



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**BIOSÍNTESIS DE ALQUIL GLUCÓSIDOS
MEDIADA POR GLICOSIL HIDROLASAS
PRESENTES EN SEMILLAS DE CAPULÍN
(*PRUNUS SEROTINA*)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

LILIÁN ANAYA CÁRDENAS



MÉXICO, D.F.

2013



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:	Profesor: Raúl Genaro Aguilar Caballero
VOCAL:	Profesor: Arturo Navarro Ocaña
SECRETARIO:	Profesor: José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio
1er. SUPLENTE:	Profesor: María de los Ángeles Olvera León
2° SUPLENTE:	Profesor: Jorge Arturo Aburto Anell

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL PROYECTO

Departamento de Alimentos y Biotecnología

Facultad de Química, U.N.A.M., Conjunto E, Laboratorio 321.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Arturo Navarro Ocaña

SUSTENTANTE

Lilián Anaya Cárdenas

CONTENIDO

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ANTECEDENTES	3
3.1 Glicósidos.....	3
3.1.1 Aplicaciones de glicósidos	4
3.1.2 Ejemplos y fuentes naturales de glucósidos	5
3.1.3 Síntesis de glucósidos	10
3.1.3.1 Síntesis Química	10
3.1.3.2 Reacción Koenigs-Knorr	10
3.1.3.3 Reacción de Fischer	11
3.1.3.4 Biosíntesis Enzimática.....	13
3.2 Glicosidasas	15
3.2.1 Otras enzimas que hidrolizan enlaces glicosídicos.....	16
3.2.2 β -glucosidasas	16
3.2.3 Aplicaciones de glicosidasas	17
3.2.4 Fuentes naturales de β -glucosidasas.....	18
3.2.5 Mecanismo de reacción de β -glucosidasas	20
3.2.5.1 Hidrólisis	21
3.2.5.1 A) Mecanismo de reacción de glucosidasas de retención.....	21
3.2.5.1 B) Mecanismo de reacción de glucosidasas de inversión	22
3.2.5.2 Glucosidación	23
3.2.5.2 A) Transglicosidación	24
3.2.5.2 B) Glucosidación directa o reacción inversa.....	25
3.3 Capulín (<i>Prunus serotina</i>).....	26
3.3.1 Usos del árbol y frutos de capulín.....	28
3.3.2 Composición del fruto de capulín.....	30
4. HIPÓTESIS	32
5. OBJETIVOS.....	32
5.1 Objetivo general:.....	32
5.2 Objetivos específicos:	32

6. DESARROLLO EXPERIMENTAL	33
6.1 Material.....	33
6.2 Etapas.....	33
6.2.1 Etapa 1: Obtención de sustratos.....	34
6.2.1.1 Síntesis química	34
6.2.1.2 Biosíntesis enzimática	35
6.2.2 Etapa 2: Preparación de biocatalizador a partir de semillas de capulín.....	37
6.2.2.1 Ensayo cualitativo de la actividad de β -glucosidasa	37
6.2.2.2 Medición de la actividad de β -glucosidasa.....	38
6.2.3 Etapa 3: Selección de agliconas	38
6.2.4 Etapa 4: Reacciones de bioglucosidación.....	39
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
7.1.1 Síntesis química:	41
7.1.2 Biosíntesis enzimática:	42
7.2 Etapa 2: Preparación de biocatalizador a partir de semillas de capulín	44
7.3 Etapa 3: Selección de agliconas	46
7.4 Etapa 4: Reacciones de bioglucosidación	50
7.4.1 Sistema de cromatografía en placa fina con estándar de glucósido de alcohol vainillínico	51
8. CONCLUSIONES	53
9. PERSPECTIVAS.....	55
10. REFERENCIAS.....	56

1. RESUMEN

En este trabajo de tesis se sintetizaron cuatro diferentes alquil glucósidos partiendo de glucosa y la aglicona correspondiente utilizando una ruta bioenzimática. Como fuente de β -glucosidasas, las enzimas necesarias para la formación de alquil glucósidos, se utilizaron semillas del fruto de capulín y se preparó un crudo enzimático el cual fungió como biocatalizador en las reacciones.

A lo largo del desarrollo experimental se establecieron las condiciones necesarias para llevar a cabo la síntesis enzimática y se encontró que con el biocatalizador preparado se pudieron sintetizar los glucósidos de alcohol bencílico, butanol, octanol y alcohol vainillínico, lo cual indica que fueron reconocidas estas sustancias agliconas por las β -glucosidasas en el biocatalizador.

Se comprobó también que es factible la obtención de alquil glucósidos por medio de una ruta totalmente verde y biológica tomando como ejemplo el glucósido del alcohol vainillínico; desde la obtención de vainillina a partir de fuentes naturales y la reducción de esta para formar alcohol vainillínico, hasta la glucosidación de ese alcohol para obtener el glucósido deseado.

2. INTRODUCCIÓN

La síntesis química de alquil glucósidos fue reportada hace más de 100 años, sin embargo, ésta requiere de numerosos pasos de protección y acoplamiento, tanto de sustratos como de productos; además de que muchos de los reactivos utilizados pueden ser tóxicos. La producción enzimática de alquil glucósidos ofrece ciertas ventajas sobre la síntesis química, tal es la posibilidad de una producción selectiva de compuestos específicos y el requerimiento de condiciones de reacción moderadas, por lo que en principio, la aplicación de enzimas puede reemplazar los complicados procesos químicos en la producción industrial.

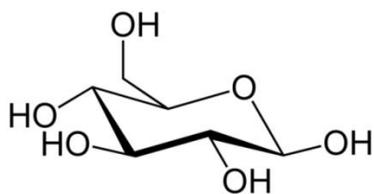
En este trabajo experimental se desarrolló una técnica de obtención de un catalizador con actividad de β -glucosidasas a partir de las semillas del fruto de capulín. Se llevó a cabo un monitoreo de ocho distintas agliconas y glucosa para averiguar si podían ser reconocidas y así formar los respectivos alquil glucósidos. Dos de estas agliconas, el alcohol vainillínico y el alcohol piperonílico, fueron preparadas en el laboratorio por medio de síntesis química y enzimática, para comparar las ventajas y desventajas de ambos procesos.

Posteriormente, siguiendo una ruta verde y biológica, se diseñaron las condiciones de reacción adecuadas para llevar a cabo la glucosidación de cuatro diferentes alcoholes que fueron reconocidos por las β -glucosidasas del biocatalizador.

3. ANTECEDENTES

3.1 Glicósidos

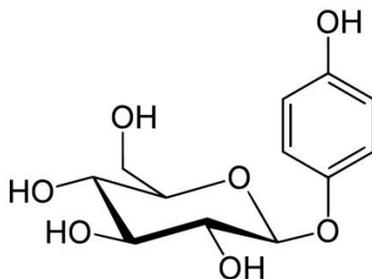
El término glicósido es un nombre general para una aglicona (parte sin azúcar) unida covalentemente a una mitad glicona (azúcar). Cuando la estructura glicona es la glucosa, al compuesto se le conoce como *glucósido*. Los glicósidos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se encuentran desempeñando distintas funciones en prácticamente todos los organismos vivos. Las estructuras agliconas de los glicósidos varían de alcoholes a proteínas, mientras que la estructura glicona puede variar de mono a polisacáridos (de Roode et al., 2003).



Glucosa, estructura glicona.



Hidroquinona, estructura aglicona.



Glucósido

Imagen 1. Glucósido de hidroquinona: Arbutina.

3.1.1 Aplicaciones de glicósidos

Muchos glicósidos se utilizan en un amplio rango de aplicaciones como surfactantes, colorantes y saborizantes, endulzantes, antioxidantes, anti inflamatorios, antibióticos, antifúngicos, antimicrobiales, etc. Dependiendo del tipo de aglicona presente en el glicósido se determina la aplicación industrial de este. Azúcares unidos a cadenas largas de alquilos como la parte aglicona forman glicósidos con buenas propiedades surfactantes y emulsificantes. Glicósidos con cadenas de alquilos no saturadas, como terpenos, tienen actividad antifúngica y antimicrobiana. En la industria farmacéutica, los glicósidos de péptidos y esteroides se utilizan en formulaciones antitumorales y medicamentos para tratar problemas cardiacos, respectivamente. Recientemente se han sintetizado glicósidos de sabores y fragancias y son utilizados como compuestos que se liberan controladamente, esto debido a la hidrólisis lenta de los glicósidos que resulta en la liberación retardada de sabores y fragancias en alimentos (de Roode et al., 2003). Los alquil glucósidos en específico son utilizados principalmente como surfactantes no iónicos en la industria alimenticia, farmacéutica, química, cosmética y detergente. Estos glucósidos no son tóxicos, son biodegradables y no causan irritación en la piel.



Imagen 2. Detergentes, sabores y fragancias.

Las estrategias de glicosidación pueden ser también útiles para modificar las propiedades fisicoquímicas de la parte aglicona, ya sea incrementar su solubilidad en agua o estabilidad en los alquil glucósidos, por ejemplo, siendo su parte glicona una molécula de glucosa y su parte aglicona un grupo alquilo. La actividad biológica de un glucósido natural depende principalmente de la parte aglicona de la molécula. Es generalmente aceptado que los glicósidos son más solubles en agua que la mayoría de sus agliconas por si solas. Al unir una parte glicona a la molécula, se incrementa su hidrofiliidad y por ende, cambia sus propiedades fisicoquímicas. La glicosidación hace que compuestos lipofílicos sean más solubles en agua y así incrementa la biodisponibilidad de compuestos biológicamente activos, además de impartirle estabilidad a la aglicona. Debido a su excelente biodegradabilidad y la ausencia de efectos tóxicos, existe un amplio espectro de aplicaciones de los alquil glucósidos en la elaboración de alimentos, manufactura de polímeros y solubilización de membranas biológicas.

3.1.2 Ejemplos y fuentes naturales de glucósidos

Los glucósidos se pueden encontrar principalmente en los organismos vegetales y sus funciones son principalmente de acumulación, protección, almacenamiento y transporte de sustancias hidrofóbicas. Los glucósidos presentan una mayor solubilidad en agua si se les compara con la estructura aglicona libre, además de que el glucósido tiene una menor reactividad. Con esto se protege a la planta de cualquier forma de toxicidad que pueda presentar la estructura aglicona por si sola. Los glucósidos cianogénicos son un ejemplo de almacenamiento en las plantas y son parte fundamental en el mecanismo de defensa contra herbívoros; si se produce un daño en el tejido vegetal de la planta, esto resulta en la hidrólisis mediada por β -glucosidasa y la formación de ácido cianhídrico por la acción de la oxinitralasa. Otra función de los glucósidos es como precursor de aromas en las flores (de Roode et al., 2003).

Tabla 1. Ejemplos de glucósidos obtenidos enzimáticamente.

Tipo de glucósido	Compuesto	Fuente de enzima	Aplicaciones
Glicósidos fenólicos y alquil glucósidos	Eugenol- α -glucósido y Eugenol- β -glucósido.	<i>Xanthomonas campestris</i> <i>Eucalyptus perrinian</i>	Restauración de cabello. Derivado de especias. (Sato et al., 2003)
	Vainillina- β -D-glucósido	<i>Coffea arabica</i>	Aditivo alimenticio. Saborizante. (Kometani et al., 1993)
	Capsaicina- β -D-glucósido	<i>Coffea arabica</i>	Ingrediente de alimentos (Kometani et al., 1993)
	Glicósidos de curcumina	<i>Catharanthus roseus</i>	Colorante alimenticio. Antioxidante (Kaminaga et al., 2003)
	Arbutina, glucósido de la hidroquinona.	Plantas superiores como: <i>Arctosaphylos uvaursi</i> , <i>Vaccinium vitis-idea</i> , <i>Pyrus communis</i> , <i>Lathyrus sp</i>	Inhibe la tirosinasa previniendo la biosíntesis de melanina en la piel humana (Pop et al., 2009)
	Salicina, glucósido del ácido salícico	Corteza de sauce (<i>Salix L.</i>)	Utilizado como analgésico y antipirético. Como precursor de ácido acetilsalicílico.

Glucósidos flavonoides	Glucósido de quercetina	Semillas de alforfón (<i>Fagopyrum tataricum</i>) Corteza de algunos robles (<i>Quercus alba</i> y <i>quercus robur</i>)	Tratamiento de infecciones por parásito protozoarios (Fabjan et al., 2003; Dai et al., 2013)
	Rutina, glucósido de la quercetina	Semillas de alforfón (<i>Fagopyrum tataricum</i>) y (<i>Fagopyrum esculentum</i>) Uña de gato (<i>Carpobrotus edulis</i>) Hojas y peciolo de espárragos	Actividades farmacológicas como antibacterial, antitumoral, antiinflamatoria, antimutagénica, vasodilatador, etc. (Zakaria et al., 2011)
	Kaempferitrina, glucósido del kaempferol	Hojas de <i>Hedyotis verticillata</i> Frondas de helechos (<i>Phegopteris connectilis</i>)	Actividad antimicrobiana, inhibidor de reguladores inflamatorios en macrófagos. (Tzeng et al., 2009)
	Astragalina, glucósido del kaempferol	Del arbusto <i>Phytolacca americana</i> Frondas de helechos (<i>Phegopteris connectilis</i>)	Actividades farmacológicas (Zakaria et al., 2011)
Glucósidos cianogénicos	Amigdalina	Semillas de distintos frutos.	Defensa de plantas contra herbívoros (de Roode et al., 2003)

Los glucósidos a veces son difíciles de purificar y separar de su fuente natural, es por eso que es necesario desarrollar nuevas técnicas para sintetizarlos, ya sea de manera química o enzimática.

3.1.3 Síntesis de glucósidos

3.1.3.1 Síntesis Química

La forma más común para la obtención de glucósidos es la síntesis química ya que los rendimientos son bastante buenos. A continuación se presentan dos de las metodologías que más se llevan a cabo para sintetizar glucósidos químicamente.

3.1.3.2 Reacción Koenigs-Knorr

Reportada desde 1901, es uno de los métodos más útiles para sintetizar una amplia variedad de glucósidos, entre ellos de alquil, de aril y de oligosacáridos. Sin embargo, la metodología requiere de formación de haluros de glicosil y otros intermediarios relacionados, los cuales se generan típicamente bajo condiciones de reacción severas y son inestables y difíciles de manejar, además que se necesitan sales de plata como catalizador, siendo las más comúnmente utilizadas los óxidos, carbonatos y nitratos de plata, haciendo que los desechos de esta reacción sean difíciles de tratar y contaminantes (Juárez et al., 2001).

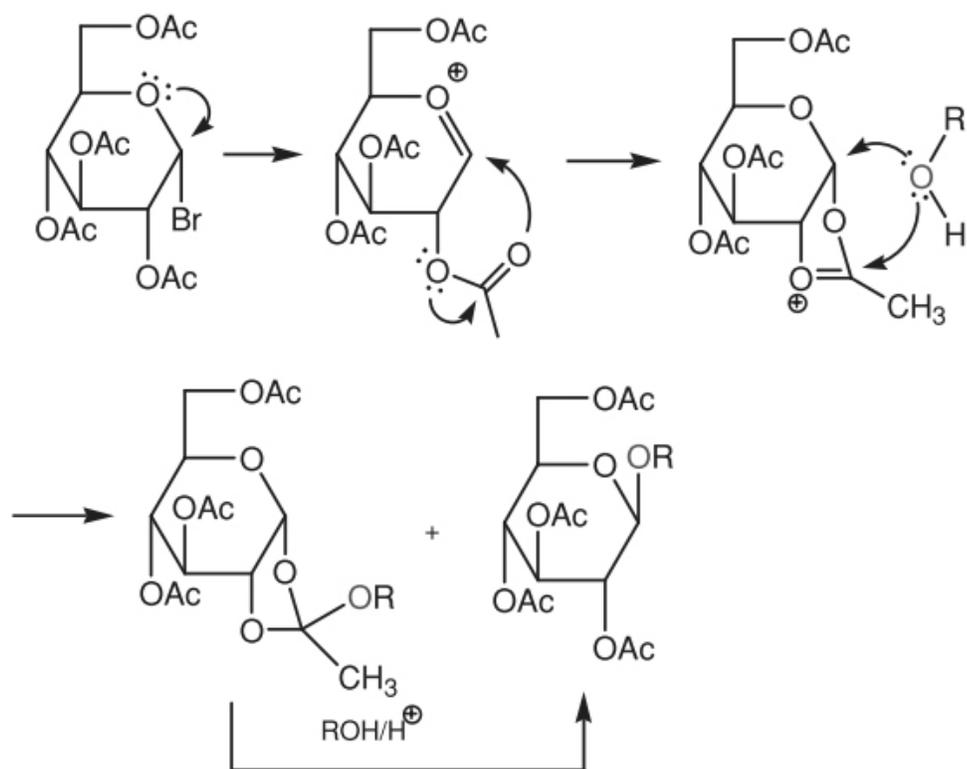


Imagen 4. Mecanismo propuesto de la reacción de glucosidación Koenigs-Knorr. (Brito-Arias, 2007)

3.1.3.3 Reacción de Fischer

Esta estrategia se utiliza especialmente para la preparación de glucósidos simples. La ventaja de esta metodología es que no requiere el uso de grupos de protección y se obtiene el glucósido simplemente con mezclar bajo condiciones ácidas, el azúcar libre, la glucosa, con un alcohol. Sin embargo, este método no es estereoselectivo y da como resultado una mezcla de anómeros (Brito-Arias, 2007).

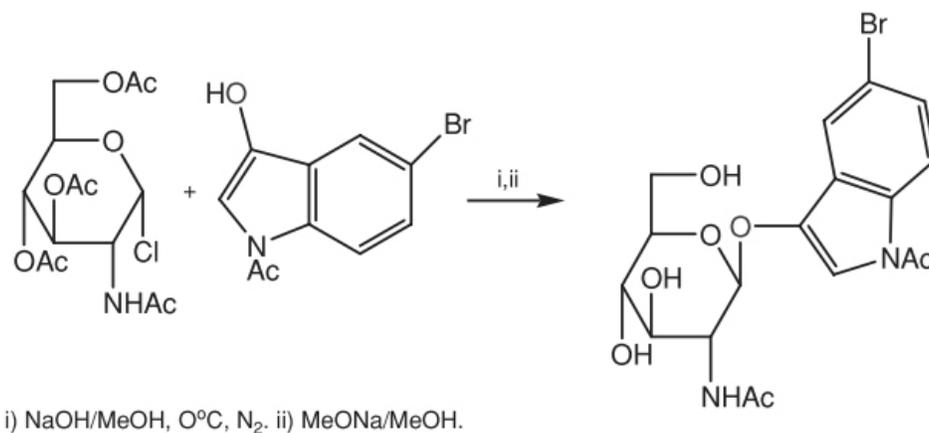


Imagen 5. Síntesis de un glicósido derivado del indol por el método de Fischer. (Brito-Arias, 2007)

En las estrategias químicas para la obtención de glucósidos se tiene que llevar a cabo un procedimiento de muchos pasos, los cuales incluyen protección selectiva de sustratos y productos, activación y acoplamiento durante el desarrollo de la reacción; además del uso de solventes y catalizadores que pueden ser tóxicos, como las sales de plata usadas en el método de Koenigs-Knorr, impidiendo así su utilización en alimentos. Esto sin tomar en cuenta que los productos obtenidos no son isoméricamente puros.

Tabla 2. Ventajas y desventajas de la síntesis química de glucósidos.

Ventajas	Desventajas
Rendimientos altos.	Procedimiento de muchos y complicados pasos.
Síntesis de una amplia variedad de glucósidos.	Uso de solventes y catalizadores tóxicos.
	No se obtienen isómeros puros.

Todos estos problemas encontrados en la síntesis química han promovido el desarrollo más a fondo de técnicas enzimáticas que permitan la producción de glucósidos de una manera más sencilla, barata y adecuada para el uso en alimentos.

2.1.3.4 Biosíntesis Enzimática

La biosíntesis enzimática tiene la característica de ser sumamente específica y es precisamente esto lo que se ha aprovechado para sintetizar estos productos. Esta especificidad resulta de interacciones débiles entre el sitio activo de la enzima y el sustrato específico. Estas reacciones también son específicas en cuanto al producto a obtener, siendo capaces de distinguir el isómero correcto de un sustrato que existe en dos formas estereoquímicas distintas para llevar a cabo la reacción, dándole así la característica de estereoselectividad a las reacciones enzimáticas.

Los glucósidos pueden ser sintetizados *in vivo* por una variedad de glucosil hidrolasas, las cuales transfieren selectivamente un azúcar de un intermediario activado, como un nucleótido con azúcar, a la estructura aglicona. En este caso, la síntesis de glucósidos a gran escala en un bioreactor sólo es factible si se cuenta con un sistema de regeneración para estos glucósido-nucleótidos, lo cual resulta ser un proceso muy caro. Por esta razón, generalmente se utilizan glucosidasas para las reacciones de glucosidación, siendo el método enzimático una buena alternativa (de Roode et al., 2003).

Al compararse con los métodos químicos, la síntesis enzimática de glucósidos atrae mucha atención gracias a su simplicidad, alta estero- y regioselectividad, y condiciones de reacción menos estrictas. El proceso mediado por glucosidasas muestra un amplio potencial de aplicación ya que estas enzimas son baratas, se pueden encontrar disponibles en grandes cantidades, generalmente son estables y tienen baja especificidad a otras agliconas. Además, azúcares no activados como mono y disacáridos, pueden usarse directamente como donadores de gliconas para sintetizar los glucósidos.

A pesar de las ventajas ya descritas, para llevar a cabo los métodos enzimáticos para síntesis de glucósidos se requieren encontrar las condiciones de reacción exactas que lleven la reacción en la dirección deseada sin que se produzca degradación enzimática en el producto (Kittl et al., 2010). Además

presentan rendimientos muy bajos y una difícil separación del glucósido formado del medio de reacción, impidiendo así la producción de estos compuestos a una escala comercial (Ismail et al., 1999). Sin embargo, se puede alcanzar una productividad mayor si se utiliza una concentración alta de los alcoholes que serán la estructura aglicona del glucósido. Además de que se podrían implementar métodos de separación y remoción del medio de reacción en caso de ser necesario.

Tabla 3. Ventajas y desventajas de la biosíntesis enzimática de glicósidos.

Ventajas	Desventajas
Reacción estereoselectiva.	Rendimientos bajos.
Condiciones de reacción simples.	Difícil separación del producto del medio de reacción.
Costo bajo y disponibilidad alta de enzimas.	
Productos aptos para usarse en alimentos.	

Tabla 4. Comparación de la síntesis química (método de Koenigs-Knorr) contra la biosíntesis enzimática (glucosidación directa).

Glucosidación para obtener Glucosa-β-OCH(CH₃)CH=CH₂	
Koenigs-Knorr (síntesis química)	Rendimiento/espacio-tiempo: 36 g/L día Desechos: Soluciones tóxicas y metales pesados; 20 kg de desperdicio por kg de producto.
Glucosidación directa (biosíntesis enzimática)	Rendimiento/espacio-tiempo: 10 g/L día Desechos: Soluciones con mono y disacáridos; 2 kg de desperdicio por kg de producto.

En la Tabla 4. se pueden observar las diferencias de rendimiento y producción de desechos entre la producción de un mismo glucósido por medio de síntesis química y por biosíntesis enzimática. Como era de esperarse, el rendimiento de la síntesis química fue tres veces mayor pero si se toma en cuenta la producción de desechos en ambas técnicas, la cantidad de desechos en la biosíntesis enzimática es diez veces menor además de que los desechos eran soluciones de mono y disacáridos, mientras que los desechos de la síntesis química eran soluciones tóxicas.

Tomando todas estas consideraciones anteriormente presentadas, se opta por la biosíntesis enzimática como un método más seguro y verde para la obtención de glucósidos.

3.2 Glicosidasas

Las glicosil hidrolasas (EC 3.2.1.-), también llamadas glicosidasas, son un grupo de enzimas pertenecientes al grupo de carbohidrasas, las cuales hidrolizan el enlace glicosídico entre dos carbohidratos o entre un carbohidrato y una molécula aglicona, teniendo así la formación de un hemiacetal y la aglicona libre correspondiente. Estas enzimas pueden catalizar la hidrólisis de glicósidos unidos con enlaces de oxígeno, nitrógeno y azufre.

La nomenclatura de glicosidasas propuesta por la IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) se basa en la especificidad a sustratos y al mecanismo molecular, aunque esta clasificación no refleja las características estructurales de las enzimas. Las glicosidasas se clasificaron en familias basadas en secuencias de aminoácidos similares.

Los números EC son códigos que representan el número de la Enzyme Commission. Es un sistema numérico de clasificación basado en las reacciones químicas que catalizan las enzimas. Cada número EC está asociado con un

nombre recomendado a esa enzima. Estos números no especifican enzimas sino la reacción que catalizan, no importando la fuente de cada enzima.

3.2.1 Otras enzimas que hidrolizan enlaces glicosídicos

Celulasas y xilanasas: Estas enzimas hidrolíticas participan en el rompimiento de los enlaces glicosídicos β -1,4 presentes en el polisacáridos celulosa y hemicelulosa, respectivamente. Desde hace más de 50 años se utilizan para convertir una de las fuentes de energía renovable más abundante, la lignocelulosa, en glucosa y azúcares solubles, ya que este recurso contiene principalmente celulosa, hemicelulosa y lignina (Ponce et al., 2002). Estas enzimas son producidas por una gran variedad de microorganismos, en especial y bacterias.

Las celulasas juegan un importante papel en la industria textil en el desteñido de mezclilla y en los detergentes quita pelusas. Dentro de la industria alimentaria son utilizadas para favorecer la extracción y filtración de jugos y mostos o en la extracción de aceites comestibles.

Las xilanasas son principalmente utilizadas en la industria del papel para el proceso de blanqueo de la pulpa, sustituyendo a compuestos clorados que pueden ser tóxicos y causan daños en sistemas biológicos. En la industria alimentaria se utilizan en la clarificación de jugos y vinos, extracción de saborizantes y pigmentos, adicionándose a las masas en panificación, entre otros.

3.2.2 β -glucosidasas

Dentro de las glicosidasas se encuentran las β -glucosidasas (β -D-glucósido glucosil hidrolasa EC 3.2.1.21) las cuales forman un grupo heterogéneo de enzimas cuya función natural es catalizar la hidrólisis de enlaces β -glucosídicos entre dos carbohidratos o un carbohidrato y una parte aglicona (Yoshiara et al.,

2012) por medio de la separación de la terminal no reductora de residuos β -D-glucosa, liberando así el azúcar libre.

Las enzimas de esta familia muestran especificidad por sustratos con enlaces β -glucosídicos, tienen un peso molecular similar (55-65 kDa) y un pH óptimo de entre 5 y 6 (Schomburg, 2000).

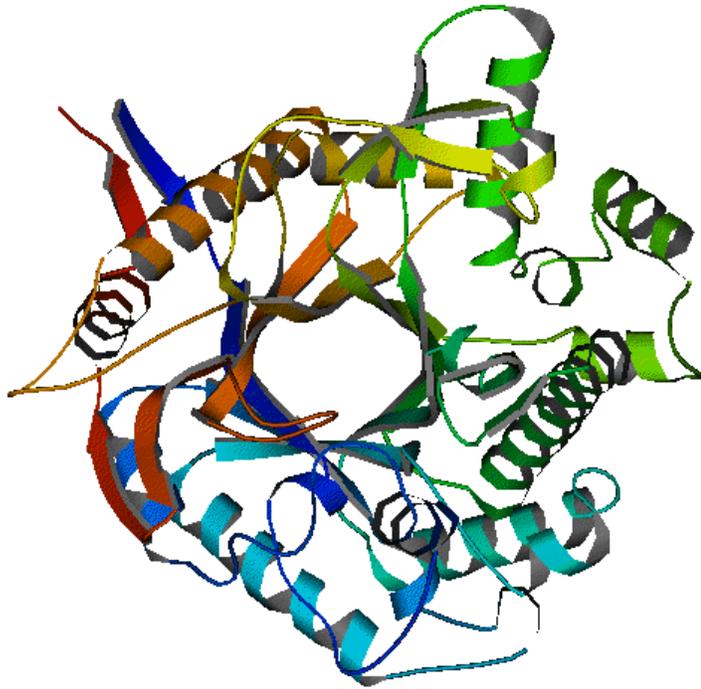


Imagen 6. Representación tridimensional de una β -glucosidasa E.C. 3.2.1.21

3.2.3 Aplicaciones de glicosidasas

Las glicosidasas juegan papeles importantes en la naturaleza, incluyendo la degradación de biomasa y participando en funciones celulares, como la biosíntesis de glicoproteínas. Últimamente se le ha prestado más atención a las glicosidasas, por ejemplo, en la industria farmacéutica ya que están involucradas en diversos procesos biológicos como reconocimiento entre célula y célula o entre virus y célula, en respuestas del sistema inmunológico, crecimiento celular, etc. En la digestión, enzimas como α -amilasa, maltasa y lactasa son las responsables de la degradación de polisacáridos y oligosacáridos provenientes de la dieta en

monosacáridos simples, los cuales son luego absorbidos hacia el torrente sanguíneo. Otros roles importantes son en el catabolismo y en la degradación lisosomal de glicolípidos. La deficiencia de esas enzimas resulta en enfermedades genéticas serias como Gaucher y Tay Sachs. Otro rol que pueden desempeñar es en el procesamiento de glicoproteínas.

Tienen importancia además, en otras aplicaciones no médicas, en específico en biotecnología, donde la degradación enzimática de biomasa tiene un gran potencial para la generación de fuentes de energía alternativas (Withers et al., 1995).

En tejidos vegetales intactos, las β -glucosidasas están contenidas separadas de los nutrientes del organismo y se involucran en diversos aspectos de la fisiología vegetal como la formación de intermediarios en la lignificación de la pared celular, la degradación de pared celular del endosperma durante la etapa de germinación y en la activación de fitohormonas.

La mayoría de las β -glucosidasas de plantas pertenecen a la familia I de glicosil hidrolasas (GH1) la cual incluye también a las mirosinasas (tio- β -glucosidasas), β -manosidasas, β -galactosidasas, fosfo- β -glucosidasas y fosfo- β -galactosidasas (Purushothaman et al., 2011).

En las últimas décadas las β -glucosidasas han atraído la atención de tecnólogos debido a sus aplicaciones en la desintoxicación de alimentos, conversión de biomasa y en el realce de sabores en bebidas (Chen et al., 2012). Además de estas funciones, las β -glucosidasas se utilizan en la síntesis de varios glucósidos de interés comercial para las industrias alimenticia, cosmética, farmacéutica y de detergentes.

3.2.4 Fuentes naturales de β -glucosidasas

Las β -glucosidasas pueden encontrarse en todos los dominios del árbol filogenético, menos en algunas arqueas y algunos eucariotes (Brás et al., 2012), variando la concentración en cada uno. Son producidas por el metabolismo de

bacterias, hongos y plantas, son fáciles de aislar a partir de semillas, cultivos de hongos y microorganismos, etc. Una de las glucosidasas termoestables más utilizada en la síntesis de glucósidos es la β -glucosidasa de la arquea hipertermofílica *Pyrococcus furiosus* la cual es relativamente fácil de cultivar y la enzima es estable por 85 horas a 100 °C y constituye casi el 5% de la proteína celular. Esta enzima también ha sido clonada y expresada en *E. coli* (Divakar, 2013). Sin embargo, las glucosidasas que más se utilizan actualmente se obtienen en su mayoría a partir de organismos vegetales (Pandey, 2006). Una de las razones principales por las que ocurre esto es que la obtención de enzimas a partir de microorganismos requiere de muchos pasos, incluidos el crecimiento de la cepa deseada, la centrifugación del cultivo, recuperación de las células con actividad de la enzima deseada, la expresión del gen que codifica para las enzimas en cepas de *E. coli*, entre otros. La obtención de enzimas por medio de fuentes vegetales requiere de menos y más sencillos pasos. Además, las glucosidasas obtenidas a partir de bacterias sufren de inhibición por glucosa, es por eso que las glucosidasas tolerantes a glucosa se encuentran en alta demanda (Yu et al., 2007). Las glucosidasas obtenidas de plantas pueden soportar mayores concentraciones de glucosa ya que una gran cantidad del azúcar, que es liberada durante la germinación, permanece en las semillas y no afecta la actividad de la enzima.

Las semillas de plantas son una buena fuente de obtención de β -glucosidasas con una tolerancia a la glucosa. El hecho de que las semillas sean un desperdicio de la industria alimenticia, por ejemplo, hace más atractivo al método enzimático ya que estos desperdicios tendrán un valor agregado al convertirse en fuente de enzimas, además de que reduce notablemente el costo del catalizador.

Una fuente muy rica en estas enzimas es la almendra (*Prunus amygdalus*) ya que el crudo de la semilla básicamente consiste en β -glucosidasa y oxinitralasa (De Roode et al., 2003). A pesar de esto, la glucosidasa comercial de almendra ha

sufrido de escasez además de que tiene un costo muy alto y se necesita inmovilizar la enzima si se quiere utilizarla repetidamente.

Las semillas de manzana (*Malus domestica*) son una fuente prometedora de β -glucosidasas para la síntesis de alquil glucósidos ya que ha mostrado una alta actividad hidrolítica en diferentes estudios realizados (Yu et al., 2007).

Recientemente se ha encontrado que una variedad de harinas de semillas de frutas, en especial de ciruelas pasas (*Prunus domestica*), son buenos biocatalizadores para la síntesis de alquil glucósidos a partir de D-glucosa y alcoholes (Yang et al., 2012).



Imagen 7. Almendras, semillas de manzana y ciruelas pasa.

En este trabajo de tesis se eligieron a las semillas del fruto del árbol de capulín (*Prunus serotina*) como fuente de β -glucosidasas.

3.2.5 Mecanismo de reacción de β -glucosidasas

Las β -glucosidasas catalizan dos tipos de reacciones: La hidrólisis (rompimiento de enlaces) y la glucosidación (formación de enlaces). La reacción natural que catalizan es la hidrólisis, mientras que la formación de enlaces, ya sea reacción inversa o transglucosidación, es una reacción forzada.

3.2.5.1 Hidrólisis

Existen dos posibilidades estereoquímicas cuando se hidroliza un enlace: la inversión o retención de la configuración anomérica. Ambos mecanismos involucran estados de transición con un ión oxocarbenium y un par de ácidos carboxílicos en el sitio activo (Rye et al., 2000).

En la mayoría de los casos, la hidrólisis del enlace glucosídico es catalizada por dos residuos de aminoácido en la enzima: un donador de protón (ácido) y un nucleófilo (base). Dependiendo de la posición en el espacio de estos residuos catalíticos, la hidrólisis ocurre por retención o inversión de la configuración anomérica. Los mecanismos de estas reacciones fueron propuestos por Koshland y colaboradores hace casi 60 años (Brás et al., 2012).

3.2.5.1 A) Mecanismo de reacción de glucosidasas de retención

Las glucosidasas de retención funcionan a través de un desplazamiento doble, un mecanismo en el que el intermediario glicosil de la enzima se forma y se hidroliza vía ión oxocarbenium. La reacción es una catálisis ácido/base pero aquí el mismo grupo juega ambos roles. Los dos residuos involucrados, el nucleófilo y el catalizador ácido base, son cadenas carboxílicas de los residuos de ácido glutámico y aspártico, los cuales están localizados en extremos opuestos del sitio activo a 5.5 Å de separación. En el primer paso de este mecanismo se forma un intermediario glicosil-enzima unido covalentemente y el cual tiene una configuración anomérica opuesta a la del sustrato inicial. En el segundo paso se rompe el intermediario y se forma un hemiacetal con la configuración anomérica inicial (Brás et al., 2012).

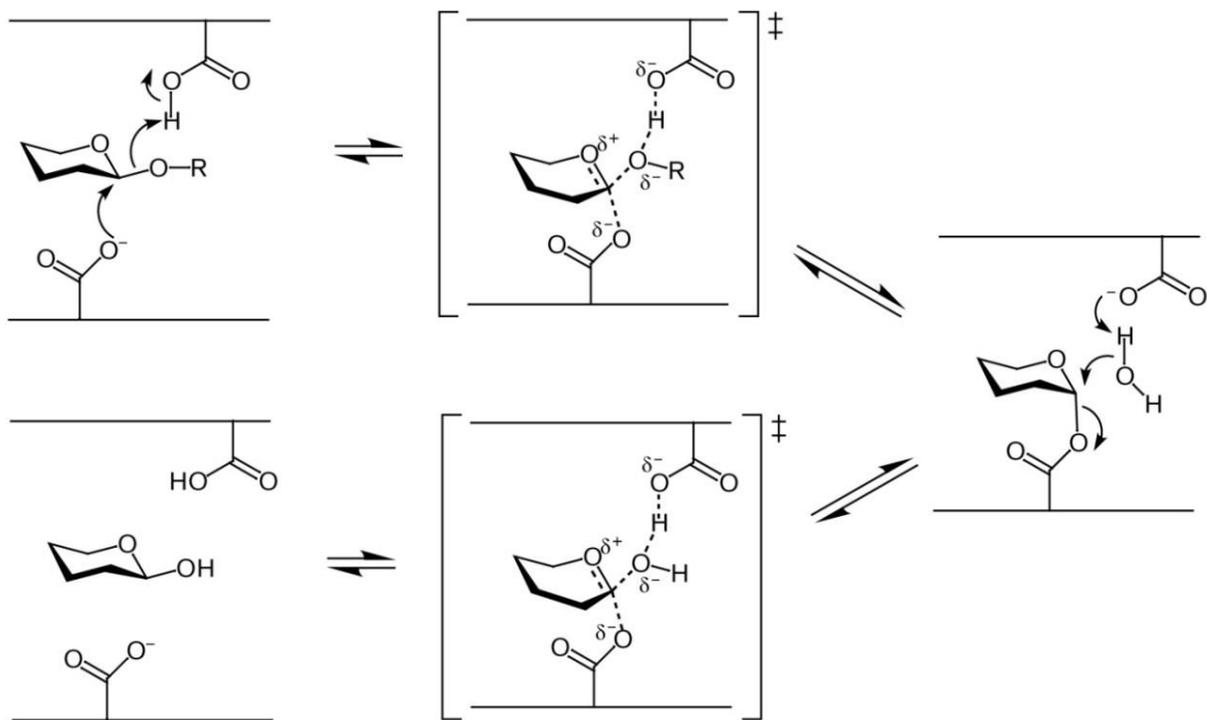


Imagen 9. Mecanismo de una glucosidasa de retención.

3.2.5.1 B) Mecanismo de reacción de glucosidasas de inversión

Las glucosidasas de inversión funcionan en un solo paso donde una molécula de agua causa un efecto en el sitio del centro anomérico. En este mecanismo, los dos residuos carboxílico participantes actúan como catalizadores ácido-base y se encuentran a 10.5 Å de separación, un espacio mayor ya que el sustrato y el agua deben estar presentes en el sitio activo para llevar a cabo la reacción. Este proceso de cambio en el sitio es un catalizador ácido/base, con el sitio activo de amino actuando como la base general, ayudando a desprotonar la molécula nucleofílica de agua, y el otro amino ácido actuando como ácido general, protonando el átomo de oxígeno que se libera (Brás et al., 2012). Hay una inversión en la configuración anomérica del producto ya que no se forma un intermediario enzimático covalente.

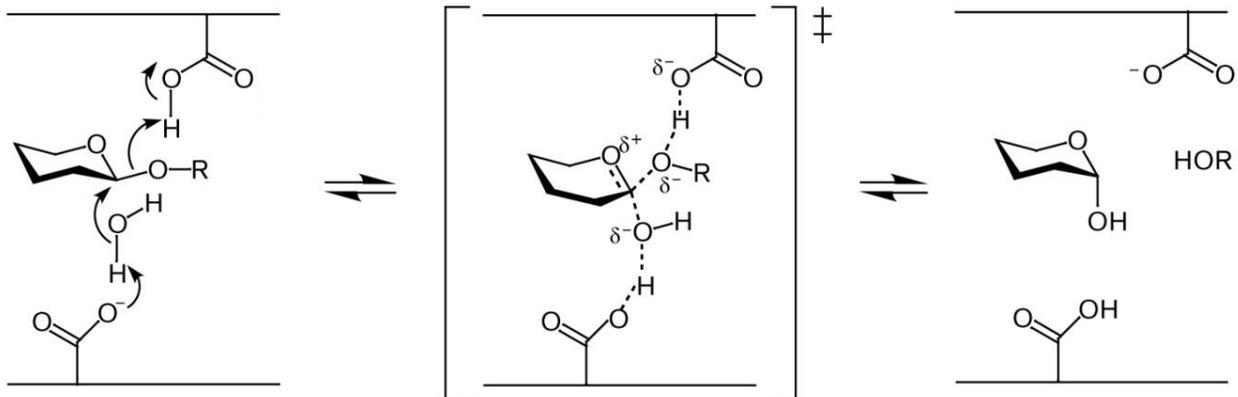


Imagen 8. Mecanismo de una glucosidasa de inversión.

3.2.5.2 Glucosidación

A pesar de que su reacción natural es la de la hidrólisis, las glucosidasas también tienen la capacidad de sintetizar enlaces glucosídicos si se controlan las condiciones de temperatura y velocidad de reacción. De esta forma se realiza la glucosidación enzimática, la formación de enlaces glucosídicos. Para llevarse a cabo se requieren de altas concentraciones de sustrato.

El mecanismo de formación de un enlace glucosídico de forma enzimática es similar al de la formación de glucósidos por medio de una síntesis ácida (Akita et al., 1999). El sitio activo de la β -glucosidasa está conformado por dos grupos carboxílicos los cuales son los que juegan el rol más importante al catalizar la hidrólisis de los enlaces glucosídicos. Uno de ellos es el ión carboxilato que actúa como una base y el otro es el ácido carboxílico el cual actúa, como dice su nombre, cual ácido (Akita et al., 2006).

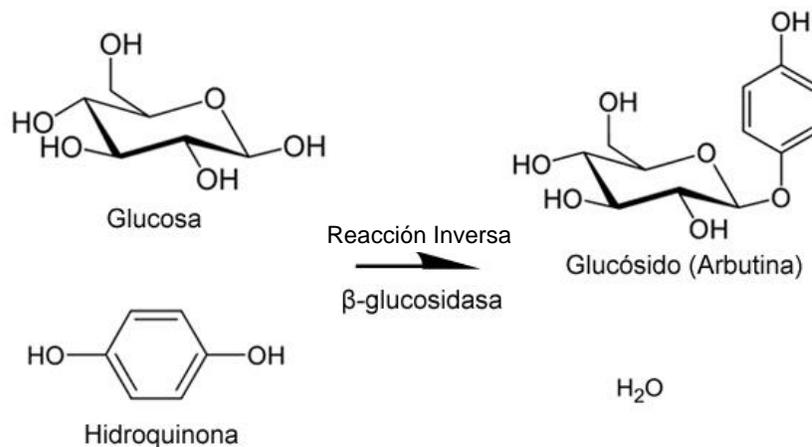


Imagen 10. Esquema general de la reacción de glucosidación por medio de reacción inversa.

La glucosidación con glucosidasas puede lograrse por medio de la transglucosidación y glucosidación directa. Dependiendo del donador de azúcar, la glucosidación puede ser controlada cinéticamente (transglucosidación) o termodinámicamente (glucosidación directa; también llamada reacción inversa). Esto se logra cuando un donador de azúcar y un aceptor son incubados con las glucosidasas apropiadas que catalicen la eficiente y selectiva transferencia del residuo glicosil hacia el aceptor y de esta forma se obtiene el glucósido deseado.

3.2.5.2 A) *Transglucosidación*

Las glicosiltransferasas (EC 2.4.x.y) catalizan la transferencia de azúcares de moléculas donadoras hacia moléculasceptoras específicas, formando así un enlace glicosídico. Existen dos grupos principales de glicosiltransferasas: las que llevan a cabo el mecanismo de Leloir y las que no (Weijers et al., 2008).

Las glicosiltransferasas que siguen el mecanismo de Leloir son responsables de la síntesis de la mayoría de los glicoconjugados de la superficie celular en mamíferos y en la pared celular en plantas, hongos y bacterias. Estas enzimas utilizan donadores nucleótidos y de azúcar. Este mecanismo empieza con la activación del monosacárido por un nucleótido, el cual posteriormente se utiliza para transferir el azúcar a la molécula donadora.

Las fosforilasas son glicosiltransferasas que no siguen el mecanismo de Leloir. Las reacciones en este mecanismo son reversibles ya que no se encuentran involucradas moléculas de agua y la energía de enlace del sustrato glicosil-fosfato es relativamente baja. Estas enzimas son altamente específicas hacia el sustrato donador. Otro ejemplo de enzimas que no siguen el mecanismo de Leloir son las fructosiltransferasas, las cuales transfieren las unidades de fructosa de la sucrosa hacia aceptores, liberándose así glucosa.

La ventaja de las glicosil transferasas yace en el completo control de la regio- y estereoselectividad ya que estas enzimas pueden llevar a cabo su mecanismo invirtiendo o reteniendo la configuración del sustrato.

El método de transglucosidación es una síntesis cinéticamente controlada donde la enzima cataliza la transferencia de un residuo glicosil del donador hacia el aceptor (Divakar, 2013). En este tipo de reacción se alcanzan rendimientos mayores en un periodo de tiempo menor, pero se utilizan donadores de azúcar que pueden resultar muy caros y las glicosiltransferasas son difíciles de obtener, mientras que, en contraste, el acercamiento a esta reacción con glicosidasas utiliza donadores glicosil más simples, el mismo monosacárido libre.

3.2.5.2 B) Glucosidación directa o reacción inversa

La glucosidación directa o reacción inversa, es una síntesis en donde el equilibrio es controlado y este se desplaza hacia la síntesis, a la condensación entre monosacáridos y alcoholes para formar alquil glucósidos como productos

deseados y agua como producto secundario (Divakar, 2013). Esto puede lograrse si se reduce la actividad de agua, si se incrementa la concentración de sustrato o si se remueven, de ser posible, los productos de reacción. Este es un método ampliamente utilizado en la síntesis enzimática de alquil glucósidos y glucósidos fenólicos, como es el caso de glucósidos de cadena larga como el octil glucósido, que son surfactantes no iónicos.

En la glucosidación, el nucleófilo Glu-406 ataca el carbono anomérico (C-1) del sustrato y forma un intermediario glicosil-enzima acompañado de la liberación del aglicona después de la protonación del oxígeno glucosídico por el catalizador ácido Glu-191. En el siguiente paso, Glu-191 actúa como base, y una molécula de agua funciona como nucleófilo y ataca el intermediario glicosil-enzima, liberando así la glucosa y regenerando el nucleofílico Glu-406. Generalmente estos dos ácidos glutámicos catalíticos están posicionados en el sitio activo de la enzima a una distancia aproximada de 5.5 Å (Divakar, 2013).

Se ha reportado que la reacción inversa tiende a rendimientos bajos debido a que el equilibrio se desplaza a la hidrólisis (Yang et al., 2011) ya que el producto en sí es un sustrato para la enzima, la actividad hidrolítica compite con el mecanismo de glucosidación. Pero estos rendimientos se pueden mejorar si se trabaja con una concentración alta de sustratos y con actividad acuosa baja, también se puede realizar una remoción selectiva de producto.

3.3 Capulín (*Prunus serotina*)

El árbol de capulín (*Prunus serotina Ehrh.*) es un árbol que crece silvestremente o cultivado, mide de 20 a 30 m de alto y es nativo de América del Norte, desarrollándose en altitudes entre los 1000 y 3200 m (Alveano et al., 2011). Crece en zonas templadas desde Canadá hasta Bolivia, y está ampliamente distribuido en México. *P. serotina* está distribuida principalmente en cuatro regiones de México: al norte, oeste, centro y sureste, con una mayor incidencia de especies en el centro y oeste. Los principales estados en donde se desarrolla el capulín son

Michoacán, Estado de México, Tlaxcala y Querétaro (Fresnedo-Ramírez et al., 2011). Los frutos de este árbol, comúnmente llamados capulines en México, son una especie de cereza comestible con una piel rojiza oscura y pulpa color verde translúcido, con un diámetro de 1 a 2 cm. En EUA se les conoce como cereza negra o silvestre, en Guatemala como cerezo, en Venezuela lo llaman cerezo criollo y cerezo de los Andes en Colombia.

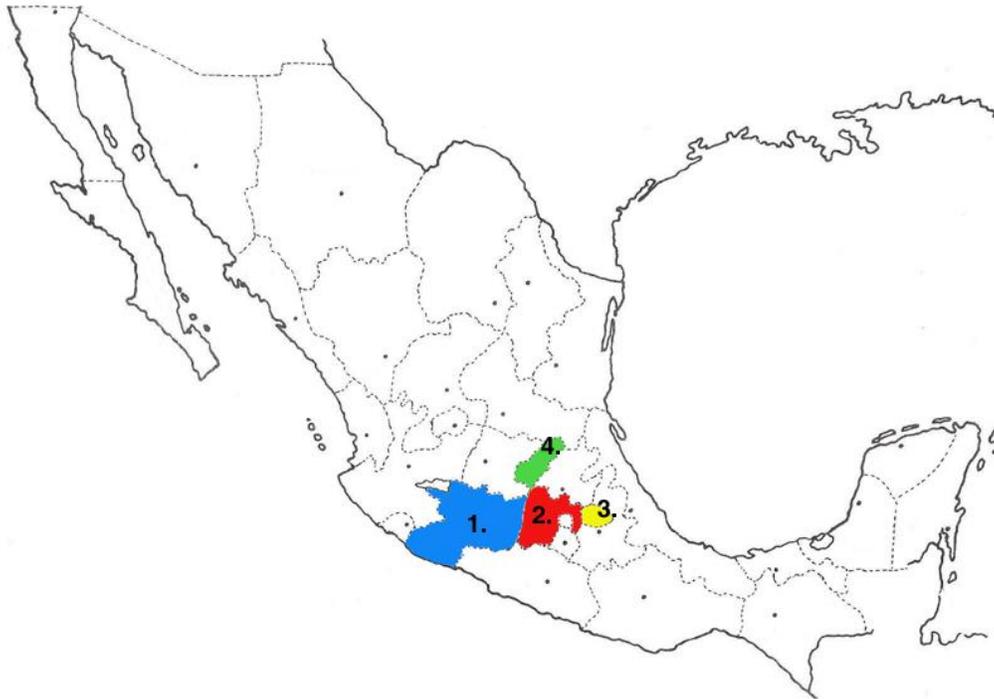


Imagen 11. Principales estados en la República Mexicana donde se desarrolla el capulín:
1. Michoacán, 2. Edo. De México, 3. Tlaxcala, 4. Querétaro..

El capulín corresponde a una especie polimórfica compuesta de un gran número de variedades y subespecies. Taxonomía: División Atofita, Clase dicotiledona, Orden Rosales, Familia *Rosaceae*, Subfamilia *Prunoidea* y Genus *Prunus* (Ordaz-Galindo et al., 1999).

3.3.1 Usos del árbol y frutos de capulín

Las poblaciones indígenas de las regiones donde prolifera este árbol, lo han utilizado para tratar distintas enfermedades. Se ha utilizado su corteza para tratar los síntomas de diabetes aunque tradicionalmente se utiliza para tratar los síntomas inflamatorios como resfrío, fiebre y dolor de garganta. Se conoce también que posee propiedades anticancerígenas. A las hojas y flores de este árbol se les ha encontrado propiedades terapéuticas para enfermedades respiratorias. En Guatemala se prepara una infusión con las hojas del árbol de capulín para tratar trastornos gastrointestinales como diarrea, disentería, cólicos e inflamación, debido probablemente a la actividad antibacterial del extracto de las hojas. Los frutos de *P. serotina* se utilizan en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de diarrea y tos. La madera del árbol también es aprovechada y se usa en la fabricación de muebles debido a su dureza y durabilidad.

El uso más común de *P. serotina* es como parte de la dieta, ya que sus frutos y semillas son más nutritivas que otras semillas dulces o agrias. En México, el capulín se consume fresco o seco y es utilizado para preparar alimentos como mermeladas y licores.

La almendra o semilla del fruto del capulín es muy apreciada y consumida en el centro de México. Esta semilla representa un recurso valioso desde el punto de vista económico y nutricional, pues tiene un buen contenido de proteína y aceite. Sin embargo, las semillas de los frutos del capulín también se consideran un desperdicio del procesamiento de la pulpa y jugo del fruto.



Imagen 12. Árbol de capulín.



Imagen 13. Frutos de capulín.

3.3.2 Composición del fruto de capulín

Tabla 5. Datos de la composición nutricional por cada 100g de fruto de capulín

Compuesto	Cantidad
Calorías	131 kJ
Proteína	0.4 g
Carbohidratos	7.5 g
Agua	89.6 g
Fibra	1.1 g
Grasas	0.3 g
Vitamina A	752 IU
Riboflavina	0.1 mg
Niacina	0.4 mg
Ácido pantoténico	0.3 mg
Vitamina C	1.6 mg
Calcio	11.8 mg
Magnesio	17.6 mg
Hierro	0.2 mg
Sodio	6.9 mg
Fósforo	10.8 mg
Potasio	143 mg
Cobre	0.1 mg
Selenio	0.6 mg
Zinc	0.1 mg

(Benefits Of Black Cherry. [Internet]. 2013. Sitio web Iloveindia. <http://lifestyle.iloveindia.com/lounge/50-things-girls-wish-guys-knew-13207.html> [Accesado Junio 2, 2013])

La caracterización de sus proteínas de reserva indica que tiene un alto contenido en albúminas. A valores de pH 6, 7 y 12 se observa la mayor solubilidad de la proteína. En cuanto a la composición elemental, el contenido es: azufre (0.11%), fósforo (0.17%), calcio (0.07%), magnesio (0.13%), potasio (0.68%) y

sodio (0.10%). La almendra presenta un elevado contenido de lípidos 38-45% y un contenido de proteína del 28% (Raya-Pérez et al., 2012).

Estas semillas contienen distintos compuestos que pueden liberar ácido cianhídrico cuando se muele o pulveriza la semilla, es en este momento cuando se liberan las enzimas que descomponen esos compuestos, tal como: amigdalina hidrolasa, β -glucosidasa, manosidasa, prunasina, cianohidrina y mandelonitrilo liasa. por ejemplo (Kuroki et al., 1987).

4. HIPÓTESIS

Las semillas de capulín contienen β -glucosidasas las cuales pueden utilizarse para sintetizar enzimáticamente diferentes glucósidos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general:

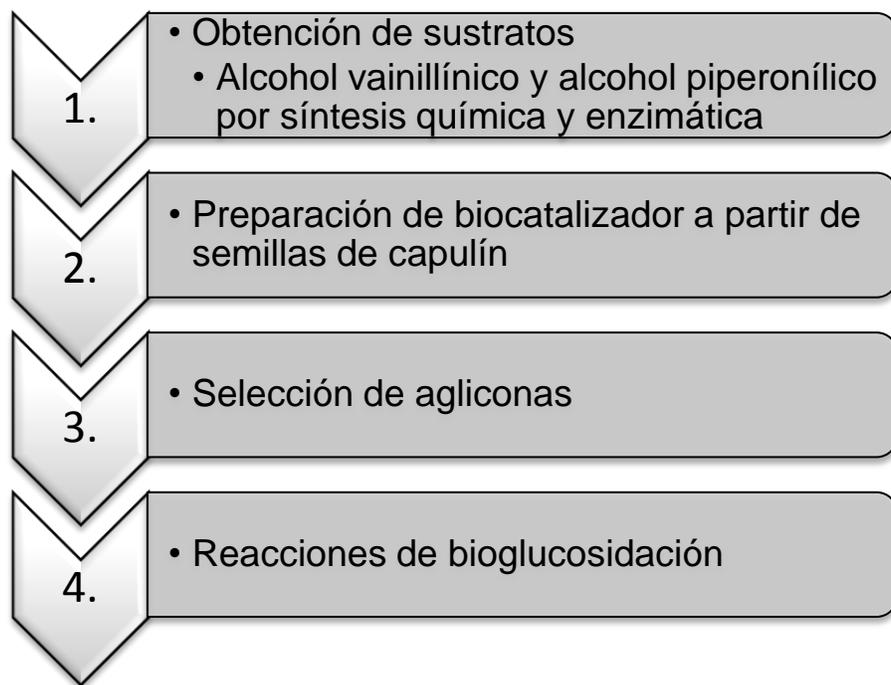
Llevar a cabo la síntesis de alquil glucósidos a través de una ruta verde y biológica, catalizada por las enzimas β -glucosidasas contenidas en las semillas del fruto de capulín.

5.2 Objetivos específicos:

- ❖ Obtención de alcohol vainillínico y alcohol piperonílico a partir de vainillina y piperonal, respectivamente.
- ❖ Preparación de un biocatalizador, a partir de las semillas de capulín, que presente actividad de β -glucosidasa.
- ❖ Realizar una selección de alcoholes para averiguar cuáles son reconocidos por las enzimas del biocatalizador de semillas de capulín.
- ❖ Encontrar las condiciones de reacción para llevar a cabo una síntesis enzimática de glucósidos a partir de glucosa y alcoholes.

6. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Diagrama General



6.1 Material

Material vegetal: Los capulines fueron recolectados en Ixtenco, Tlaxcala, en el año 2012.

6.2 Etapas

El procedimiento experimental se dividió en cuatro etapas: 1.- Obtención de sustratos, 2.- Preparación de biocatalizador 3.- Selección de agliconas, 4.- Reacciones de bioglucosidación.

6.2.1 Etapa 1: Obtención de sustratos

6.2.1.1 Síntesis química

6.2.1.1- Alcohol Vainillínico

Se pesaron de 5g de vainillina y se transfirieron a un matraz de fondo plano de 50ml. Posteriormente se adicionaron 5 ml de etanol al matraz como medio de reacción. Se colocó dentro del matraz una barra de agitación para disolver la vainillina.

Como agente reductor en la reacción se utilizó borohidruro de sodio (NaBH_4). Se preparó una solución de NaBH_4 con una concentración 3.42M en hidróxido de sodio (1.0M). Posteriormente se colocaron 5ml de esa solución en un embudo de adición.

Para la adición del borohidruro de sodio, se colocó el matraz en un baño de hielo el cual se colocó sobre una agitadora magnética. Para evitar que la solución se calentara, se adicionó gota a gota el borohidruro de sodio y se agitó con la barra de agitación, esto en un periodo no mayor a 10 minutos.

Cuando se completó la adición del agente reductor, se retiró el matraz del baño de hielo y se agitó la reacción a temperatura ambiente por 5 minutos más.

Para la eliminación del borohidruro de sodio restante, se añadió ácido clorhídrico (6M) gota a gota para descomponer el NaBH_4 . Se regresó el matraz al baño de hielo y se colocó sobre la agitadora magnética, y se detuvo la acidificación hasta que no se observó desprendimiento de H_2 . Se midió el pH con tiras de papel indicador para corroborar que la solución fuera ácida.

El enfriamiento y agitación continuaron por 10 minutos más hasta la formación de un precipitado. La solución con el precipitado formado se filtró al vacío para recuperar el sólido y secarlo. El filtrado se desechó en la tarja con abundante agua.

El sólido seco se pesó para calcular el rendimiento de la reacción.

Posteriormente se eluyó una placa cromatográfica del producto obtenido, vainillina y el estándar de alcohol vainillínico, utilizando las condiciones descritas a continuación en el apartado "6.2.2.1 a) Sistema de cromatografía".

6.2.2.1 a) Sistema de cromatografía: Placas de sílica gel de 5x2.5 cm. Eluyente: Cloroformo/Metanol/H₂O (4:1:0.1). Revelado con sulfato cérico y posterior calentamiento en parrilla eléctrica.

6.2.1.1- Alcohol piperonílico

Se realizó el mismo procedimiento de síntesis descrito en el apartado "6.2.2.1-Alcohol Vainillínico" utilizando piperonal en lugar de vainillina.

6.2.1.2 Biosíntesis enzimática

6.2.1.2-Alcohol Vanillínico

Material vegetal: Brócoli comprado en un mercado local en la delegación Azcapotzalco, Distrito Federal.

Se pesó 1g de vainillina y se colocó en un matraz de fondo plano de 500 ml. Posteriormente se le adicionaron 250ml de buffer de fosfatos (pH=7) como medio de reacción y se disolvió la vainillina.

Como biocatalizador de la reacción se utilizaron 100 g de la inflorescencia de brócoli los cuales fueron agregados a la solución de vainillina. Se cubrió la boca del matraz con papel aluminio para evitar contaminación o derrame.

La solución con el biocatalizador se mantuvo en agitación durante 3 días a temperatura ambiente.

Habiendo transcurrido ese tiempo, se filtró la solución para separarla de las inflorescencias de brócoli. Se le realizó una extracción con acetato de etilo a la solución y a las inflorescencias de brócoli, por separado. Se recuperaron las fracciones orgánicas y se concentraron en rotavapor.

Se recuperó el sólido formado y se pesó para calcular el rendimiento.

Posteriormente se eluyó una placa cromatográfica del producto obtenido y el estándar de alcohol vainillínico utilizando las condiciones ya descritas en el apartado “6.2.2.1 a) Sistema de cromatografía”.

6.2.1.2-Alcohol Piperonílico

Se repitió el mismo procedimiento descrito en el apartado “6.2.2.2-Alcohol Vainillínico”, utilizando 1 g de piperonal en lugar de vainillina.

El resto de los reactivos utilizados en las reacciones (ácido kójico, octanol, hidroquinona, alcohol isoamílico, alcohol bencílico y butanol) se adquirieron comercialmente.

6.2.2 Etapa 2: Preparación de biocatalizador a partir de semillas de capulín

Manipulación de los frutos: Se tomaron aproximadamente 2kg de fruto de capulín y se separó el epicarpio (cáscara) y mesocarpio (pulpa) de la semilla del capulín manualmente. Posteriormente se realizó un lavado superficial a las semillas utilizando únicamente agua, para retirar los restos de mesocarpio que pudieran haber quedado adheridos a la semilla. Las semillas de capulín se dejaron secar por 24 horas.

Manipulación de semillas: Las semillas secas se rompieron a la mitad con ayuda de pinzas para recuperar el endospermo que contienen. Los endospermos recuperados se remojaron durante 15 minutos en agua a 55°C para facilitar el desprendimiento manual del tegumento (cascarilla).

Manipulación del endospermo: El endospermo libre de tegumento, se trituró en un mortero de porcelana con hexano frío (de 10 a 20 ml) hasta obtener una harina fina. Posteriormente, se realizaron tres lavados con acetato de etilo (10 ml) y uno con acetona (5 ml) para desengrasar la harina. La harina con los disolventes se filtró al vacío hasta estar completamente seca, quedando así listo el biocatalizador. El biocatalizador preparado se guardó en un recipiente de vidrio el cual se colocó en refrigeración para su almacenamiento.

6.2.2.1 Ensayo cualitativo de la actividad de β -glucosidasa

Se pesaron 50 mg del biocatalizador preparado y 50 mg de *p*-nitrofenil- β -D glucopiranosida y se colocaron en un vial de vidrio transparente. Se les adicionó 1 ml de buffer de fosfatos (pH=6.8) y se agitó el vial cerrado. Se realizó también una muestra blanco el cual no contenía biocatalizador de harina de semilla de capulín. Se observó el vire del color de ambas soluciones a los 5 minutos.

6.2.2.2 Medición de la actividad de β -glucosidasa

Curva patrón: Se realizó una curva patrón de *p*-nitrofenol utilizando concentraciones diferentes, desde 0.006 hasta 1.6 mg de *p*-nitrofenol por ml de buffer de fosfatos (pH=6.8), formando siete puntos a lo largo de la curva. Se midió la absorbancia de cada punto a 480 nm por medio de un espectrofotómetro GBC-cintra.

Medición de absorbancia: Posteriormente se preparó una solución de *p*-NPG (*p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosida) 10 mg / 20 ml de buffer de fosfatos. Se preparó una muestra utilizando 2 ml de esa solución y se añadieron 10 mg del biocatalizador de capulín. Se midió la absorbancia de esa muestra cada 60 segundos hasta llegar a 7 minutos, para obtener la actividad de la enzima β -glucosidasa presente en el biocatalizador preparado a partir de semillas de capulín.

6.2.3 Etapa 3: Selección de agliconas

Se pesaron 0.18 g (1 mmol) de glucosa y se colocaron en un matraz de vidrio de 25 ml. Se le adicionó 1 ml de agua destilada al matraz para disolver la glucosa. Esto se realizó ocho veces, una para cada aglicona a utilizar. A cada matraz se le agregó el equivalente en gramos de 5 mmol de la aglicona en cuestión (Tabla 6). A cada matraz se le añadieron 5 ml de dioxano como medio de reacción y 0.3 g del biocatalizador preparado a partir de semillas de capulín. Se colocó un tapón de hule en la boca de los matraces para evitar derrames y evaporación de la mezcla. Los matraces se colocaron en una incubadora a las condiciones descritas en el apartado "6.2.3 a) Condiciones de reacción".

6.2.3 a) Condiciones de reacción: Temperatura de 60°C con agitación constante a 250 rpm durante 72 horas.

Tabla 6. Alcoholes utilizados en la selección de agliconas.

Aglicona	Gramos
Ácido kójico	0.71
Octanol	0.65
Hidroquinona	0.55
Alcohol isoamílico	0.44
Alcohol bencílico	0.54
Butanol	0.37
Alcohol vainillínico	0.85
Alcohol piperonílico	0.84

Sistema de cromatografía en placa fina: Se eluyeron placas cromatográficas de cada reacción para observar si había o no formación del producto deseado. Se compararon los productos obtenidos con un estándar de glucosa y como compuesto de referencia, la aglicona utilizada. Se utilizaron las condiciones descritas en el apartado “6.2.2.1 a) Sistema de cromatografía”.

6.2.4 Etapa 4: Reacciones de bioglicosidación

De acuerdo a la selección de agliconas realizado en el paso anterior, se eligieron las agliconas que presentaron un mejor reconocimiento de la enzima β -glucosidasa para realizar la reacción de glucosidación a una mayor escala.

Se pesaron 0.54 g (3 mmol) de glucosa y se colocaron en un matraz de vidrio de 25 ml. Se le adicionó 1.5 ml de agua destilada al matraz para disolver la glucosa. Esto se realizó cuatro veces, una para cada aglicona a utilizar. A cada matraz se le agregó el equivalente en gramos de 15 mmol de la aglicona en cuestión (Tabla 7). A cada matraz se le añadieron 10 ml de dioxano como medio de reacción y 1 g de biocatalizador. Se colocó un tapón de hule para evitar derrames y evaporación de la mezcla. Los matraces se colocaron en una

incubadora a las condiciones descritas en el apartado “6.2.3 a) Condiciones de reacción”.

Tabla 7. Alcoholes utilizados en las reacciones de glucosidación

Aglicona	Gramos
Octanol	1.95
Alcohol bencílico	1.62
Butanol	1.11
Alcohol vainillínico	2.55

Los matraces se colocaron en una incubadora y las reacciones se mantuvieron a 60°C con agitación constante a 250 rpm durante 72 horas.

Sistema de cromatografía en placa fina: Se repitió la elaboración de placas cromatográficas para corroborar la formación de los productos deseados. Se compararon los productos obtenidos un estándar de glucosa y como compuesto de referencia, la aglicona utilizada. Se utilizaron las condiciones descritas en el apartado “6.2.2.1.1 a) Sistema de cromatografía”.

Concentración de los productos: Se filtraron al vacío las reacciones de glucosidación para después concentrar utilizando el rotavapor con vacío.

6.2.4.1 Sistema de cromatografía en placa fina con estándar de glucósido de alcohol vainillínico

Se elaboró una placa cromatográfica para comparar el producto obtenido de la glucosidación de alcohol vainillínico contra un glucósido de alcohol vainillínico ya caracterizado anteriormente. Se utilizaron las condiciones descritas en el apartado “6.2.2.1.1 a) Sistema de cromatografía”.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Etapa 1: Obtención de sustratos

7.1.1 Síntesis química:

En la síntesis química se utilizó borohidruro de sodio como reductor de la vainillina y del piperonal, por separado. Después de la formación de los respectivos alcoholes, se retiraron los demás reactivos quedando un polvo un polvo de color blanco en ambos casos sin ningún tipo de impurezas. El rendimiento que se obtuvo de alcohol vainillínico fue de 93% y para el alcohol piperonílico fue de 95%.

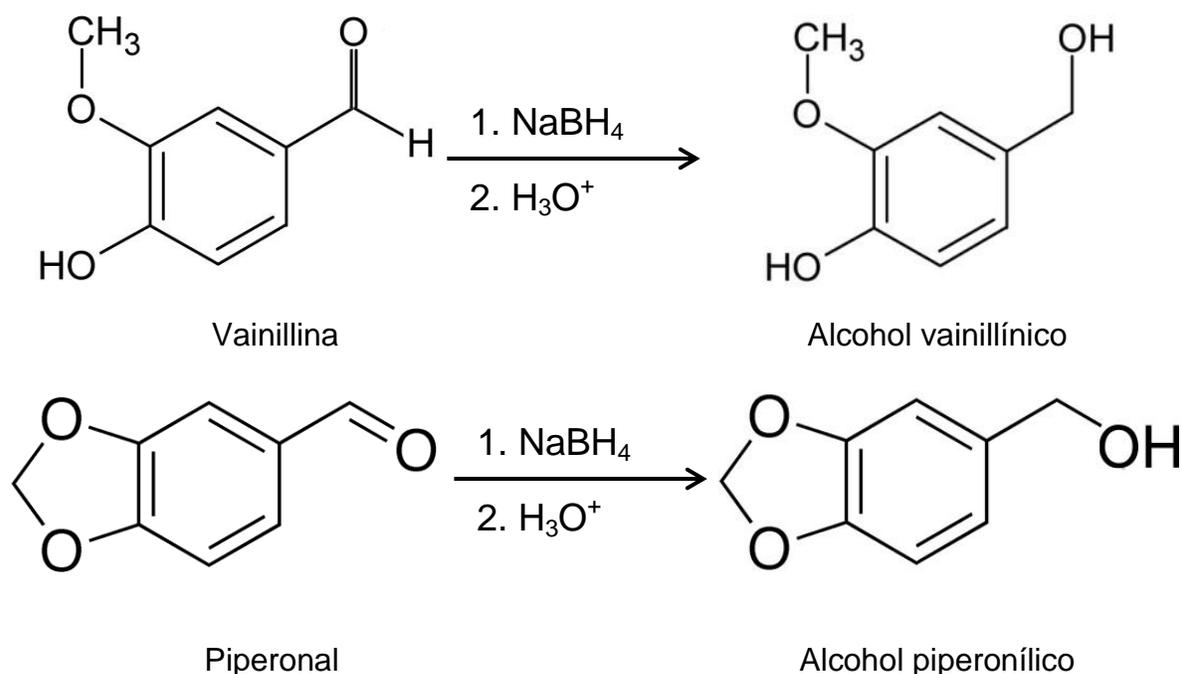
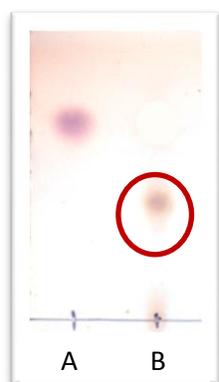


Imagen 14. Esquema de reacción de la reducción de vainillina y piperonal a alcohol vainillínico y alcohol piperonílico, respectivamente.

Para determinar si se había obtenido el producto deseado, se eluyó una placa cromatográfica (imagen 15) con el alcohol vainillínico preparado y con el producto del cual se partió, la vainillina. Se comparó el alcohol vainillínico obtenido, el cual aparece en la sección derecha de la placa cromatográfica, contra

un estándar de vainillina. Se observa un Rf de 0.5, el cual es menor al de la vainillina, 0.8, la cual aparece en la sección izquierda.



A: Vainillina B: Reacción de síntesis química. Se muestra en el círculo el alcohol vainillínico preparado por síntesis química.



A: Piperonal. B: Reacción de síntesis química. Se muestra en el círculo el alcohol piperonílico preparado por síntesis química.

Imagen 15. Placas cromatográfica con alcohol vainillínico y alcohol piperonílico obtenidos por medio de síntesis química.

La solución utilizada para eluir las placas cromatográficas consistió en una mezcla de cuatro partes de cloroformo, una de metanol y 0.1 de agua, haciéndolo así un eluyente no polar en su mayoría. Siendo que la estructura molecular del alcohol vainillínico tiene un grupo $-OH$, presentó una solubilidad menor en el cloroformo, por lo tanto, su Rf fue menor al de la vainillina, la cual casi llegó al borde superior de la placa ya que es más soluble en el cloroformo, el cual conforma la mayor parte del eluyente.

7.1.2 Biosíntesis enzimática:

Como alternativa del método químico, se propuso realizar una síntesis enzimática utilizando la inflorescencia de brócoli como catalizador de la reacción para sintetizar alcohol vainillínico a partir de vainillina, y alcohol piperonílico a partir de piperonal, esto para seguir con la ruta verde. Con la biosíntesis enzimática se obtuvo un

polvo de coloración grisácea en el caso de alcohol vainillínico con un rendimiento de 46%. Para el alcohol vainillínico se obtuvo un 51%.

Se eluyó una placa cromatográfica (imagen 16) con el producto obtenido, con vainillina y con el alcohol vainillínico obtenido por síntesis química. El alcohol vainillínico obtenido de esta reacción aparece en la columna central de la placa, a su izquierda la vainillina y a su derecha el alcohol vainillínico sintetizado químicamente. El R_f relativo del alcohol vainillínico obtenido por la biosíntesis enzimática es el mismo que el del obtenido químicamente, 0.5, comprobándose así que son la misma sustancia. Se alcanzan a ver restos de vainillina en la sección de la reacción de biosíntesis, con el mismo R_f relativo que el de la vainillina pura, 0.8.



A: Vainillina. B: Reacción enzimática. C: Estándar de alcohol vainillínico.

Se muestra en el círculo que se sintetizó alcohol vainillínico en la reacción.

Imagen 16. Placa cromatográfica con alc. vainillínico obtenido por biosíntesis enzimática.

Se observa que la vainillina no reaccionó en su totalidad, esto pudo deberse a que la cantidad de biocatalizador, inflorescencia de brócoli, no fue la suficiente para la cantidad de vainillina utilizada. Otra razón puede ser que el tiempo de reacción fue demasiado corto y no se logró la total biosíntesis de alcohol vainillínico a partir de vainillina.

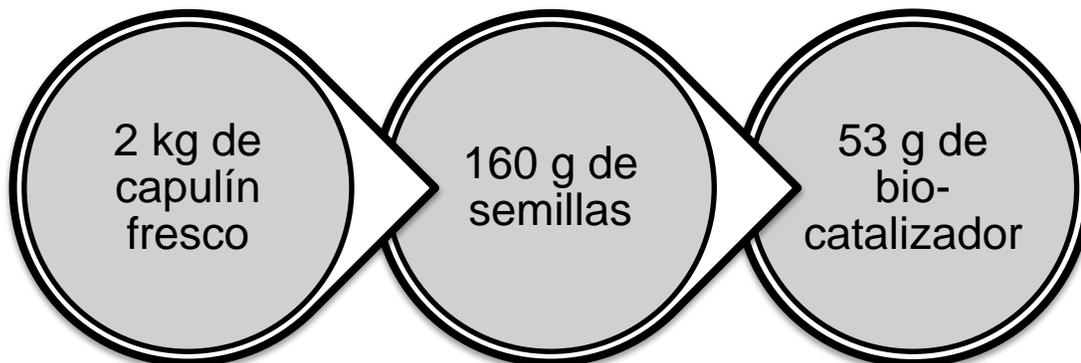
Comparación: De acuerdo a lo observado en la placa cromatográfica (imagen 14), la vainillina en la síntesis química reaccionó casi en su totalidad.

Aunado con el alto rendimiento obtenido, 93%, se puede intuir que este método es el más eficiente, comparándolo con el enzimático, en el cual no se logró la conversión total de vainillina a alcohol vainillínico como se puede ver en la placa cromatográfica (figura 15), además de que el rendimiento obtenido no fue muy bueno, siendo este de 43%. Lo mismo sucedió con el alcohol piperonílico, se obtuvo un mayor rendimiento con la síntesis química (95%) a comparación de la síntesis enzimática (51%).

A pesar de estas inconveniencias, no se descarta el método enzimático ya que en la actualidad se buscan alternativas que sustituyan a los métodos químicos que involucran reactivos que pueden ser contaminantes y peligrosos en cuanto a su manipulación, tal es el caso del agente reductor utilizado en esta reacción, el borohidruro de sodio.

7.2 Etapa 2: Preparación de biocatalizador a partir de semillas de capulín

Para la preparación del biocatalizador se utilizaron aproximadamente dos kilos de capulines maduros. Después de retirar la cáscara y la pulpa, se lavaron las semillas y se dejaron secar a temperatura ambiente. Considerando que la semilla representa el 8% del peso total del fruto, se utilizaron 160 g de semillas. Habiendo estado completamente secas, se rompieron a la mitad con pinzas y así se recuperó el endospermo. Este endospermo está cubierto de una cascarilla la cual se removió después de haberse remojado por 15 minutos en agua caliente. La trituration del endospermo se realizó con ayuda de hexano, ya que por sí solos resultaba difícil. Para desengrasar el endospermo se requirieron cuatro lavados con acetato de etilo y acetona. Después de secarse al vacío, el biocatalizador en forma de harina fina, se almacenó en un recipiente y se refrigeró. Se obtuvieron 53 g de biocatalizador desengrasado, resultando en un rendimiento de 3% con respecto a los capulines frescos y 33% con respecto de las semillas de capulín.



Rendimiento:
3% respecto al capulín fresco
33% respecto a las semillas

En la reacción de detección cualitativa de actividad de β -glucosidasa se observó el vire del color de la solución, de traslúcido a amarillo-verdoso, esto al agregar el biocatalizador a la solución que contenía la muestra control, *p*-nitrofenil- β -D glicopiranosida. Esto indica que se liberó *p*-nitrofenil, impartándole esa coloración a la solución. La liberación de *p*-nitrofenil se llevó a cabo ya que, gracias las β -glucosidasas presentes en el biocatalizador preparado, se rompió el enlace β del compuesto de la muestra control, comprobando así la presencia y actividad de las β -glucosidasas presentes en la harina de semilla de capulín.

En la medición cuantitativa de la actividad de β -glucosidasa, se obtuvo como resultado una actividad volumétrica de 0.38 U/ml (U = μ mol de pNP liberados por minuto). Se comparó la actividad del biocatalizador de la semilla de capulín contra otros biocatalizadores obtenidos de semillas de distintos frutos.

Se deduce que la actividad del biocatalizador realizado en este experimento resultó menor a las reportadas en la tabla 8 ya que este no sufrió de ninguna purificación posterior, por lo tanto, la enzima β -glucosidasa no estaba concentrada en el biocatalizador.

Tabla 8. Actividad total y específica de β -glucosidasas de diferentes fuentes.

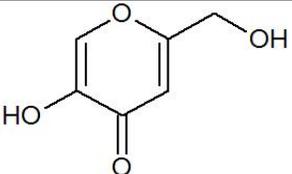
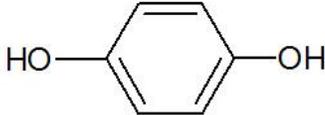
Fuente de enzima	Actividad total (U)
Semilla de <i>Prunus dulcis</i> (Almendra)	3.13
Semilla de <i>Malus pumila</i> (Manzana)	3.36
Semilla de <i>Prunus persica</i> (Durazno)	2.15
Semilla de <i>Prunus armeniaca</i> (Chabacano)	1.72
Semilla de <i>Eriobotrya japonica</i> (Níspero)	0.10
Semilla de <i>Malus domestica</i> (Manzana)*	1.64
Semilla de <i>Prunus serotina</i> (Capulín)**	0.38
β -glucosidasa comercial marca Sigma	5.9

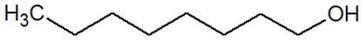
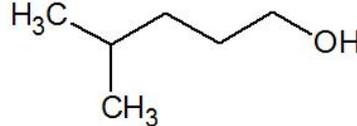
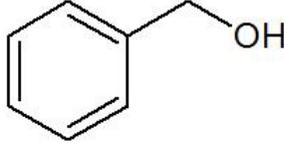
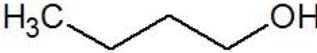
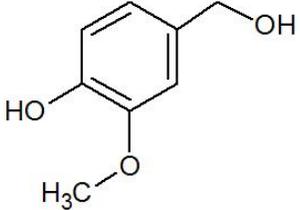
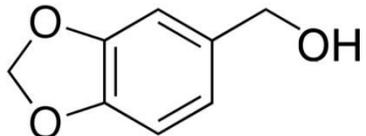
(Lu et al., 2007: Los ensayos de actividad de β -glucosidasa se determinaron midiendo la liberación de *p*-nitrofenol de *p*-nitrofenil β -D-glucopiranosida (pNPG). Los ensayos se llevaron a cabo a 50°C en buffer de fosfatos y se midió absorbancia cada 30 s por 3 min) (*Yu et al., 2007)(**este trabajo).

7.3 Etapa 3: Selección de agliconas

En esta etapa se realizó un monitoreo con ocho diferentes agliconas, dos de ellas preparadas en el laboratorio de forma química y enzimática (alcohol vainillínico y alcohol piperonílico) y el resto adquiridas comercialmente. Esto para observar si es factible llevar a cabo la reacción de glucosidación catalizada por β -glucosidasas de semillas de capulín contenidas en el biocatalizador preparado. Los compuestos utilizados fueron:

Tabla 9. Compuestos utilizados para las reacciones de glucosidación

 <p>Ácido kójico, C₆H₆O₄, 142 g/mol.</p>	 <p>Hidroquinona, C₆H₆O₂, 110 g/mol.</p>
--	---

 <p>Octanol, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{OH}$, 130 g/mol.</p>	 <p>Alcohol isoamílico, $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$, 88 g/mol.</p>
 <p>Alcohol Bencílico, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{OH}$, 108 g/mol.</p>	 <p>Butanol, $\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$, 74 g/mol.</p>
 <p>Alcohol vainillínico, $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_3$, 154 g/mol.</p>	 <p>Alcohol piperonílico, $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$, 152 g/mol.</p>

De acuerdo a estudios previos (Lu, et al., 2010; Yang, et al., 2012) se conocen las condiciones óptimas para que la actividad de β -glucosidasa se desplace hacia la síntesis de glucósidos. La temperatura utilizada fue de 60 °C y el tiempo de reacción fue de 72 horas, ya que se observó que después de ese tiempo no se formaba más producto. Para dirigir el equilibrio termodinámico hacia la síntesis, la reacción enzimática se llevó a cabo utilizando el alcohol aceptor como solvente y se añadió una cantidad mínima de agua al medio de reacción, necesaria para mantener la actividad enzimática en el medio.

Transcurridas las 72 horas de reacción, se realizaron cromatogramas en capa fina de muestras de la mezcla de reacción y se observó la presencia o ausencia de glucósidos después de ser eluidas en Cloroformo/Metanol/ H_2O (4:1:0.1), rociadas con sulfato cérico como revelador y sometidas a calor, para luego ser visualizadas bajo luz ultravioleta.

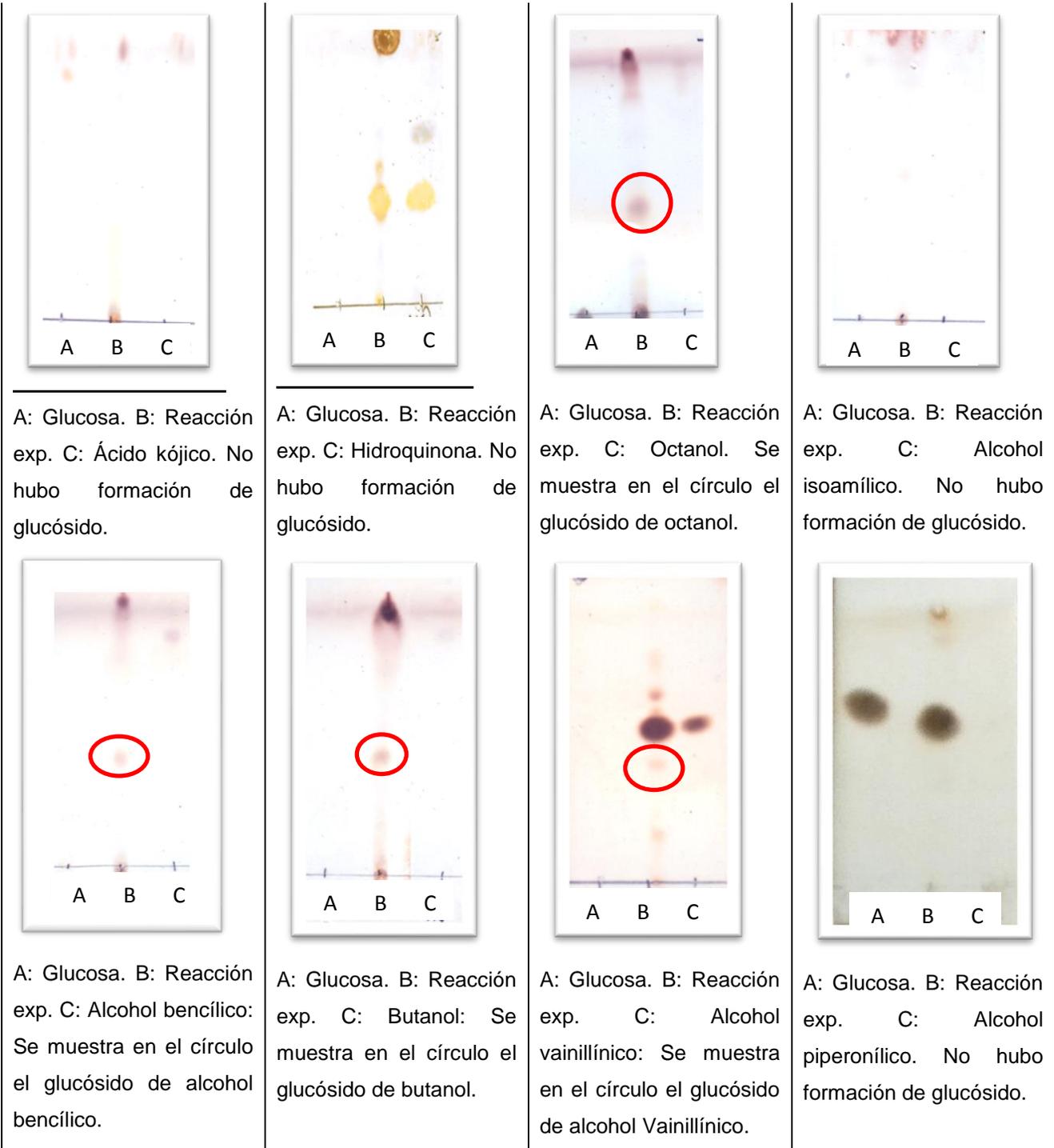


Imagen 17. Placas cromatográficas de la selección de agliconas.

En la imagen 17 se presentan las imágenes de las placas cromatográficas de las ocho agliconas diferentes, señalando en un círculo la formación del glucósido correspondiente. Se puede observar que solamente se formaron los glucósidos del octanol, alcohol bencílico, butanol y alcohol vainillínico. Se calcularon los Rf relativos de cada glucósido y estos fueron los resultados: Glucósido de octanol, 0.6. Glucósido de alcohol bencílico, 0.4. Glucósido de butanol, 0.5. Glucósido de alcohol vainillínico, 0.5.

La cromatografía en capa fina es una técnica que se utilizó para determinar cualitativamente la formación o no del glucósido deseado. En esta técnica, el eluyente asciende a lo largo de la placa cromatográfica arrastrando los distintos compuestos con él. En el caso de la glucosa y el alcohol utilizado en cada reacción, los cuales son sustancias puras, sólo se observará una mancha circular en la sección de la placa donde se eluyeron. En cambio, en la sección donde se colocaron las aplicaciones de la reacción de glucosidación, se observan dos manchas distintas, esto es porque se trata de una mezcla, y por las diferentes velocidades de adsorción de los compuestos, una tarda más que la otra en ascender y así se logra ver los compuestos separados.

Se puede observar en la imagen que se formaron los glucósidos correspondientes en el caso del octanol, el alcohol bencílico, el butanol y el alcohol vainillínico (incisos C, E, F y G). En el caso del ácido kójico, hidroquinona, alcohol isoamílico y alcohol piperonílico, a pesar de que tienen grupos hidroxilo en su estructura, no se llevó a cabo la glucosidación o por lo menos no se puede apreciar a simple vista por medio de las placas cromatográficas. Sería necesario realizar la glucosidación con otro biocatalizador a las mismas condiciones para saber si las enzimas β -glucosidasas presentes en las semillas del capulín no reconocen a esos grupos aglicones.

De acuerdo a estos resultados se eligieron al octanol, alcohol bencílico, butanol y alcohol vainillínico para continuar con los experimentos y llevar a cabo las reacciones de glucosidación.

7.4 Etapa 4: Reacciones de bioglucosidación

Con las placas cromatográficas sólo se puede saber si se llevó a cabo la reacción de glucosidación o no. El paso siguiente es llevar a cabo la reacción de glucosidación a una escala mayor para obtener el glucósido en una mayor cantidad. En esta etapa se eligieron el octanol, alcohol bencílico, butanol y alcohol vainillínico ya que en las placas cromatográficas de sus reacciones fue en donde se alcanzó a ver el producto más claramente. Se utilizaron las mismas condiciones de reacción antes descritas. A continuación se presentan rendimientos en biosíntesis enzimática de glucósidos provenientes de diferentes fuentes:

Tabla 10. Rendimiento y fuente de β -glucosidasa para la formación de glucósidos.

Glucósido	Fuente de β -glucosidasa	Rendimiento
Alcohol bencílico	Ciruela pasa (<i>Prunus domestica</i>)	21% (Yang, et al., 2012)
	Almendra (<i>Prunus dulcis</i>)	28.6% (Kurashima, et al., et al., 2003)
	Método químico Koenigs-Knorr	65.5% (Mastelic, et al., 2004)
Octanol	Palo de Rosa Tailandés (<i>Dalbergia cochinchinensis</i>)	25% (Svasti et al., 2003)
	Almendra (<i>Prunus dulcis</i>)	9% (Rantwijk et al., 2012)
Butanol	Almendra (<i>Prunus dulcis</i>)	25% (Kurashima, et al., 2003)
	Manzana (<i>Malus domestica</i>)	31% (Lu, et al., 2010)
	Durazno (<i>Prunus persica</i>)	30% (Lu, et al., 2010)
Hidroquinona	Manzana (<i>Malus domestica</i>)	15.8% (Tong, et al., 2004)

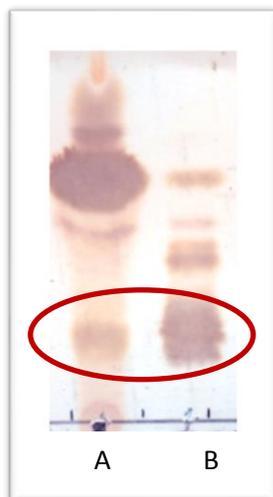
Con respecto a los glucósidos obtenidos en este trabajo experimental con β -glucosidasas de semillas de capulín, sólo se pudo calcular el rendimiento del glucósido de alcohol vainillínico, siendo este de 4.5%. Fue imposible calcular los rendimientos de los demás glucósidos (de octanol, alcohol bencílico y butanol) ya que no se pudo separar el producto obtenido del medio de reacción, solamente se pudo comprobar su síntesis por medio de cromatografía en placa fina.

Como se puede observar en la tabla anterior (tabla 10), todos los rendimientos con el método de biosíntesis enzimática, independientemente de la fuente de la cual se obtuvo la enzima β -glucosidasa o del glucósido que se formó, fueron menores al 30%, lo cual concuerda con lo descrito en el marco teórico. Tomando como ejemplo específico al glucósido de alcohol bencílico, el rendimiento en la biosíntesis enzimática fue de 21 a 28% (con β -glucosidasa de ciruela pasa y de almendra, respectivamente), el cual es sólo una tercera parte del rendimiento obtenido con el método Koenigs-Knorr, el cual es de 65.5%.

Se puede intuir que el biocatalizador preparado a partir de semillas de capulín no tiene una actividad de β -glucosidasa a la altura de las fuentes más utilizadas en la actualidad, como es almendra, manzana, durazno, etc., esto puede deberse a que los capulines utilizados eran comestibles y estaban en un estado de maduración avanzado. Es posible que si se utilizan capulines que hayan crecido silvestremente, la actividad de β -glucósidasa en sus semillas pueda ser mayor y así, poder formar los glucósidos propuestos.

7.4.1 Sistema de cromatografía en placa fina con estándar de glucósido de alcohol vainillínico

En el caso del alcohol vainillínico se pudo comparar el glucósido formado en la síntesis enzimática catalizada con β -glucosidasa de semillas de capulín, con un estándar de glucósido de alcohol vainillínico purificado. A continuación se muestra la imagen de la placa cromatográfica de esta comparación.



A: Glucósido de alcohol vainillínico obtenido enzimáticamente. B: Estándar de glucósido de alcohol vainillínico. Se muestra en el círculo la presencia del glucósido de alcohol vainillínico.

Imagen 18. Placa cromatográfica del glucósido de alcohol vainillínico obtenido enzimáticamente y el estándar de ese glucósido.

Se calculó el Rf relativo obteniendo un valor de 0.4, el cual coincide con el obtenido en la etapa anterior y así se comprueba la formación del glucósido β del alcohol vainillínico.

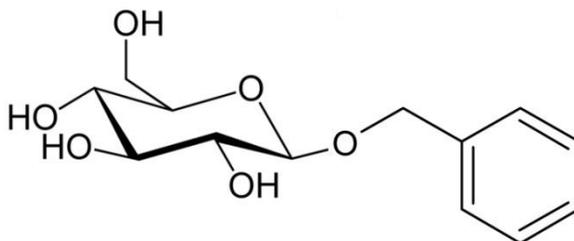
Después de llevarse a cabo la glucosidación de los compuestos, se concentró el producto obtenido en viales color ambar, para evitar cualquier descomposición que pudiera ocurrir, con ayuda del vacío en un rotavapor.

8. CONCLUSIONES

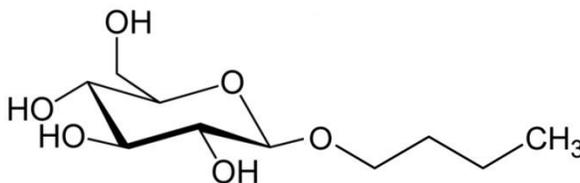
Se sintetizó alcohol vainillínico obteniendo 93% de rendimiento por síntesis química y 46% por biosíntesis enzimática. También se sintetizó alcohol piperonílico obteniendo un 95% de rendimiento por síntesis química y 50% por biosíntesis enzimática.

Se preparó un biocatalizador a partir de semillas de capulín con actividad de la enzima β -glucosidasa.

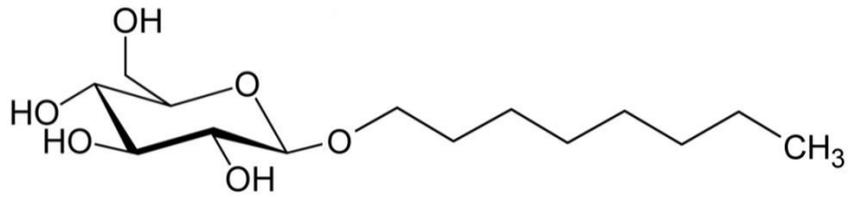
Se logró llevar a cabo la síntesis enzimática de alquil glucósidos a partir de glucosa con: alcohol bencílico, butanol, octanol y alcohol vainillínico, obteniendo productos con las siguientes estructuras.



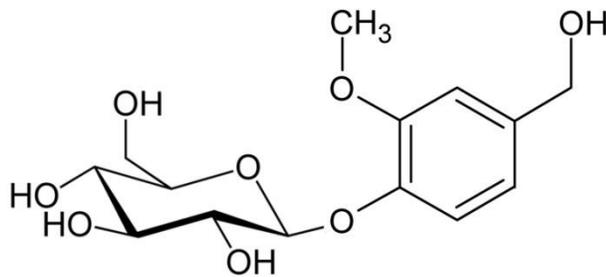
Glucósido de alcohol bencílico, $C_{13}H_{18}O_6$, 270 g/mol



Glucósido de butanol, $C_{10}H_{20}O_6$, 236 g/mol

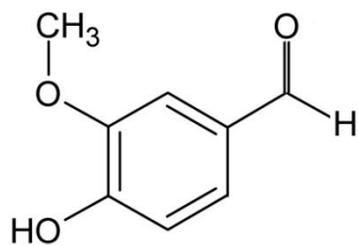


Glucósido de octanol, C₁₄H₂₈O₆, 292 g/mol

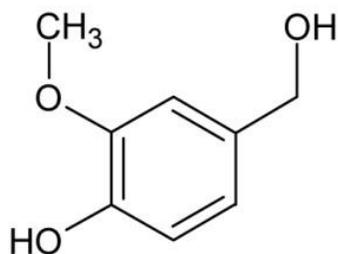


Glucósido de alcohol vainillínico, C₁₄H₁₈O₈, 316 g/mol

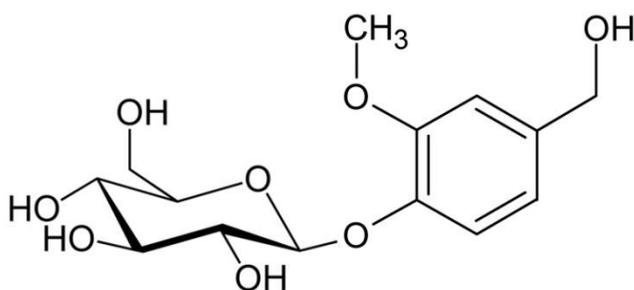
Se concluye también que es factible la obtención de glucósidos, en específico glucósido de alcohol vainillínico, por medio de una ruta totalmente verde y biológica, desde la obtención de materia prima y la reducción de vainillina hasta la glucosidación del alcohol vainillínico con glucosa.



Vainillina; obtenida de la planta de vainilla (*Vanilla planifolia*), una fuente natural.



Alcohol vainillínico; obtenido de la reducción enzimática de la vainillina catalizada por el crudo enzimático preparado a partir de la arborescencia de brócoli.



Glucósido de alcohol vainillínico; obtenido de la glucosidación del alcohol vainillínico catalizada por las β -glucosidasas del biocatalizador de semillas de capulín.

9. PERSPECTIVAS

- Estudiar el efecto que tiene el estado de maduración del fruto de capulín sobre la actividad de la enzima β -glucosidasa presente en sus semillas.
- Mejorar las condiciones de reacción para la biosíntesis de glucósidos.

10. REFERENCIAS

- Akita, H., Kawahara, E., Kishida, M., 2006. Synthesis of naturally occurring β -D-glucopyranoside based on enzymatic β -glycosidation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 40, pp. 8–15.
- Akita, H., Kurashima, K., Nakamura, T., Kato, K., 1999. Chemoenzymatic syntheses of naturally occurring β -glucosides. *Tetrahedron: Asymmetry*, 10, pp. 2429-2439.
- Alveano, I., Rojas, A., Oomah, B., Drover, J., 2011. Characteristics of *Prunus serotina* seed oil. *Food Chemistry*, 124, pp. 983-990.
- Brás, N., Fernandes, P., Ramos, M., Cerqueira, N., 2012. Glycosidases – A Mechanistic Overview, *Carbohydrates-Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*, Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/carbohydrates-comprehensive-studies-on-glycobiology-and-glycotechnology/glycosidases-a-mechanistic-overview>
- Brito-Arias, M., 2007. Synthesis and Characterization of Glycosides. Editorial Springer, pp. 68-137.
- ChEBI: The database and ontology of Chemical Entities of Biological Interest. <http://www.ebi.ac.uk/chebi/>
- Chen, L., Li, N., Zong, M., 2012. A glucose-tolerant β -glucosidase from *Prunus domestica* seeds: Purification and characterization. *Process Biochemistry*, 47, pp. 127-132.
- Dai, X., Ding, Y., Zhang, Z., Cai, X., Li, Y., 2013. Quercetin and quercitrin protect against cytokine-induced injuries in RINm5F β -cells via the mitochondrial pathway and NF- κ B signaling. *International Journal of Molecular Medicine*, 31, pp. 265-271.
- De-Roode, B., Franssen, M., Van der Padt, A., Boom, R., 2003. Perspectives for the Industrial Enzymatic Production of Glycosides. *Biotechnology Progress*, 19, pp. 1391-1402.
- Divakar, S., 2013. Enzymatic Transformation. India, Editorial Springer, pp. 5-21.

- Fabjan, N., Rode, J., Kosir, I., Wang, Z., Zhang Z., Kreft, I., 2003. Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum Gaertn.*) as a source of dietary rutin and quercitin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, pp. 6452-6455.
- Fresnedo-Ramírez, J., Segura, S., Muratalla-Lúa, A., 2011. Morphovariability of capulín (*Prunus serotina Ehrh.*) in the central-western region of Mexico from a plant genetic resources perspective. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 58, pp. 481-495.
- Ismail, A., Soultani, S., Ghoul, M., 1999. Enzymatic-catalyzes synthesis of alkylglycosides in monophasic and biphasic systems. II. The reverse hydrolysis reaction. *Journal of Biotechnology*, 69, pp. 145-149.
- Juárez, J., Obwald, G., Petersen, M., Fessner, W., 2001. The “Natural Strategy” for the glycosidase-assisted synthesis of simple glycosides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11, pp. 189-197.
- Kittl, R., Withers, S., 2010. New approaches to enzymatic glycoside synthesis through directed evolution. *Carbohydrate Research*, 345, pp. 1272-1279.
- Kometani, T., Tanimoto, H., Nishimura, T., Okada, S., 1993. Glucosylation of capsaicin and vainillin by cell suspension cultures of *Coffea arabica*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry Journal*, 57, pp. 1290-1293.
- Kurashima, K., Fujii, M., Ida, Y., Akita, H., 2003. Enzymatic β -glycosidation of primary alcohols. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 26, pp. 87-98.
- Kuroki, G., Poulton, J., 1987. Isolation and Characterization of Multiple Forms of Prunasin Hydrolase from Black Cherry (*Prunus serotina Ehrh.*) Seeds. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 255, pp. 19-26.
- Lu, W., Lin, G., Yu, H., Tong, A., Xu, J., 2007. Facile Synthesis of alkyl β -D-glucopyranosides from D-glucose and the corresponding alcohols using fruit seed meals. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 44, pp. 72-77.
- Lu, W., Sun, X., Zhu, C., Xu, J., Lin, G., 2010. Expanding the application scope of glycosidases using click chemistry. *Tetrahedron*, 66, pp. 750-757.

- Mastelic, J., Maestelic, I., Vinkovic, M., Dzolic, Z., Vikić-Topic, D., 2004. Synthesis of Selected Naturally Occurring Glucosides of Volatile Compounds. Their Chromatographic and Spectroscopic Properties. *Croatica Chemica Acta*, 77 (3), pp. 491-500.
- Ordaz-Galindo, A., Wesche-Ebeling, P., Wrolstad, R., Rodríguez-Saona, L., Argáiz-Jamet, A., 1999. Purification and identification of Capulin (*Prunus serotina Ehrh*) anthocyanins. *Food Chemistry*, 65, pp. 201-206.
- Pandey, A., 2006. Enzyme Technology. Nueva York, Editorial Springer, pp. 65-85.
- Ponce, T., Pérez, O., 2002. Celulasas y xilanasas en la industria. *Avance y Perspectiva*, 21, pp. 273-277.
- Pop, C., Vlase, L., Tamas, M., 2009. Natural Resources Containing Arbutin. Determinations of Arbutin in the Leaves of *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch. acclimated in Romania. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 37 (1), 129-132.
- Purushothaman, S., Murthy, S., 2011. Extraction of β -galactosidase and β -glucosidase from the seeds of *Tamarindus indica*. *International Journal of Biomolecules and Biomedicine*, 1, pp. 8-17.
- Rantwijk, F., Oosterom, M., Sheldon, R., 1999. Glycosidase-catalysed synthesis of alkyl glycosides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 6, pp. 511-532.
- Raya-Pérez, J., Aguirre-Mancilla, C., Tapia-Aparicio, R., Ramírez-Pimentel J., Covarrubias-Prieto, J., 2012. Caracterización de las proteínas de reserva y composición mineral de la semilla de capulín (*Prunus serotina*). *Polibotánica*, 34, pp. 203-215.
- Rye, C., Withers, S., 2000. Glycosidase mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology*, pp. 573-580.
- Sato, T., Takeuchi, H., Takanashi, K., Kurosu, J., Yoshida, K., Tsugane, T., Shimura, S., Kino, K., Kirimura, K., 2003. Selective α -glucosylation of eugenol by α -glucosyl transfer enzyme of *Xanthomonas campestris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96, pp. 199-202.

- Schomburg, D., Schomburg, I., 2000. *Enzymes Handbook*. 2da edición. Berlin, Editorial Springer, pp. 100-131.
- Svasti, J., Phongsak, T., Sarnthima, R., 2003. Transglucosylation o tertiary alcohols using cassava β -glucosidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305, pp. 470-475.
- Tong, A., Lu, Wen, Xy, J., Lin, G., 2004. Use of apple seed meal as a new source of β -glucosidase for enzymatic glucosylation of 4-substituted benzyl alcohols and tyrosol in monophasic aqueous-dioxane medium. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14, pp. 2095-2097.
- Tzeng, Y., Chen, K., Koteswara, Y., Lee, M., 2009. Kaempferitrin activates the insulin signaling pathway and stimulates secretion of adiponect in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular and Cellular Pharmacology*, pp. 56-64.
- Weijers, C., Franseen, M., Visser, G., 2008. Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides. *Biotechnology Advances*, 26, pp. 439-456.
- Withers, S., 1995. Enzymatic cleavage of glycosides: How does it happen? *Pure and Applied Chemistry*, 67, pp. 1673-1682.
- Yang, R., Li, N., Zong, M., 2012. Using ionic liquid cosolvents to improve enzymatic synthesis of arylalkyl β -D-glucopyranosides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 74, pp. 24-28.
- Yoshiara, L., Madeira, T., Ribeiro, M., Mandarino, J., Carrao-Panizzi, M., Isa, E., 2012. β -glucosidase activity of soybean (*Glycine max*) embryonic axis germinated in the presence or absence of light. *Journal of Food Biochemistry*, 36, pp. 699-705.
- Yu, H., Xu, J., Lu, W., Lin, G., 2007. Identification, purification and characterization of β -glucosidase from apple seed as a novel catalyst for synthesis of O-glucosides. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, pp. 354-361.
- Zakaria, N., 2011. Anti-inflammatory effect of Some Natural Flavonoids on the Hepatic Lysosomal Enzymes in Rats. *New York Science Journal*, 4(8), pp. 6-14.