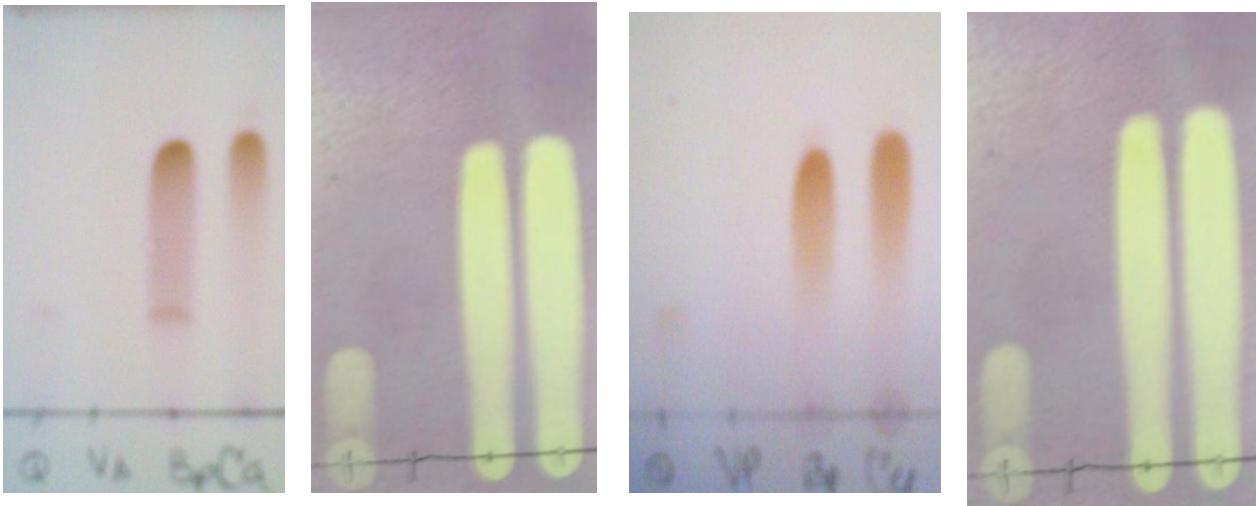


Figura 4.20: Reacciones de transesterificación de quercetina. A: Vinil acetato. B: Vinil isopropilato. 1: Quercetina 2:VA o VP, 3: Reacción con *B. pumilus*, 4: Reacción con *C. antarctica*

Se observa claramente que la reacción se llevó a cabo, y aunque la conversión no es total cuando se utiliza vinil acetato, sí lo es cuando se usa vinil isopropilato. Los productos resultantes conservan su actividad antioxidante, como se observa al revelar las cromatoplasmas con DPPH.

Los productos se concentraron a presión reducida y se mandaron directamente a RMN (Ver Anexo 1)

Naringina: Se utilizó como eluyente Cloroformo: Metanol (8:2 v:v)

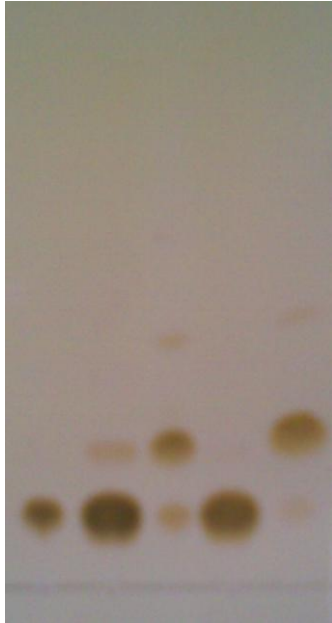


Figura 4.21 Reacciones de transesterificación de naringina. 1: Naringina 2: Reacción con *B. pumilus* y vinil acetato, 4: Reacción con *C. antarctica* y vinil acetato, 5: Reacción con *B. pumilus* y vinil isopropilato, 6: Reacción con *C. antarctica* y vinil isopropilato

Nuevamente se puede observar, que el extracto inmovilizado de *B. pumilus* logró llevar a cabo la reacción de transesterificación de la naringina, acetilando a la molécula en una sola región, de la misma manera que lo hace la enzima comercial Novozyme 435.

Para purificar los producto, se realizó una Cromatografía en capa fina preparativa que se eluyó 2 veces con Cloroformo: Metano (8:2 v:v). Las 2 fracciones obtenidas

se extrajeron con metanol y se concentraron a presión reducida. Se verificó la pureza mediante CCF:



Figura 4.22: Purificación de la naringina transesterificada con vinil isopropilato. 1: Naringina, 2: Fracción 1, 3: Fracción 2

Una vez separadas dichas fracciones, se mandaron a analizar por RMN para conocer la estructura (ver Anexo 1).

**Rutina:** Se eluyó con Cloroformo:Metanol (8:2 v:v)

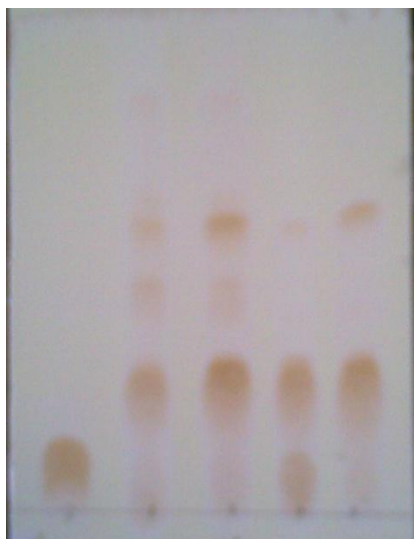


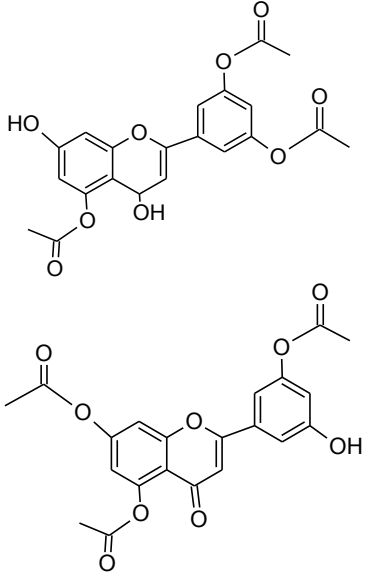
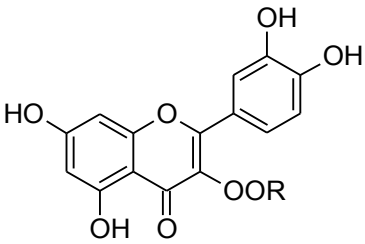
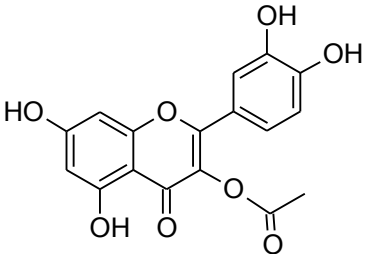
Figura 4.23: Reacciones de transesterificación de la rutina. 1: Rutina 2: Reacción con *B. pumilus* y vinil acetato, 4: Reacción con *C. antarctica* y vinil acetato, 5: Reacción con *B. pumilus* y vinil isopropilato, 6: Reacción con *C. antarctica* y vinil isopropilato

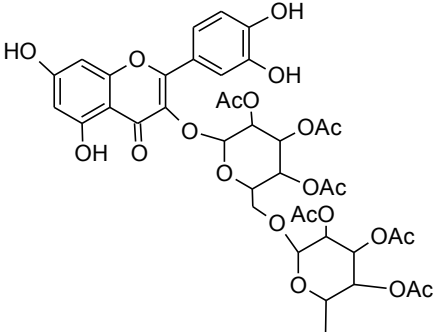
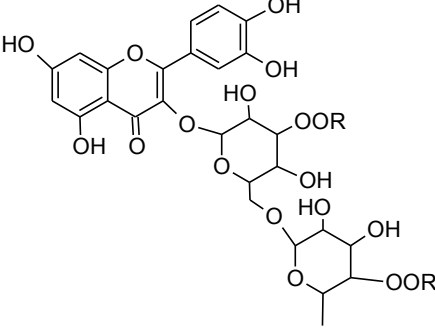
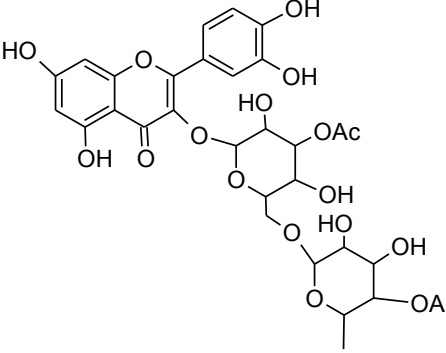
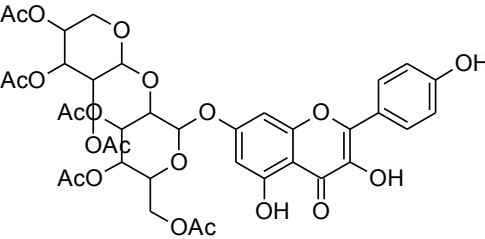


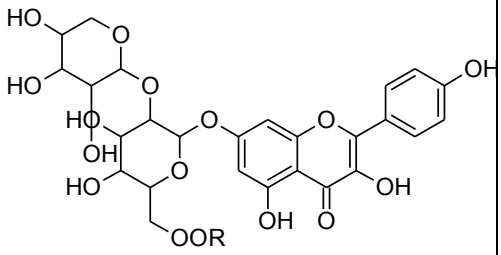
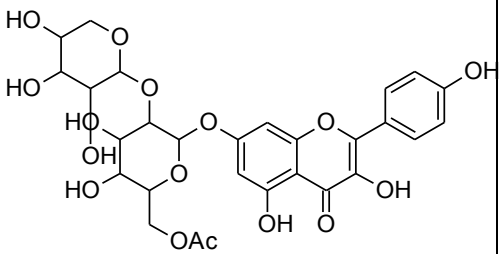
En el caso de la reacción de transesterificación de la rutina, se observa que el inmovilizado de carboxilesterasas de *B. pumilus* logró llevar a cabo la acetilación de la molécula de la misma manera que la enzima comercial con los dos donadores de acilo probados. Sin embargo, se observa que cuando se utiliza vinil acetato se obtienen varios productos de acetilación; y con el vinil isopropilato sólo se observa principalmente uno.

De las tres estrategias probadas para la modificación enzimática de flavonoides, la transesterificación resultó la mejor de las estrategias ya que la reacción se lleva a cabo en menor tiempo y cualitativamente se observó que la conversión resultó ser mayor. Por otro lado, esta reacción sobre flavonoides glicosilados sólo se había reportado previamente con la lipasa B de *C. antarctica* y la lipasa PCL de *Pseudomonas cepacea* (Nakajima et al, 1999) por lo que es importante que este nuevo biocatalizador haya llevado a cabo la reacción de forma muy similar a la enzima comercial más utilizada. Nuevamente se observa que la posición acetilada es como se ha reportado (Danieli, et al 1990), la posición 6 de la glucosa para la naringina y la rutina, y en el caso de la quercetina se acetila la posición 3.

En la siguiente tabla se resumen los resultados obtenidos para los 3 flavonoides y las 3 estrategias seguidas para su modificación. Se presentan las estructuras de los productos obtenidos basándonos en los resultados de la RMN y en los datos reportados previamente en la bibliografía para las reacciones donde se utiliza la lipasa B de *Candida antarctica* puesto que el biocatalizador inmovilizado con las carboxilesteras de *Bacillus pumilus* presentó el mismo patrón que la enzima comercial.

Flavonoide	Reacción	Resultado	Producto observado	
Quercetina	Desacetilación	Positivo		
	Esterificación	Positivo		
	Transesterificación	Positivo		

	Desacetilación	Positivo	 <p>The structure shows a rutin molecule where all hydroxyl groups on the glucose and galactose moieties are acetylated (OAc). The aglycone part consists of a flavanone core with two hydroxyl groups on the A-ring and two on the C-ring.</p>	
Rutina	Esterificación	Positivo	 <p>The structure shows a rutin molecule where the hydroxyl groups on the glucose and galactose moieties are esterified with an 'OOR' group. The aglycone part is the same as in the first structure.</p>	
	Transesterificación	Positivo	 <p>The structure shows a rutin molecule where the hydroxyl groups on the glucose and galactose moieties are acetylated (OAc), and the aglycone part is the same as in the first structure.</p>	
	Desacetilación	Positivo	 <p>The structure shows a rutin molecule where the hydroxyl groups on the glucose and galactose moieties are acetylated (OAc), and the aglycone part is the same as in the first structure.</p>	

Naringina	Esterificación	Positivo	
	Transesterificación	Positivo	

## 10. CONCLUSIONES

- Se logró obtener un catalizador a partir del extracto crudo de las carboxilesterasas de *Bacillus pumilus* GMA1, el cual presentó una mayor actividad que el extracto crudo, debido a que la inmovilización por adsorción en soportes hidrofóbicos permite dar estabilidad a las lipasas y estererasas. Este biocatalizador tiene 2.17U/mig de Accurel
- Se logró llevar a cabo la modificación de los 3 flavonoides estudiados, por las 3 estrategias utilizadas.
- El biocatalizador inmovilizado de *B. pumilus* GMA1 realizó la desacetilación regioselectiva de diversos flavonoides, así como la esterificación y transesterificación de los mismos, manteniendo su poder antioxidante.
- Para la reacción de desacetilación, los productos obtenidos son comparables con los obtenidos con la enzima comercial de *C. antarctica* (Novozyme 435) para los 3 flavonoides.
- En la reacción de esterificación, se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con la lipasa comercial, aunque se observa que el porcentaje de conversión no es total, y todavía se podrían optimizar más las condiciones de trabajo. Por esta vía se obtienen los flavonoides mas lipofilizados debido a que se usó un ácido graso de cadena media para llevar a cabo la reacción
- La reacción de transesterificación fue la que presentó un mayor porcentaje de conversión en tiempos más cortos de reacción. Se logró llevar a cabo la

reacción para los 3 flavonoides utilizados, obteniendo los mismos productos que con la lipasa comercial.

- Se logró la obtención de compuestos bioactivos (flavonoides) liposolubles que pueden ser aplicados en el área de alimentos y cosmética. El perfil de los productos en los tres casos fueron los mismos que los reportados para la lipasa comercial de *Candida antarctica*.
- El análisis por RMN de la estructura de los flavonoides modificados obtenidos, y la verificación de actividad antioxidante mediante CCF revelada con DPPH mostró que el biocatalizador es regioselectivo para este tipo de sustratos y les permite conservar su actividad antioxidante.

## 11. BIBLIOGRAFIA

1. Al-Duri B y Yong YP, 2000, Lipase immobilisation: an equilibrium study of lipases immobilised on hydrophobic and hydrophilic/hydrophobic supports, *Biochem Eng J*, 4, 207-215
2. Ardhaoui M, Falcimaigne A, et al, 2004, Effect of acyl donor chain length and substitutions pattern on the enzymatic acylation of flavonoids, *J. of biotec*, 110, 265-271
3. Arpigny J. y Jaeger K, 1999, Bacterial Lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.* 343, 177-183.
4. Arroyo M, 1998, Immobilized enzymes: theory, methods and applications, *Ars Pharmaceutica*, 39, 23-49
5. Berkeley, N. et al, 1984, Identificación of *Bacillus* species. *Meth. Microbiol.* 16: 291-328.
6. Bustos I, 1995, Aislamiento selectivo de un microorganismo productor de lipasa proveniente de un ambiente extremo Tesis de Licenciatura, UNAM.
7. Chaplin, M, 1992, *Enzyme Technology*, Edit. Cambridge. 40-46.
8. Chebil L, Humeau C, et al, 2006, Enzymatic acylation of flavonoids, *Process Biochemistry*, 41: 2237-2251

9. Dalla Rosa C, Morandim M B, et al 2008, Lipase-catalyzed production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed propane, *J. of Supercritical fluids*, 47, 49-53
10. Danieli B, et al, 1990, Enzyme-mediated acylation of flavonoid monoglycosides, *Heterocycles*, 29: 2061-2064.
11. Degrassi, G, Okeke, et. al, 1998, Purification and Characterization of an Acetyl Xylan Esterase from *Bacillus pumilus*, *American Society for Microbiology* 64(2):789–792.
12. Ducret A, Trani M, et al, 1998, Lipase catalyzed enantioselective esterification of ibuprofen in organic solvent under controlled water activity, *Enzyme Microb Technol*; 22:212-6
13. Ferrer, M, et al, 2007, Mining enzymes from extreme environments, Review. *Ecology and Industrial Microbiology*. 10:207-214.
14. Galindo D y Alvarez V, Purificación y caracterización de carboxilesterasas de *Bacillus pumilus* GMA1 y su aplicación en biocatálisis, Tesis de Licenciatura, UNAM
15. Gerhardt, P, et al, 1994, Methods for general and molecular bacteriology, American Society for Microbiology. Pp 362.
16. Goldstein, L. (1976) Kinetic behaviour of immobilized enzyme systems. *Methods Enzymol.* **44**: 397-443. Keli
17. Godia, 1998



18. Harwood C, 1992 *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular, biological and industrial workhorses, *TIBTECH* 10,247-256.
19. Hita, 2009: Hita E, Robles A. et al, 2009, Production of structured triacylglycerols by acidolysis catalyzed by lipases immobilized in a packed bed reactor, *Biochem Eng J*, 46, 257- 264
20. Ibáñez A, 2007, Optimización del medio de cultivo para *Bacillus pumilus* GMA1, Tesis Licenciatura, UNAM.
21. Jaeger K. y Reetz M. 1998, Microbial lipases from versatile tools for biotechnology, *Trends Biotechnol.* 16:396-403.
22. Jeong, S, et al, 2002, Novel zinc-binding center and a temperature switch in the *Bacillus stearothermophilus* L1 lipase, *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 17041-17047.
23. Klei, H.E.; Sundstrom, D.W.; Shim, D. (1985) Immobilization of enzymes by microencapsulation, *Immobilized cells and enzymes: a practical approach* J. Woodward, ed. IRL Press, pág. 49-54.
24. Kontogianni A, Skouridou V, et al , 2003, Lipase-catalyzed esterification of rutin and naringin with fatty acids of medium carbon chain, *J. Mol Catal B: Enzym*, 21:5962
25. Lambusta D, Nicolosi G, et al, Application of lipase catalysis in organic solvents for selective protection-deprotection of bioactive compounds, *J. Mol Catal B: Enz*, 22, 271.277
26. Liese A., Seelbach K. et al 2000, *Industrial biotransformations* Weinheim: Wiley-VCH

27. Mellou F, Loutrari H, et al, 2006, Enzymatic esterification of flavonoids with unsaturated fatty acids: Effect of the novel esters on vascular endothelial growth factor release from K562 cells, *Process Biochemistry*, 41: 2029-2034
28. Nakajima N, et al, 2000, Regioselective acylation of flavonoid glucose with aromatic acid by an enzymatic reaction system from cultured cells of *Ipomoea batatas*, *J. Biosci Bioeng*, 90:347-350
29. Nthangeni, M. Patterson H, et al 2001, Over Expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on *Bacillus* Lipases. *Enzyme and Microbial Technology*; 28:705-712.
30. Sher P, Ingavle G, 2007, Low density porous carrier Drug adsorption and release study by response surface methodology using different solvents, *Int J. of Phar* 331, 72-83
31. Ruiz, K, 2007, Uso de la Lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1 en biocatálisis. *Tesis de Licenciatura*. UNAM
32. Wong P, 2001. Lipasa Termoestable de *Bacillus pumilus* GMA1: producción fermentativa y algunas propiedades. Tesis de Licenciatura, UNAM.
33. Wong, S.S.; Wong, L.J.C. (1992) Chemical cross-linking for the stabilization of proteins and enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* **14**: 866-874.
34. *Technol.* **14**: 866-874.
35. Zuñiga, V, 2004, Inmovilización de la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1, *Tesis de Licenciatura*. UNAM

## ANEXO I: ESPECTROS DE RMN

### Quercetina

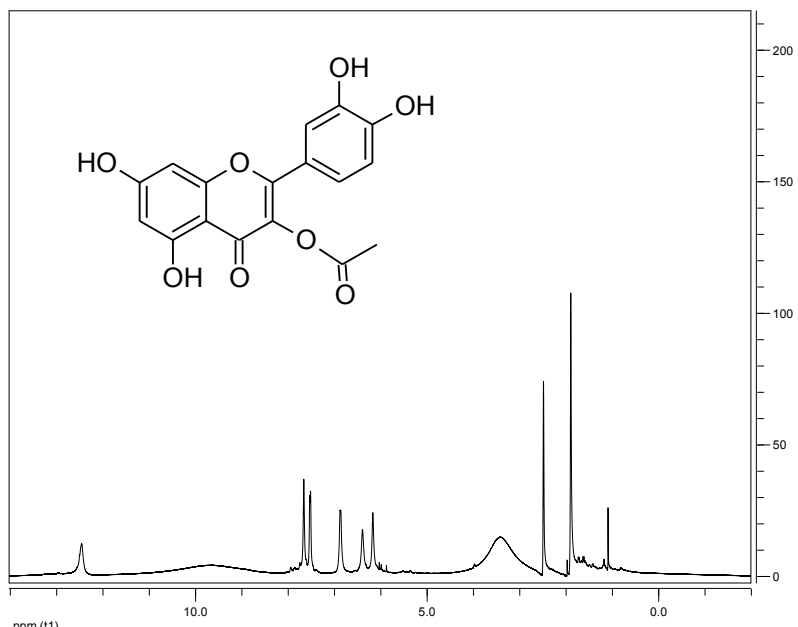


Fig 1. Cromatograma de <sup>1</sup>H para la quercetina transesterificada

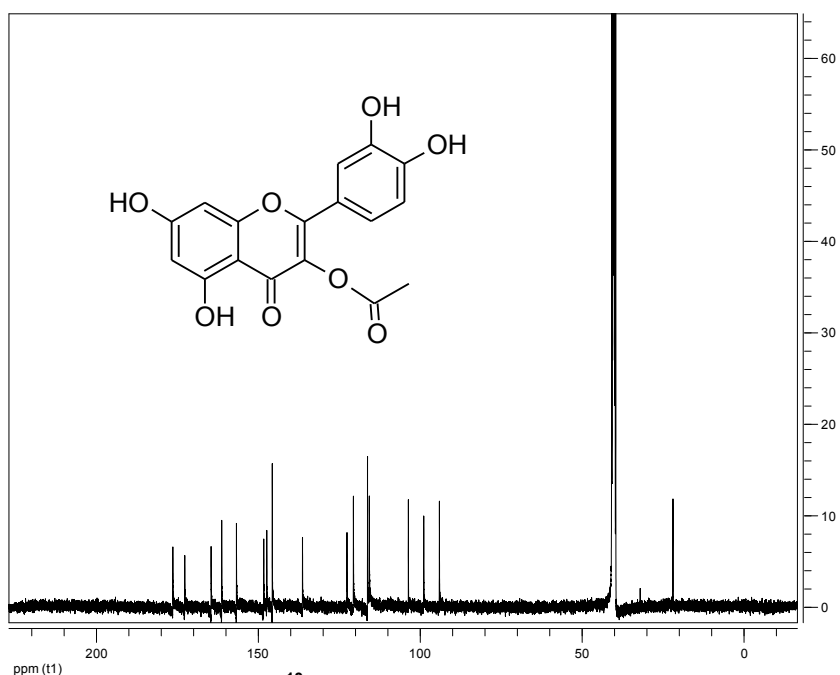


Fig 2. Cromatograma de <sup>13</sup>C RMN para la quercetina transesterificada

# Naringina

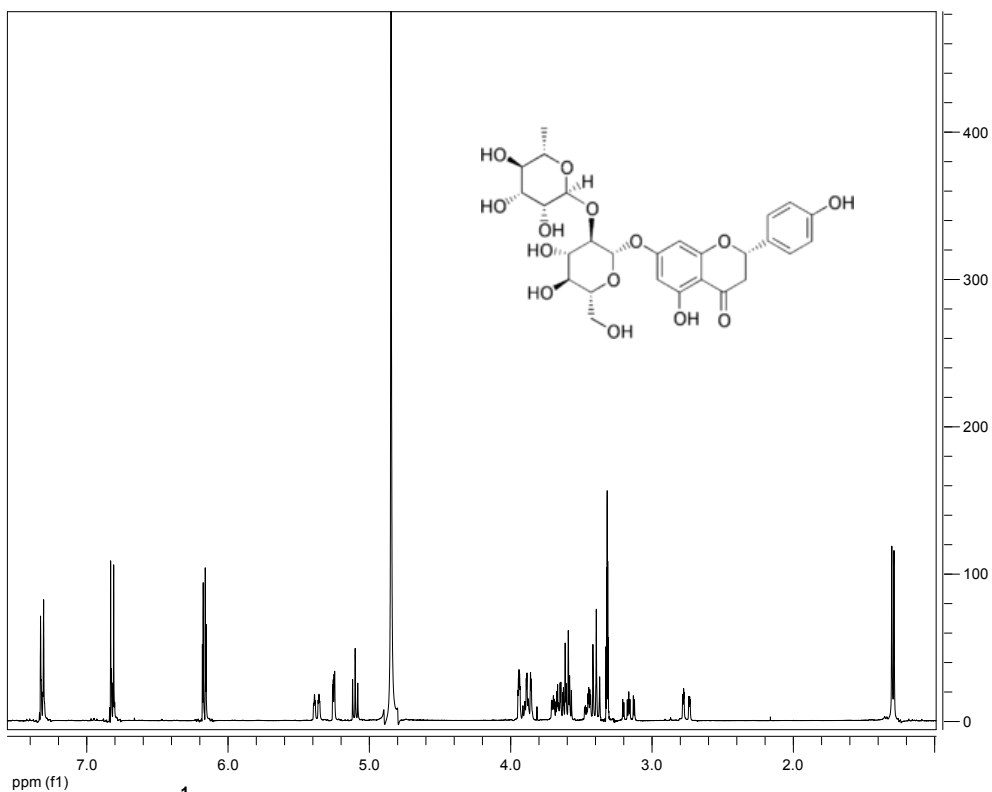


Fig 7. Espectro <sup>1</sup>H para naringina

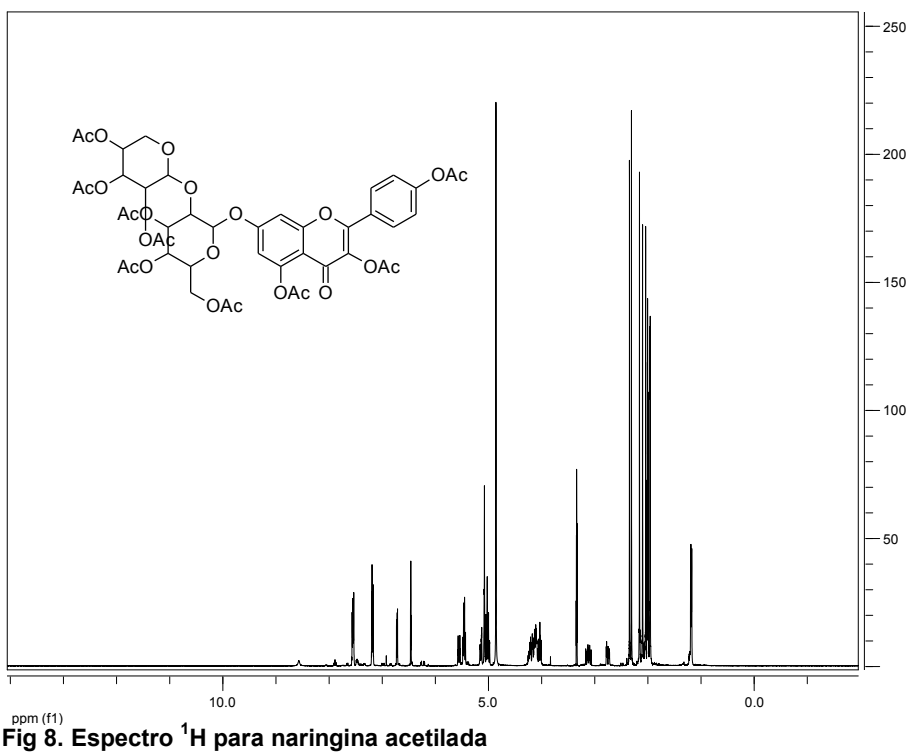
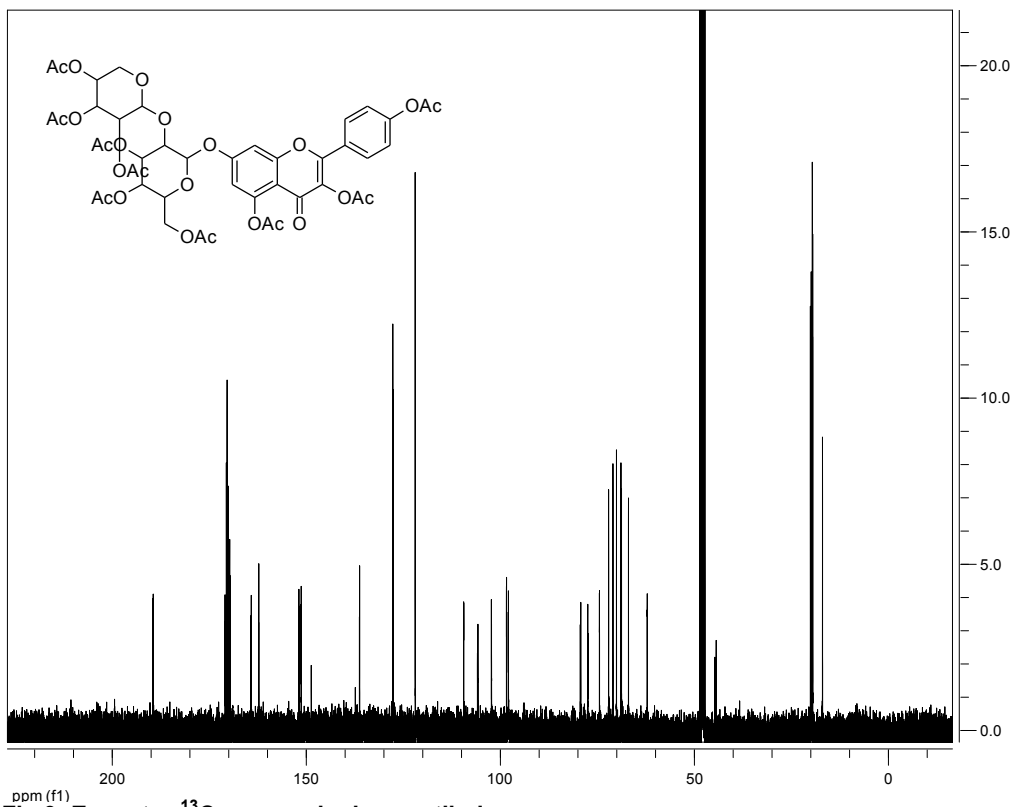
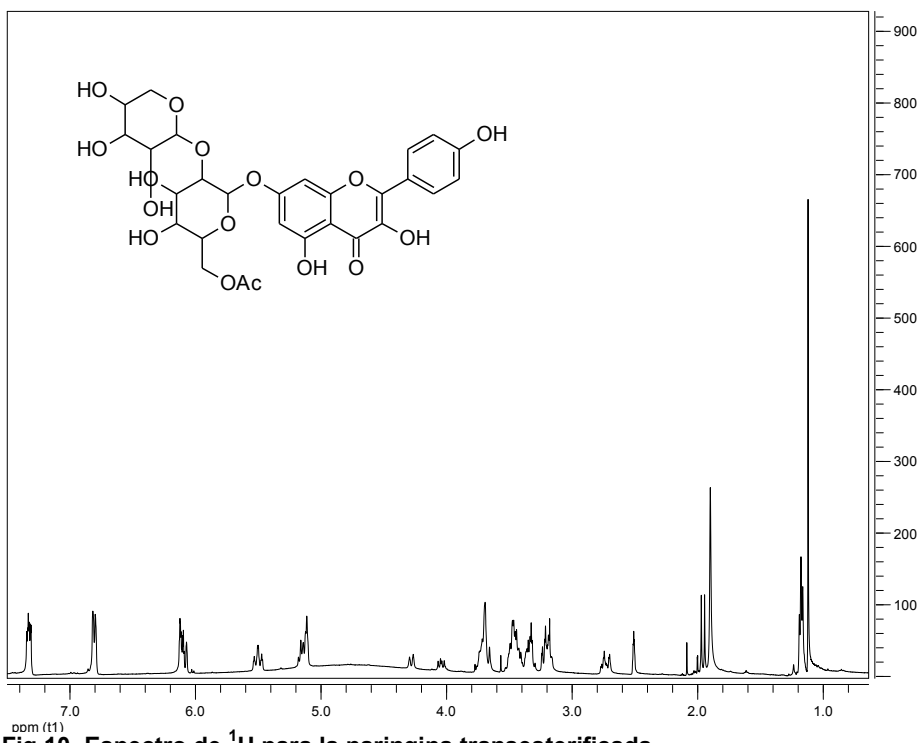


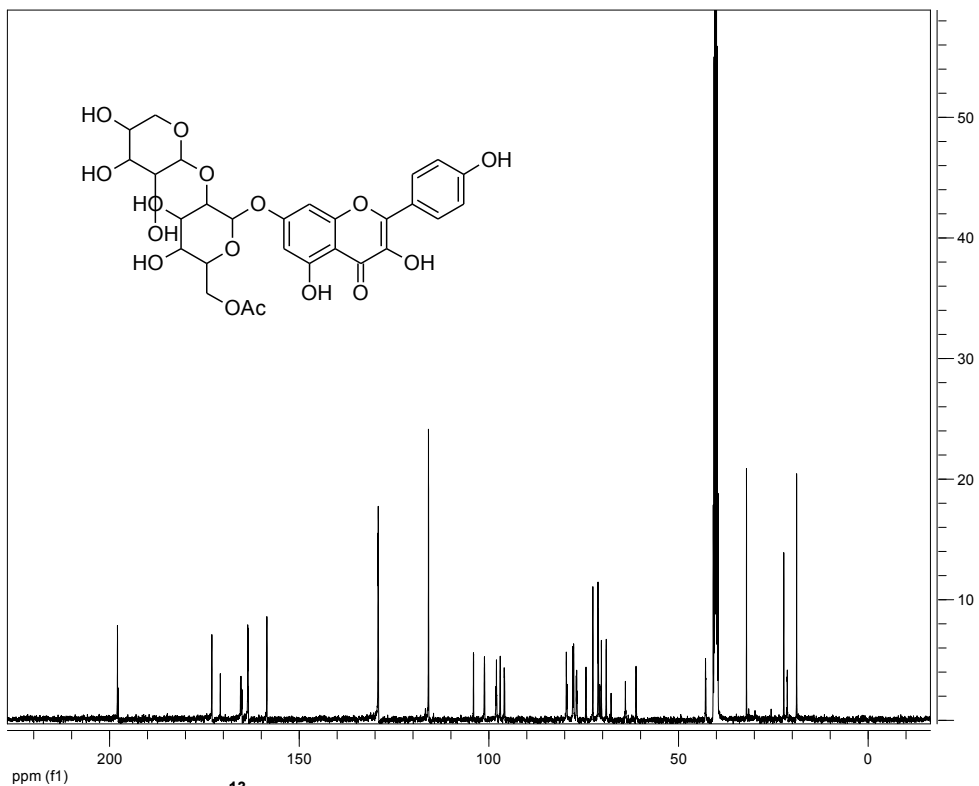
Fig 8. Espectro <sup>1</sup>H para naringina acetilada



**Fig 9. Espectro  $^{13}\text{C}$  para naringina acetilada**



**Fig 10. Espectro de  $^1\text{H}$  para la naringina transesterificada**



**Fig 11. Espectro de  $^{13}\text{C}$  para la naringina transesterificada**

# Rutina

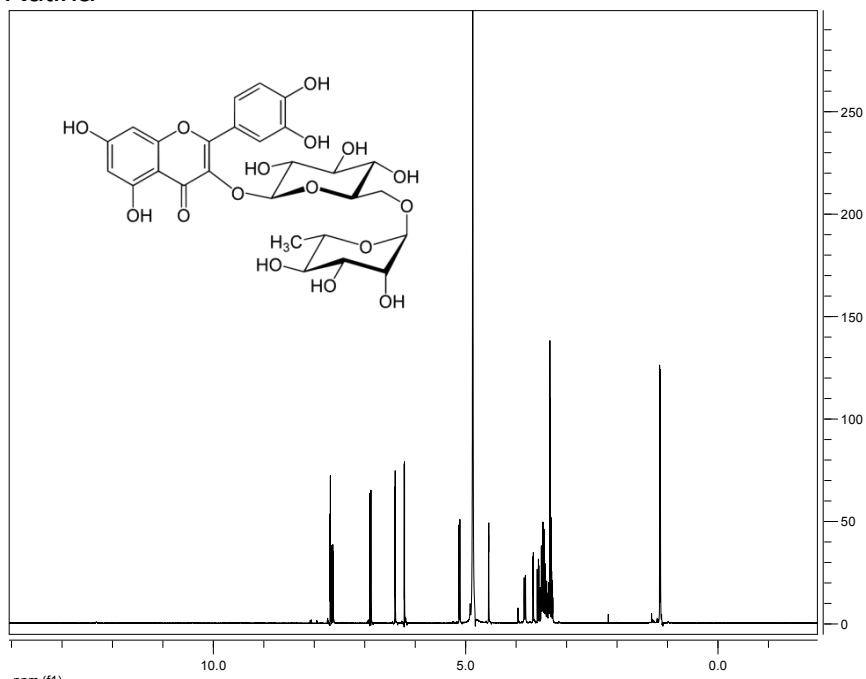


Fig 12. Espectro <sup>1</sup>H para la rutina

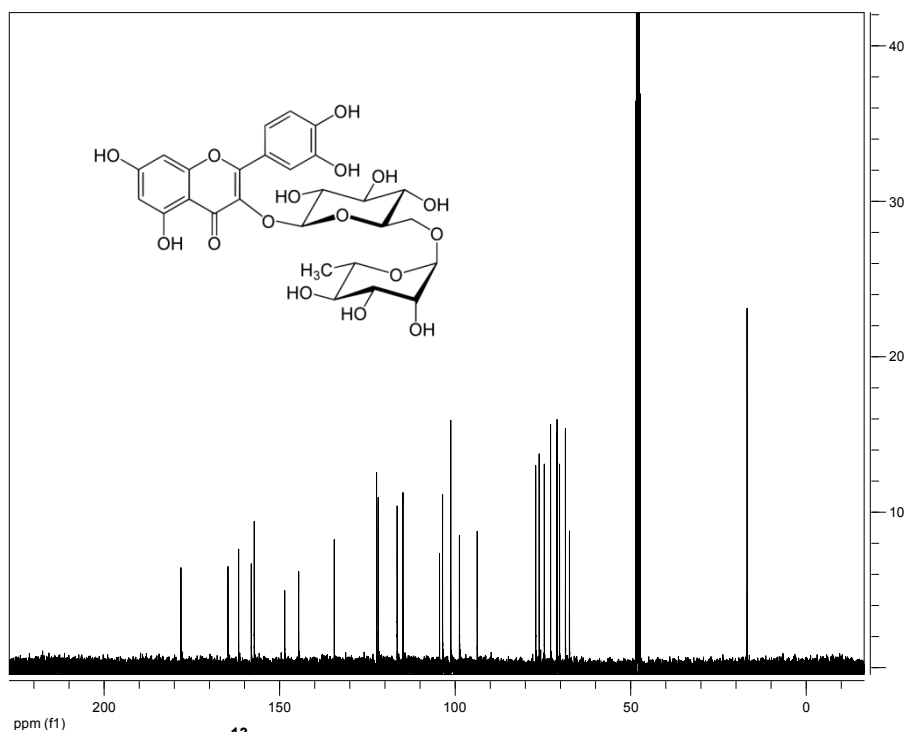
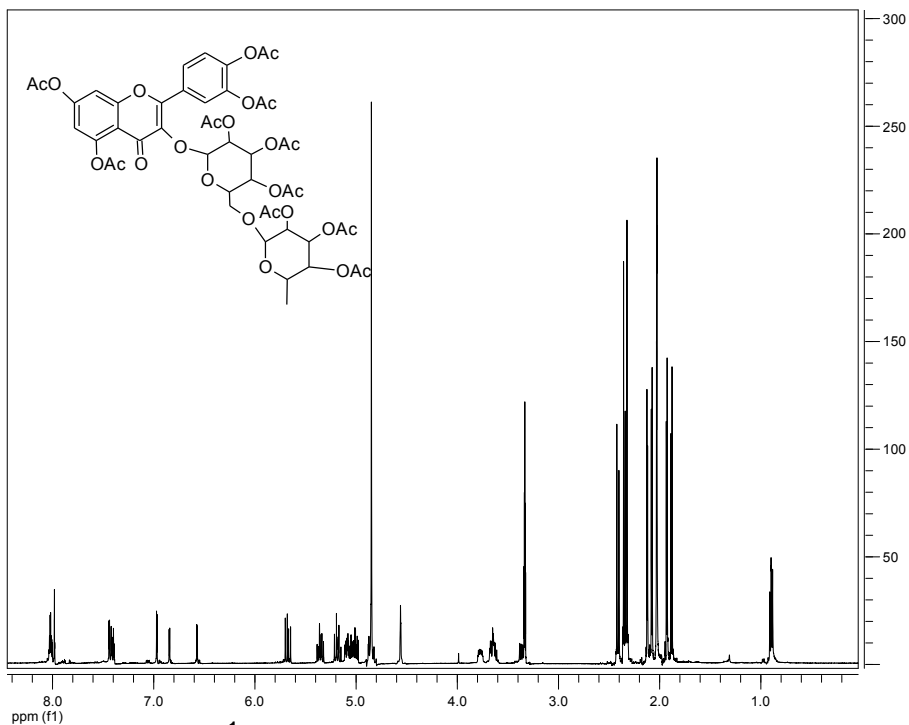
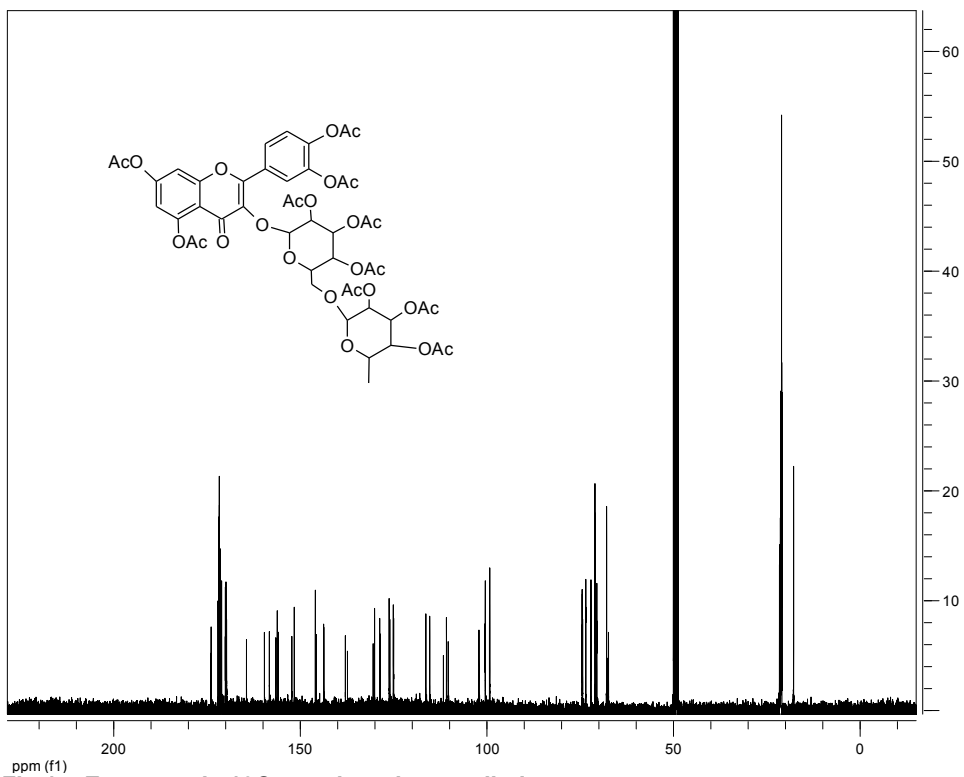


Fig 13. Espectro de <sup>13</sup>C para la rutina



**Fig 14. Espectro de  $^1\text{H}$  para la rutina acetilada**



**Fig 15. Espectro de  $^{13}\text{C}$  para la rutina acetilada**



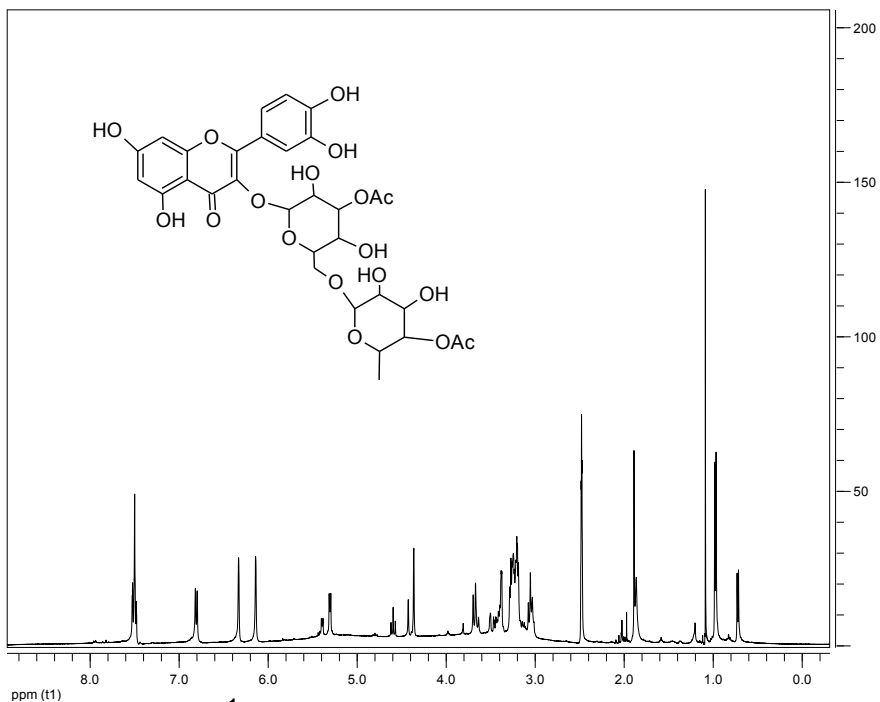


Fig 16. Espectro de <sup>1</sup>H para la rutina transesterificada

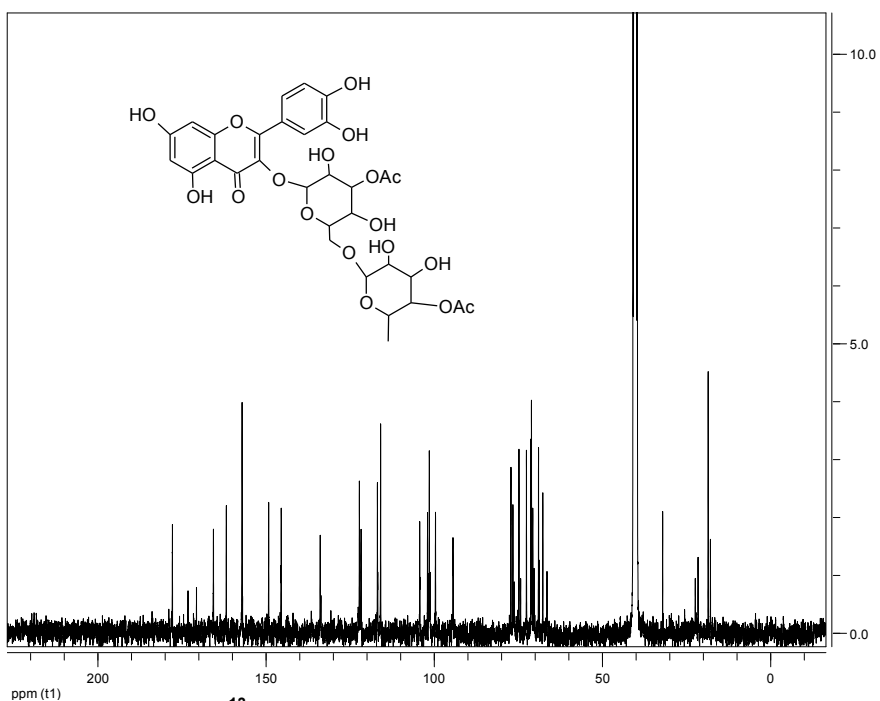


Fig 17. Espectro de <sup>13</sup>C para la rutina transesterificada