



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE POLIGLICÓSIDOS FENÓLICOS DE INTERÉS INDUSTRIAL

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias**

**PRESENTA:
Mayra Rebeca Escribano Gómez**

**TUTOR PRINCIPAL
Dr. Edmundo Castillo Rosales, IBT-UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. Marcela Ayala Aceves, IBT-UNAM
Dra. Laura Patricia Álvarez Berber, ICQ-UAEM**

Cuernavaca, Morelos, México.

2017



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.

Dedico este trabajo a mis padres, Juan Escribano y Elvia Gómez, por ser el gran apoyo de mi vida. Agradezco el ánimo, la confianza y amor que me han brindado. Esta tesis es dedicada con gran orgullo a Ustedes.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología-UNAM, bajo la tutoría del Dr. Edmundo Castillo Rosales en el Laboratorio de Tecnología Enzimática del Dr. Agustín López-Munguía Canales.

El proyecto contó con financiamiento por parte de PAPIIT-UNAM donativo IN209016. Durante los estudios de maestría se contó con la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con número de registro 630448.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Edmundo Castillo por permitirme realizar este proyecto, por sus valiosas observaciones y las enseñanzas brindadas.

Al Dr. Agustín López por la oportunidad de formar parte de su laboratorio. Gracias por el apoyo, la confianza y la orientación.

A mi Comité Tutor, las Dras. Marcela Ayala Aceves y Laura P. Álvarez Berber por las valiosas aportaciones y recomendaciones.

A los integrantes de mi Comité Revisor de Tesis, Dra. Claudia Martínez Anaya, Dr. Jorge Luis Folch Mallol, Dr. Guillermo Gosset Lagarda, Dra. Liliana Hernández Vázquez, Dra. Clarita Olvera Carranza, gracias por su tiempo y comentarios que ayudaron a enriquecer este proyecto.

A la técnico académico M. en C. Ma. Elena Rodríguez, gracias por la ayuda brindada en diversas etapas y la orientación proporcionada.

A la técnica Sra. Aurelia Ocampo por su valioso apoyo técnico.

Al técnico Sr. Fernando González, por su apoyo en el montaje de las técnicas cromatográficas.

Al Dr. Alfonso Miranda, por la asesoría académica y clases brindadas para el desarrollo de este proyecto de investigación.

Al Instituto de Biotecnología por brindarme las facilidades en el uso de sus instalaciones para la realización de este proyecto que es un sueño y reto alegremente logrado.

A la Universidad Nacional Autónoma de México a la cual estoy orgullosa de pertenecer. Agradezco la extraordinaria formación académica y personal que me permitió desarrollar.

MÁS AGRADECIMIENTOS..

Al Dr. Edmundo Castillo, por la confianza y las aportaciones para realizar este complejo proyecto.

Al Dr. Agustín López por la confianza al permitirme ser parte de su grupo de investigación. Gracias por el apoyo brindados. Mi más sincera admiración por su gran capacidad.

A los miembros de mi Comité Tutor, la Dra. Marcela Ayala Aceves y Dra. Laura P. Álvarez Berber, les reiteró mi agradecimiento por las críticas, confianza y paciencia. Nuevamente, a los integrantes de mi Comité Revisor de Tesis por apoyarme con sus aportaciones, sus valiosas perspectivas y ayudarme a dimensionar este interesante trabajo.

Al personal de ALM, por su apoyo académico y personal. A Male quién aporta un gran entusiasmo al laboratorio, gracias por las recomendaciones, sus comentarios de apoyo y también por fomentar los convivios. A doña Aurelia, una linda persona que lo refleja en todas sus acciones, eres un sol Au. A Fernando por su saludo alegre. De manera especial a Larisa, por ser una excelente vecina con su agradable y sincera platica. A Judith por su apoyo técnico y salvarnos con el cafecito. A Ponchito, un buen compañero y maestro, gracias. A la Dra. Liliana quién con su experiencia contribuyó a este trabajo. A mis compañeros de laboratorio, todos ellos Jorge, Angelita, Cristina, Maira, Silvia, Jaime, Diana, Kike, Flor y todos los que contribuyen para este laboratorio. De manera personal agradezco a Cristina que me brindo mucho apoyo dentro y fuera de laboratorio.

A las personas maravillosas que pude conocer durante esta etapa, a todos ellos por brindarme las alegrías y reducir las penas a veces sin proponérselo, gracias Esme, Karen. A mis compañeros de maestría, todos ellos. A los Masters, gracias por los miércoles de fut. También a Adrián por el apoyo que brindas pero sobretodo tu gran actitud.

De manera reiterada a mis amados padres, gracias por su valioso cariño, porque me lo demuestran en un sinfín de formas. Aprecio sus palabras, acciones y bendiciones. Sigamos así.

A mi familia quiénes siempre están en mi corazón y mis pensamientos. Por la solidaridad que me han demostrado, dedico con gran cariño y admiración a la Sra. Xóchitl Gómez y a mis queridos Carlos y Marlene; gracias por su afecto y que sigan las alegrías. A mis amigas de hace tiempo especialmente a Alery, Vicky, Luz, Katito y Penélope.

A Uriel, gracias por enriquecer tanto mi vida, por la luz y el amor. A la familia Zamora por su apoyo en tantos aspectos, valoro mucho que me permitieran participar de su hogar.

A la familia Sandoval por su apoyo e invaluable atenciones en varios momentos, soy afortunada de conocerlos.

ÍNDICE

1. RESUMEN	10
2. INTRODUCCIÓN	11
3. ANTECEDENTES	13
3.1. Glicósidos: generalidades e importancia	13
3.2. Efecto de la glicosilación sobre funciones biológicas y propiedades químicas	14
3.3. Compuestos fenólicos glicosilados, generalidades y aprovechamiento	15
3.4. Diversidad estructural de agliconas fenólicas y su naturaleza hidrofóbica	16
3.5. Modulación de la solubilidad acuosa de compuestos fenólicos por efectos de la glicosilación	18
3.6. Síntesis química de glicósidos	20
3.7. Síntesis enzimática de glicósidos	22
3.7.1. Glicosidasas	23
3.7.2. Glicosiltransferasas	26
3.8. Aplicaciones específicas de Gli-S y CGT para la poliglicosilación de fenoles	31
3.8.1. Glicansacarasas	31
3.8.2. Ciclodextringlucanotransferasa (CGT)	34
4. HIPÓTESIS	39
5. OBJETIVOS	39
6. METODOLOGÍA	40
6.1. Producción de enzimas Dextransacarasa (DXS)	40
6.2. Concentración y almacenamiento de la enzima DXS	41
6.3. Medición de la actividad enzimática para DXS	41
6.4. Reacciones de transferencia sobre diversos aceptores fenólicos	41
6.5. Identificación de sustratos y productos por Cromatografía en Capa Fina	43
6.6. Cuantificación de compuestos dihidroxifenoles y arbutina mediante HPLC	43
6.7. Detección de productos glicosilados de dihidroxifenoles mediante HPLC	44
6.8. Cuantificación de actividad de ciclización de la enzima CGT en presencia de cosolventes orgánicos	44

6.9. Determinación de solubilidad de agliconas fenólicas en medios adicionados con diferentes cosolventes _____	44
6.10. Cuantificación de ácido cafeico, resveratrol, quercetina y naringenina mediante HPLC _____	45
7. RESULTADOS Y DICUSIÓN _____	46
7.1 Producción de la enzima dextranasa _____	46
7.2. Selección de enzima transferasa para poliglicosilar aceptores fenólicos _____	47
7.2.1. Transferencia sobre agliconas dihidroxifenólicas _____	47
7.2.2. Cinética de glucosilación de hidroquinona con CGT _____	52
7.2.3. Cuantificación de conversión de aceptor dihidroxifenólico por DXS o CGT _____	54
7.2.4. Transferencia sobre fenoles monoglucosidados: reconocimiento de los productos de glucosilación como moléculas aceptoras _____	55
7.2.5. Cuantificación y distribución de los glucósidos sintetizados por DXS y CGT _____	58
7.3. Poliglicosilación de diversas estructuras fenólicas mediante CGT comparando medios de reacción acuosos o con 20% cosolventes orgánico _____	60
7.4. Efecto del porcentaje de cosolventes en la solubilidad de la agliconas flavonoide y la estabilidad de enzima CGT _____	64
7.5. Poliglicosilación de flavonoides mediante CGT _____	65
8. CONCLUSIONES _____	70
9. PERSPECTIVAS _____	71
10. ANEXOS _____	72
11. BIBLIOGRAFIA _____	75

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura del glicósido isoquercitrina _____	13
Figura 2. Estructura del poliglicósido esteroideo dioscina _____	13
Figura 3. Estructuras de compuestos fenólicos _____	15
Figura 4. Principales métodos de síntesis química de glicósidos _____	21
Figura 5. Mecanismos de hidrólisis de enzimas glicosidasas _____	24
Figura 6. Vías de glucosilación de glicosidasas _____	24
Figura 7. Actividades de ciclodextrin glicosiltransferasa (CGT) _____	28

Figura 8. Esquema de las reacciones catalizadas por Glicansacararas	30
Figura 9. Estructura de glucansacarasa (GTF 180-Δ N mutante D1025N) unida a sacarosa, indicando los subsitios de unión	34
Figura 10. Mecanismo de las actividades presente en la CGT indicando la presencia de subsitios de reconocimiento de sustratos	37
Figura 11. Compuestos dihidroxifenoles evaluados	47
Figura 12a. Análisis de TLC para reacciones catalizada con DXS, reveladas con UV	48
Figura 12b. Análisis de TLC para reacciones catalizada con CGT, reveladas con UV	48
Figura 13. Análisis de TLC para reacciones catalizadas con DXS, revelada con α-naftol	50
Figura 14. Análisis de TLC para reacciones catalizada con CGT, revelada con α-naftol	50
Figura 15. Concentración relativa de especies glucosídicas de hidroquinona en la cinética de reacción mostrada por CGT	53
Figura 16. Estructura de arbutina y salicina	56
Figura 17. Análisis de TLC para reacciones catalizadas con DXS y CGT usando aceptores arbutina y salicina	57
Figura 18. Cromatograma de 40 horas de reacción del aceptor hidroquinona con CGT, ampliado en las señales de los productos glucósidos	59
Figura 19. Reacciones de glucosilación de aceptores ácido cafeico y resveratrol	60
Figura 20. Análisis de TLC (UV _{254nm}) para reacciones con ácido cafeico o resveratrol en medios con 20% cosolvente o buffer de fosfatos	61
Figura 21. Cromatograma de 40 horas de reacción de resveratrol con CGT en tres medios de reacción	63
Figura 22. Análisis de TLC (α-naftol) para reacciones de quercetina con CGT en buffer o 20% cosolvente	66
Figura 23. TLC de transferencia sobre quercetina y naringenina empleando CGT en 35% DMSO. Revelado con α-naftol	67
Figura 24. Cromatograma de reacción de Naringenina con CGT, ampliado en las señales de los productos glucósidos	68

Índice de Tablas

Tabla 1. Solubilidad acuosa de diversos compuestos fenólicos_____	17
Tabla 2. Solubilidad acuosa de compuestos fenólicos y sus derivados glicosilados __	18
Tabla 3. Solubilidad acuosa de compuestos flavonoide, curcumina y sus derivados glicosilados _____	19
Tabla 4. Reportes de glicosilación de fenoles utilizando glicansacarosas _____	31
Tabla 5. Reportes de glucosilación de inositoles, fenoles y glicósidos utilizando ciclodextrin-gluconotransferasa _____	34
Tabla 6. Composición del medio de cultivo LM _____	40
Tabla 7. Resumen de las condiciones de reacción, sustratos utilizados y enzimas evaluadas en las diferentes reacciones de glucosilación de fenoles _____	43
Tabla 8. Distribución de actividad glucosiltransferasa de cepas de <i>L. mesenteroides</i> _	46
Tabla 9. Rf de señales detectadas con UV _{254nm} en TLC para las reacciones con DXS o CGT usando aceptores catecol, resorcinol o hidroquinona _____	49
Tabla 10. Conversión de aceptor en reacciones de glucosilación catalizadas con DXS o CGT _____	54
Tabla 11. Cuantificación de producto glucósido de dihidroxifenol generados por DXS _____	58
Tabla 12. Distribución de productos glucósido de dihidroxifenol generados por CGT _____	59
Tabla 13. Conversión en porcentaje y mM de aceptores fenólicos en medios de reacción con 20% co-solvente y control buffer _____	62
Tabla 14. Solubilidad (g/l) de agliconas flavonoides en medios acuoso y con distintos contenidos de cosolventes _____	64
Tabla 15. Actividad de ciclización y porcentaje de actividad retenida (%) por CGT en distintos contenidos de cosolventes respecto al medio acuoso _____	65
Tabla 16. Conversiones de aceptor flavonoide para reacciones con CGT _____	69

ABREVIATURAS

Abreviación	Significado
2M2B	2-metil, 2-butanol
2M2P	2-metil, 2-propanol
ARB	Arbutina
CGT	Ciclodextrin glicosiltransferasa o Ciclomaltodextrin gluconotransferasa
CT	Catecol
D.O.	Densidad óptica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
DXS	Dextrantransferasa de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> cepa 1299
FTF	Fructosiltransferasa o fructansacarasa
g1	Glucósido de naringenina-grado de glucosilación 1
g2	Glucósido de naringenina-grado de glucosilación 2
g3	Glucósido de naringenina-grado de glucosilación 3
g4	Glucósido de naringenina-grado de glucosilación 4
GG	Grado de glucosilación
GH	Glicosidasa o glicosil hidrolasa
Glc, glc	Glucosa
Gli-S	Glicansacarasa
GT	Glicosiltransferasa
GTF	Glucosiltransferasa o glucansacarasa
GT-L	Glicosiltransferasa Leloir
GT-NL	Glicosiltransferasa no Leloir
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (High Performance Liquid Chromatography)
HQ	Hidroquinona
MEE	Bis(2-Metoxiétil) éter
mM	Milimolar
nm	Nanómetros
Rg1	Resveratrol-grado de glucosilación 1
Rg2	Resveratrol-grado de glucosilación 2
Rg3	Resveratrol-grado de glucosilación 3
Rg4	Resveratrol-grado de glucosilación 4
Rg5	Resveratrol-grado de glucosilación 5
Rg5a	Resveratrol-grado de glucosilación 5a
Rg6	Resveratrol-grado de glucosilación 6
RS	Resorcinol
sA	sin aceptor aglicona
SAL	Salicina
TFA	Ácido trifluoroacético
TLC	Cromatografía en Capa Fina (Thin Layer Chromatography)
α -CD	α -ciclodextrina
β -CD	β -ciclodextrina
δ -CD	δ -ciclodextrina

1. RESUMEN

En el presente trabajo se reporta la síntesis enzimática de diferentes glucósidos fenólicos con al menos dos residuos de glucosa (poliglucósidos). Entre los diferentes compuestos fenólicos evaluados, se incluyeron moléculas de tipo dihidroxibencenos (catecol, resorcinol e hidroquinona), de tipo fenilpropanoides o estilbenos (ácido cafeico y resveratrol) y de tipo flavonoides (quercetina y naringenina).

En una primera etapa, las enzimas dextranasa (producida por la cepa 1299 de *Leuconostoc mesenteroides*, DXS) y ciclodextrin glicosiltransferasa (CGT) fueron evaluadas en su capacidad para transferir al menos dos residuos de glucosa sobre dihidroxibencenos y sus derivados monoglucosilados. La enzima DXS únicamente sintetizó productos monoglucósidos y exclusivamente cuando se utilizaron dihidroxibencenos como moléculas aceptoras, mostrando en consecuencia, una capacidad muy limitada para sintetizar moléculas poliglucosiladas. Por el contrario, la enzima CGT mostró una capacidad relevante para glucosilar moléculas tanto agliconas como sus derivados monoglucosilados generando hasta 8 productos de distinto grado de glucosilación (GG), con acumulación preferente de los productos con GG menores a 4. Además, la CGT mostró una notable estabilidad operacional en las condiciones de alta concentración de sustratos logrando rendimientos de conversión de inclusive 41% de aceptor dihidroxibencénico (123 mM).

Los resultados de la cinética de formación de poliglucósidos de hidroquinona mediante CGT mostraron que la síntesis de productos con distintos GG ocurrió desde tiempos iniciales lo cual fue atribuido al mecanismo de la enzima para transferir bloques glicosilo de diversa longitud en eventos paralelos o simultáneos. También se detectó que la actividad de desproporcionación contribuyó, aunque en menor medida, para definir los perfiles finales de estos productos propiciando la acumulación de productos de GG 1-4. El presente reporte es el primero del que se tiene conocimiento de la obtención de mono- y poliglucósidos de aceptores dihidroxibencenos mediante CGT, así como del desarrollo de estudios cinéticos para la formación de dichos productos. Derivado de los ensayos de glucosilación por enzimas DXS o CGT se propuso un esquema comparativo de las diferencias entre las enzimas para generar poliglucósidos de los fenoles simples de tipo dihidroxibenceno.

Cabe mencionar que para la síntesis de poliglucósidos de estructuras fenólicas más complejas se requirió el empleo de cosolventes los cuales en algunos casos resultaron imprescindibles para el desarrollo de las reacciones de poliglucosilación con los aceptores propuestos. Para el aceptor resveratrol sólo en los medios con 20% de cosolvente se observó formación de diversos productos de poliglucosilación además de alcanzar una conversión de aglicona de hasta 41.4% respecto al 2.5% en medio acuoso. Para el caso de agliconas flavonoide, el empleo de 35% de dimetilsulfóxido (DMSO) aumentó la solubilidad de agliconas y mantuvo una importante retención de la actividad de CGT hasta 82%, permitiendo la glucosilación de flavonoides quercetina y naringenina con conversiones de 26 y 15% (78 y 45 mM) respectivamente.

2. INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos forman una familia de compuestos extensamente diseminados en la naturaleza, de hecho, se considera que sólo después de los carbohidratos son la materia orgánica más abundante (Kuhnert, 2013). En las plantas forman uno de los principales grupos de metabolitos secundarios y se les atribuyen entre otras tanto funciones fisiológicas asociadas al desarrollo y reproducción, como funciones de defensa contra depredadores, protección contra rayos ultravioleta, propiedades antibióticas o nutraceuticas (Harborne y Williams, 2000). Estas propiedades benéficas y saludables de los fenoles han sido aprovechadas no sólo por las plantas sino también por los seres humanos a lo largo de su existencia, accediendo a estos compuestos vía el consumo de frutas y vegetales. De hecho, se sabe que el consumo diario en humanos puede alcanzar los 10 g de fenoles al día por individuo teniendo como origen una dieta rica en alimentos de origen vegetal (Kuhnert, 2013).

En los últimos años esta amplia variedad de funciones ha despertado un interés particular por su valorización y aprovechamiento tanto como elementos nutricionales o como activos farmacéuticos. Así, el conocimiento empírico sobre los beneficios atribuidos a los fenoles ha sido demostrado científicamente y reflejado en la actualidad en la disminución de incidencia de enfermedades tales como cáncer, diabetes u osteoporosis (Harborne y Williams, 2000; Middlenton *et al.*, 2000).

Los compuestos fenólicos presentan como elemento común en su estructura uno o más grupos hidroxilos unidos directamente a un anillo benceno. Adicionalmente a este arreglo se pueden incorporar diferentes grupos funcionales tales como ésteres, metil ésteres, éteres, glicósidos, etc. o en su caso unidades repetitivas de esta estructura básica, lo que los clasifica entonces como polifenoles. Con base en este arreglo estructural, se han identificado una gran variedad de compuestos fenólicos con importante funcionalidad que se clasifican como alcoholes, difenoles, ácidos fenólicos, ácidos cinámicos, cumarinas, flavonoides, flavonas e isoflavonas, flavonoles, flavononas (Maestro-Durán y Borja-Padilla, 1993; Martínez-Valverde *et al.*, 2000).

Es importante mencionar que, si bien los posibles grupos funcionales y arreglos estructurales de los diversos compuestos fenólicos determinan en gran medida su actividad, dicha estructura específica también hace difícil su aplicación y aprovechamiento a gran escala. En efecto, la naturaleza hidrofóbica de los fenoles y polifenoles los hace poco compatibles con formulaciones acuosas o sistemas fisiológicos, generalmente de naturaleza polar, en donde su solubilidad puede ser muy limitada. En el caso particular de los fenoles y polifenoles, su presencia en la naturaleza es generalmente en forma de glicósidos. Es decir, en compuestos formados por un grupo de naturaleza no-azúcar, llamada aglicona, unida covalentemente a uno o dos moléculas de azúcar (glicona o residuo glicosilo) a través de un enlace de tipo glicosídico. Aunque la presencia de uno o dos azúcares aumenta la polaridad de la molécula y permite un funcionamiento adecuado en las plantas aumentando su solubilidad acuosa,

modulando su actividad e incrementando su estabilidad, este aumento en su polaridad resulta insuficiente cuando se piensa en una actividad nutricional o farmacéutica. De hecho, la solubilidad de los glicósidos fenólicos que contienen uno o dos azúcares sigue considerándose muy baja para su funcionalidad fuera de la planta (Brown *et al.* 1998; Meulenbeld *et al.* 1999; Manach *et al.*, 2004).

A partir de estas limitaciones para su aplicación, surge la necesidad del desarrollo de estrategias que permitan la obtención de compuestos fenólicos de alta solubilidad acuosa y sean compatibles con sistemas fisiológicos. Pero considerando que al mismo tiempo dichas estrategias deben contribuir a modular sus propiedades funcionales, generar variabilidad estructural y que resulten sustentables.

En la actualidad se han reportado diferentes métodos para aumentar el grado de glicosilación y en consecuencia la solubilidad de los compuestos fenólicos, entre ellos métodos químicos y enzimáticos (Du *et al.* 2004, Auriol *et al.*, 2009; Mena *et al.*, 2011). La síntesis de glicósidos mediante la química orgánica tradicional ha sido una alternativa ampliamente explorada con aceptables rendimientos (<35%). Sin embargo, presenta inconvenientes principalmente relacionados a complicados controles regio- y estéreo-selectivos necesarios para realizar la adición del residuo glicosilo de interés (Demchemko, 2003). Por su parte, la síntesis de compuestos glicósidos mediante la vía enzimática ha mostrado ser una opción interesante ya que permite reacciones con alta quimio-, regio- y enantio-especificidad. En general los procesos de glicosilación por vía enzimática son procesos simples con tiempos de reacción cortos lo cual puede significar menores gastos de operación. Sin embargo, hasta la fecha existen pocos trabajos en donde se reporte la incorporación de más de dos residuos glicosilo sobre la aglicona fenólica.

Bajo este panorama, en el presente trabajo se planteó como objetivo principal la glicosilación enzimática sobre diferentes aceptores fenólicos en donde se asegure la adición de más de dos unidades de azúcar. Este proceso de incorporación de diversos residuos glucosa sobre moléculasceptoras se denominó poliglucosilación e incluye la formación de productos cuyos residuos glucosilo pueden ser incorporados sobre distintas posiciones de la molécula. Como una primera aproximación se evaluaron diferentes enzimas con la capacidad de transferir múltiples residuos de glucosa, particularmente utilizando enzimas de tipo dextransacarasa y ciclodextrin glicosiltransferasa. Con el fin de entender la influencia de la estructura fenólica sobre la eficiencia de la glicosilación enzimática y por lo tanto de establecer las mejores condiciones de reacción, se consideraron como moléculasceptoras compuestos con diferentes grados de complejidad incluyendo desde dihidroxibencenos hasta flavonoides. Finalmente, una vez seleccionadas las enzimas más eficientes en la glicosilación, se planteó el diseño del medio de reacción que permitiera aumentar la productividad de las reacciones enzimáticas propuestas.

3. ANTECEDENTES

3.1. Glicósidos: generalidades e importancia

Los glicósidos son compuestos químicos constituidos por la unión de uno o varios carbohidratos a una molécula no-carbohidrato, comúnmente llamada aglicona a través de un enlace glicosídico (figura 1).

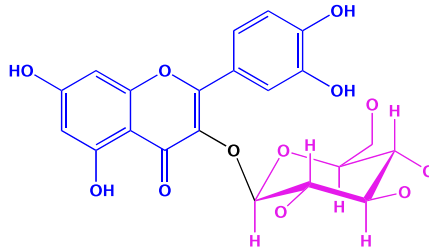


Figura 1. Estructura del glicósido isoquercitrina , aglicona quercetina (azul), enlace glicosídico (negro) y residuo carbohidrato glucosa (rosa).

Los glicósidos son generados por diversos seres vivos que incluyen desde microorganismos hasta especies superiores. La variedad de agliconas, residuo(s) azúcar(es) y sus posibles combinaciones dan lugar a una amplia diversidad entre los glicósidos. En efecto, entre las agliconas podemos encontrar alcaloides, esteroides, triterpenos, aromáticos, etc. Por su parte, entre los glicósidos naturales el residuo más frecuente suele ser una glucosa pero también pueden encontrarse azúcares como fucosa, ramnosa o incluso azúcares modificados con grupos amino o carboxilo. Cabe mencionar que dentro de los glicósidos con más de un residuo de azúcar incorporado puede presentarse variabilidad en el tipo de azúcar y/o la posición sustituida (Dewick, 2002). Entre los glicósidos conformados por diversas azúcares podemos encontrar compuestos como la dioscina que presenta a la aglicona diosgenina sustituida por azúcares de diversa naturaleza sobre diferentes posiciones (figura 2).

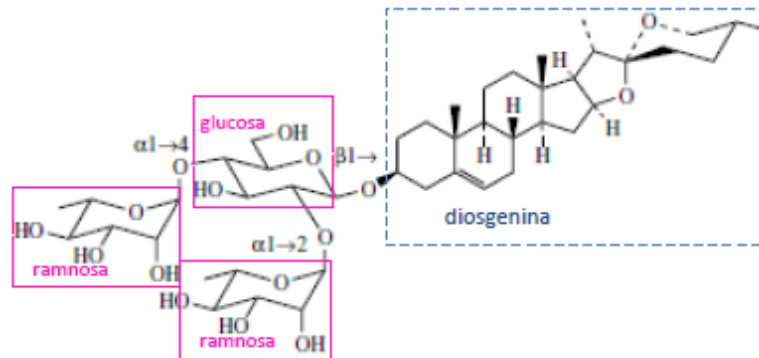


Figura 2. Estructura del poliglicósido esteroideo dioscina, indicando aglicona diosgenina y tipo de residuos glicosilo y enlaces

Los derivados glicósidos de diversas agliconas pueden presentar usos como edulcolorantes, cosméticos, farmacéuticos (antibióticos, antitumorales), antioxidantes, entre otros (Mena, 2012). En múltiples reportes se destaca la relevancia de diversos glicósidos naturales y

sintéticos debido a sus propiedades interesantes en áreas científicas e industriales incluyendo acciones terapéuticas (Dewick, 2002; Dembitsky, 2005; Schmid *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2005; Mishra *et al.* 2003).

Los glicósidos presentan entre sus características principales el poseer agliconas de peso molecular relativamente bajo y formar parte del metabolismo secundario de los diversos organismos que los producen. Esto hace que se diferencien de macromoléculas como las glicoproteínas y los ácidos nucleicos los cuales, aunque también poseen enlaces glicosídicos y cuyas funciones son primordiales dentro del organismo, no se clasifican como glicósidos. La participación de glicósidos como metabolitos secundarios está relacionada a su respuesta ante señales definidas que derivan en la incorporación o escisión específica de residuos azúcar permitiendo cambios en las funciones de la aglicona (Mena, 2012). Diversos glicósidos han sido detectados y extraídos de distintas fuentes naturales, destacando su presencia en plantas. En el reino vegetal desarrollan funciones como protección ante daño físico ya sea por corte o mordedura de herbívoros, factores ambientales como la radiación UV o frente a microorganismos patógenos (Manach *et al.*, 2004; Del Pozo 2011). Pese al gran potencial de aplicación que presentan los glicósidos desde un punto de vista nutricional o farmacéutico aún se presentan limitaciones para el aprovechamiento industrial de sus propiedades y actividades biológicas, principalmente debido al bajo contenido total de glicósidos en las fuentes naturales y a su escasa solubilidad y estabilidad tanto para las agliconas como los compuestos monoglicosilados.

3.2. Efecto de la glicosilación sobre funciones biológicas y propiedades químicas

En general, se sabe que la glicosilación permite en buena parte la modulación de las diferentes propiedades fisicoquímicas y actividades biológicas de sus correspondientes agliconas. Por ejemplo, reportes de Weymouth-Wilson (1997) mostraron que los glicósidos de anguciclinas presentan notables funciones antitumorales mientras su aglicona (anguciclinona) por sí misma no muestra ninguna actividad biológica. Otro caso se presenta para glicósidos de componentes cardiacos, los cuales incrementan su solubilidad acuosa y se ven favorecidos en su unión al tejido cardiaco comparados a la aglicona (Dewick, 2002).

Sin embargo, es prácticamente imposible definir un patrón general de actividades biológicas y propiedades fisicoquímicas de los glicósidos respecto a sus agliconas (Kren, 2008). Los diferentes tipos de residuos, su número y el tipo de enlace determinan en conjunto la modulación sin que para ello exista una regla. Un ejemplo de cambio de propiedades biológicas relacionadas al tipo de enlace glicosídico se reportó para la actividad anti-cáncer de derivados de daunorubicina, en donde aquellos que presentan uniones de tipo β glicosídicos resultan hasta 35 veces menos activos con respecto a los correspondientes derivados α (Zhang *et al.*, 2005). Otro ejemplo se presentó para compuestos glicósidos de fenilpropanoides los cuales en configuración β -glucósido presenta una mejor actividad antioxidante *in vitro* respecto a su anómero α -glucósido (González 2014; González *et al.* 2016).

Probablemente el cambio más evidente que podría esperarse de la unión del residuo azúcar a la aglicona, es la solubilidad del compuesto. De manera general, los glicósidos son más solubles en agua que sus respectivas agliconas. En el caso de glicósidos con actividad farmacológica, los cambios en la solubilidad pueden influenciar sus propiedades farmacocinéticas (Kren y Rezanka, 2008). Asimismo, mediante la adición de diferentes residuos de azúcar (poliglicosilación) se han reportado modificaciones en las características organolépticas de la aglicona, por ejemplo, al reducir el sabor amargo del glicósido flavonoide neohesperidina (Kometani *et al.* 1996). Por su parte, en moléculas de tipo aromático la glicosilación permite una disminución de su volatilidad y aunque disminuyen su reactividad en general, la tendencia es un aumento en su estabilidad (González *et al.* 2016). Reportes de síntesis de poliglucósidos del polifenol epicatequina mostraron incrementos en solubilidad acuosa y resistencia al oscurecimiento por efecto de la luz UV mientras que su actividad antioxidante *in vitro* disminuyó (Aramsangtienchai *et al.*, 2011). Todos estos cambios fueron señalados como mejoras en la estabilidad química del glucósido comparado con la aglicona libre, en el entendido de que la glicosilación de compuestos con más de dos residuos de sacáridos resulta todavía más interesante para expandir las aplicaciones o modificar las propiedades funcionales de las agliconas.

3.3. Compuestos fenólicos glicosilados, generalidades y aprovechamiento

Un grupo interesante de agliconas lo conforman los compuestos fenólicos. Estos compuestos también llamados alcoholes aromáticos presentan como estructura básica uno o más grupos hidroxilos unidos directamente al carbono de un anillo de benceno. A partir de este arreglo se derivan un amplio número de compuestos fenólicos que pueden incluir otros grupos funcionales, múltiples anillos fenólicos u otro tipo de distribuciones (figura 3).

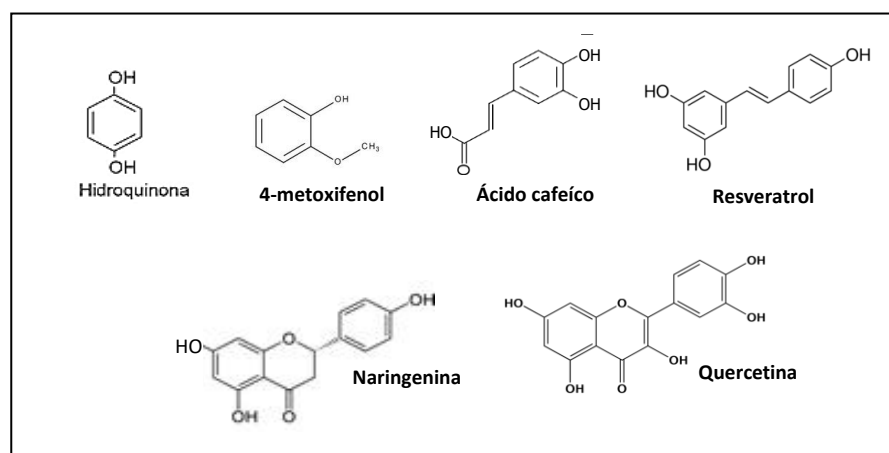


Figura 3. Estructuras de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos han mostrado importantes actividades biológicas como antiinflamatorios, antioxidantes, antibióticos, protectores solares, así como propiedades que permiten su aplicación como agentes tenso-activos, aditivos, entre otros. Es posible encontrar

alcoholes aromáticos en diversas fuentes naturales destacando su distribución en especies vegetales donde existen generalmente como glicósidos (Middlenton *et al.*, 2000; Meulenbeld *et al.* 1999).

Cabe señalar que la mayoría de los glicósidos fenólicos en fuentes naturales se presentan como derivados con uno o dos residuos de sacáridos siendo los más abundantes la glucosa y la rutinosa (ramnosil- α -(1-6)-glucosa) respectivamente. Se ha reportado en pruebas *in vivo* que dicho grado de glicosilación permite una regulación de sus actividades biológicas y ofrece cierta protección a las agliconas después de su ingesta. Sobre todo, a su paso por el tracto gastrointestinal previo a su llegada al intestino delgado donde son biotransformadas y absorbidas al torrente sanguíneo para realizar sus funciones (Manach *et al.*, 2004). Además, en pruebas antioxidantes *in vitro* se ha demostrado cómo influye la glicosilación en moléculas fenólicas con actividad antioxidante (González *et al.* 2016). Como se sabe, los glicósidos naturales presentan características adecuadas para sus organismos productores y los consumidores de estos, sin embargo, el aprovechamiento de estos compuestos hacia formulaciones como suplementos o medicamentos se ha visto limitada hasta ahora, principalmente debido al bajo contenido en fuentes naturales o a la escasa solubilidad y estabilidad química que presentan aun en la forma glicosilada natural (Middlenton *et al.*, 2000).

En este sentido, un uso más extendido de los compuestos fenólicos podría lograrse mediante la síntesis de derivados glicósidos que presenten características como una mayor solubilidad en medios acuosos, incremento en estabilidad química u otras propiedades que permitan ampliar el panorama de uso de estos productos fenólicos en novedosas formulaciones.

3.4. Diversidad estructural de agliconas fenólicas y su naturaleza hidrofóbica


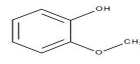
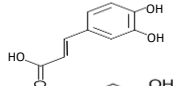
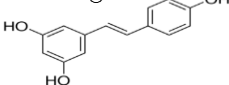
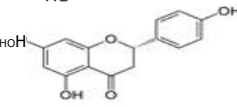
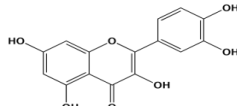
Como se ha mostrado en la figura 3, las estructuras fenólicas pueden ir desde compuestos sencillos hasta derivados como los polifenoles que conjugan diversos grupos funcionales en posiciones específicas. Al respecto, los polifenoles quizá sea el grupo de metabolitos fenólicos que en años recientes ha atraído más la atención por sus múltiples acciones biológicas. Los polifenoles son compuestos de origen plenamente vegetal producidos como metabolitos secundarios para realizar funciones incluidas la señalización molecular, antimicrobianos, atrapadores de especies reactivas de oxígeno (EROs) y protección ante daños mecánicos o ambientales. Debido a sus múltiples propiedades bio-fisicoquímicas, los polifenoles se han aprovechado con distintas finalidades, destacando usos terapéuticos por acciones antioxidantes, anticancerígenas, capacidad de disminuir el estrés oxidante y daños tisulares (Harborne y Williams, 2000; Pietta, 2000, Liu, 2004; Harris *et al.*, 2007).

Los polifenoles pueden presentar sustitución con diversos hidroxilos y tipo de arreglos dando una variedad estructural en base a la cual pueden clasificarse como: ácidos hidroxibenzoicos, ácidos cinámicos, antocianinas, proantocianinas, estilbenos, flavonoides y ligninas (Manach *et*

al. 2004; Cren-Olivé y Rolando, 2003). Algunas estructuras pertenecientes a estas clases de polifenoles se incluyeron en la figura 2, entre ellas el ácido cafeíco (ácido cinámico), resveratrol (estilbeno), quercetina y naringenina (flavonoides).

Es importante mencionar que, de manera generalizada, las agliconas fenólicas son consideradas moléculas de carácter hidrofóbico que tiende a incrementarse a medida que aumenta la complejidad estructural. En tabla 1 se reportan valores de solubilidad acuosa correspondientes a los compuestos fenólicos ejemplificados en la figura 3.

Tabla 1. Solubilidad acuosa de diversos compuestos fenólicos

Aglicona fenólica y estructura	Solubilidad acuosa (g/l)
Hidroquinona 	67.0 ^a
4-metoxi fenol 	40.0 ^a
Ácido cafeíco 	0.65 ^b
Resveratrol 	0.03 ^c
Naringenina 	0.01 ^d
Quercetina 	Insoluble ^a

^acaymanchem.com; ^bsantacruzbiotechnology; ^cAmri, 2012; ^dShulman *et al.*, 2011

Como podemos observar, las estructuras más simples como la hidroquinona, estructura perteneciente a los dihidroxibencenos que en adelante para efectos de este trabajo denominaremos dihidroxifenoles y el 2-metoxifenol muestran valores de solubilidad acuosa de 67 y 40 g/l respectivamente, este parámetro disminuye en dos órdenes de magnitud para el caso del ácido cafeíco que presenta en su estructura el sustituyente ácido propenoíco. La solubilidad sigue disminuyendo para el compuesto biciclo resveratrol y el flavonoide naringenina hasta la quercetina la cual se reporta insoluble en agua.


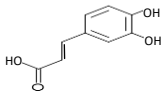
La escasa solubilidad acuosa de los compuestos polifenólicos ha limitado, además de su uso a gran escala, los métodos de síntesis de derivados glicosilados. Por ejemplo, el uso de la vía enzimática para su glicosilación se ha condicionado para la síntesis de sus derivados glicósidos debido a que las reacciones con biocatalizadores se desarrollan preferencialmente en medios acuosos. De hecho, aunque en algunos trabajos se ha reportado la glicosilación de fenoles mediante el uso de cosolventes orgánicos miscibles en agua como una herramienta para

incrementar la solubilidad acuosa de sustratos fenólicos, los rendimientos de reacción o el grado de glicosilación han sido muy limitados (Bertrand *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2011).

3.5. Modulación de la solubilidad acuosa de compuestos fenólicos por efectos de la glicosilación

Múltiples investigaciones se han centrado en el estudio de métodos que permitan la síntesis de fenoles glicosilados con el objetivo de incrementar su solubilidad acuosa y por consiguiente su afinidad hacia ambientes fisiológicos, básicamente acuosos (Moon *et al.*, 2006; Suzuki y Suzuki, 1991; Kometani *et al.*, 1996). La variación de solubilidad acuosa de ciertos compuestos fenólicos de acuerdo al número de residuos glucosa se han recopilado las tablas 2 y 3. Estos reportes de solubilidad de distintas agliconas fenólicas y sus derivados glucosídicos han sido divididas de acuerdo a su complejidad estructural, en la tabla 2 se han englobado aquellos reportes para dihidroxifenoles (estructuras simples), fenilpropanoide y estilbeno (estructuras intermedias) en tanto que la tabla 3 presenta compuestos flavonoides (complejos).

Tabla 2. Solubilidad acuosa de compuestos fenólicos y sus derivados glicosilados

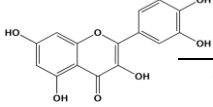
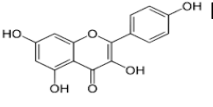
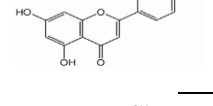
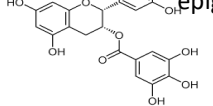
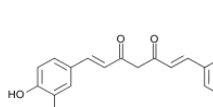
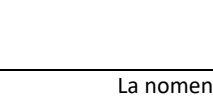
AGLICONA FENÓLICA		GLUCÓSIDO		SOLUBILIDAD ACUOSA		REFERENCIA	
Tipo	Nombre (abreviatura)	# residuo(s) glucosilo	Nomenclatura indicativa	g/l	incremento		
Dihidroxifenol	Hidroquinona (HQ)	0	n.a.	70	1	Mathew y Adlercreutz, 2013	
		1	HQ-glc	128	1.8		
		0	n.a.	64.9	1	Kaminaga <i>et al.</i> 2003	
		1	HQ-glc	106.1	1.6		
Fenilpropanoide	Ácido cafeico (AC)	0	n.a.	0.001	1	Nam <i>et al.</i> 2017	
		1	AC-3-glc	0.007	6.0		
			0	n.a.	0.001	1	Nishimura <i>et al.</i> 1995
			1	AC-3-glc	0.004	3.3	
			1	AC-4-glc	0.154	122.1	
Estilbeno	Resveratrol (RV)	0	n.a.	0.08	1	De Winter <i>et al.</i> 2015	
		1	RV-3-glc	2.95	36.9		
		2	RV-3-(glc)-(glc)]	2.79	35.0		
		3	RV-3-[(glc)-(glc)-(glc)]	3.04	38.1		

La nomenclatura indicativa de posiciones y tipo enlaces formados se muestran en el anexo 1
glc= glucosa; n.a.= no aplica

Como se puede observar en todos los ejemplos de la tabla 2, la incorporación de los residuos glucosilos a los compuestos fenólicos generó incrementos en la solubilidad acuosa respecto a su aglicona. Además, el incremento en este parámetro es mayor para los compuestos de complejidad estructural intermedia (ácido cafeico y resveratrol) que para el compuesto “simple” de hidroquinona. En el reporte de Nishimura *et al.* (1995) fueron obtenidos dos productos monoglucosidos del ácido cafeico mediante α -amilasa y glucosidasas, es interesante señalar que el producto con el residuo en posición 4 alcanzó un importante aumento de

solubilidad apuntando la influencia que tiene la posición de incorporación en este cambio de solubilidad. Por su parte, en el reporte para resveratrol (De Winter *et al.* 2015) se obtuvieron productos glucósidos con hasta tres residuos, de los cuales el mayor incremento de solubilidad fue para el compuesto tri-glucósido con 3.04 g/l (38.1 veces el valor inicial) sin que existan amplias diferencias de este tri-glucósido respecto a los derivados mono- y di-glicósidos. Cabe señalar que un mayor número de residuos azúcar no mostró una relación directa con mayores valores de solubilidad para los derivados de compuestos fenólicos mostrados.

Tabla 3. Solubilidad acuosa de compuestos flavonoide, curcumina y sus derivados glicosilados

AGLICONA FENÓLICA		GLUCÓSIDO		SOLUBILIDAD ACUOSA		REFERENCIA
Estructura	Nombre (abreviatura)	# residuo(s) glucosilo	Nomenclatura indicativa	g/l	incremento	
	Quercetina (Q)	0	n.a.	0.06	1	De Winter <i>et al.</i> 2015
		1	Q-3'-glc	0.32	5.6	
		1	Q-4'-glc	1.84	31.6	
	Quercetina (Q)	0	n.a.	0.06	1	Moon <i>et al.</i> 2007
		1	Q-4'-glc	5.89	98.2	
	Kaempferol (KF)	0	n.a.	0.09	1	Choung <i>et al.</i> 2017
		1	KF-3-glc	0.25	2.9	
		2	KF-3-[(glc)-(glc)]	22.08	257	
	Luteolina (LT)	0	n.a.	0.00006	1	Kaminaga <i>et al.</i> 2003
		1	LT-7-glc	0.01	235	
		2	LT-3',7-di-glc	0.20	3412	
	Galato de epigallocatequina (GEGC)	0	n.a.	2.34	1	Moon <i>et al.</i> 2006
		1	GEGC-7-glc	157.43	67	
		1	GEGC-4'-glc	174.75	75	
		2	GEGC-7,4'-di-glc	456.99	195	
	Curcumina (CC)	0	n.a.	0.000011	1	Kaminaga <i>et al.</i> 2003
		1	CC-4'-glc	0.00371	336.1	
		2	CC-4'-[(glc)-(glc)]	50.5	4.58E+06	
		2	CC-4', 4''-di-glc	256.0	2.32E+07	
		3	CC-4'-[(glc)-(glc)],-4''-glc	384.3	3.48E+07	
4	CC-4',4''-di-[(glc)-(glc)]	660.4	5.98E+07			

La nomenclatura indicativa de posiciones y tipo enlaces formados se muestran en el anexo 1
glc= glucosa; n.a.= no aplica

En la tabla 3, podemos observar que la solubilidad de flavonoides también incrementa sustancialmente por la incorporación de residuos de azúcar sobre dichas agliconas. Los derivados glucósidos de quercetina reportan aumentos de su solubilidad acuosa hasta 98 veces alcanzando valores de 5.89 g/l. Si bien este aumento resulta significativo, es importante mencionar que este valor de solubilidad es pequeño para aplicaciones industriales. Al observar

reportes para kaempferol y luteolina, flavonoles relacionados químicamente con la quercetina, se observa que al incorporar al menos dos residuos de azúcar ocurren incrementos del orden de 257 y 3412 veces respectivamente. Dentro de estos aumentos mencionados no debe perderse de vista que el aumento de la solubilidad del glucósido es relativo al valor inicial de solubilidad de la aglicona. Por su parte, para compuestos como galato de epigallocatequina y curcumina se mostró que el aumento de solubilidad está estrechamente relacionado al número de residuos azúcar. En efecto, incrementos de solubilidad del orden de 195 veces ocurren tras la incorporación de una segunda unidad de azúcar glucosa sobre galato de epigallocatequina que alcanza solubilidad de 456.9g/l. Por su parte, los glucósidos del polifenol curcumina con dos residuos aumentaron en 6 y 7 órdenes de magnitud respecto a su aglicona alcanzando hasta 356 g/l de solubilidad acuosa, mientras que en forma monosacárido el incremento no supera los 0.003 g/l equivalentes a un aumento de 336 veces.

Partiendo de estas observaciones, es importante resaltar que la incorporación de al menos dos residuos glucosa sobre las agliconas polifenólicas permite un aumento en la solubilidad de las agliconas en dos órdenes de magnitud en algunos casos y es más significativo el aumento para moléculas fenólicas de mayor complejidad estructural como fenilpropanoide y flavonoides; no se debe perder de vista que estas modificaciones también tienen efecto modulador de sobre otras propiedades de las agliconas y que las veces que mejora la solubilidad es relativo al valor inicial de solubilidad de la aglicona. Como se puede observar en las tablas 2 y 3, es claro el aumento de solubilidad acuosa de moléculas fenólicas al incrementar el grado de glucosilación, aunque no existe un patrón absoluto del número de residuos glucosilos relacionada con el aumento de solubilidad acuosa.

3.6. Síntesis química de glicósidos

La glicosilación química es una metodología antigua y muy estudiada sin embargo a la fecha representa un reto por la complejidad que conlleva lograr reacciones regioselectivas y estereoselectivas que permitan la obtención de productos con las características requeridas.

Los primeros informes de glicosilación química inician en 1879 con la reacción de Michael para sintetizar O-glicósidos por desplazamiento nucleofílico del grupo saliente en el carbono anomérico del azúcar, debiendo proteger al resto de los grupos hidroxilos de los sustratos y productos, lo cual representa una seria desventaja por el gran número de pasos y en consecuencia el mayor costo en el proceso y por la obtención de mezclas de anómeros α y β de los compuestos glicosilados. Otro inconveniente se presenta al requerirse convertir el aceptor glicosilo (nucleófilo) en su respectiva sal de potasio (Mydock y Demchenko, 2010; Michel, 1879). Más adelante en 1901, Koenigs-Knorr (y de manera independiente Fischer y Armstrong) desarrollaron una metodología de glicosilación química mediante la reacción de glicosil-halogenuros con alcoholes convencionales como aceptores en presencia de sales de metales pesados, como Ag_2O_3 o Ag_2O , las cuales asisten en la liberación de del grupo saliente, según se demostró en 1930. Este método resulta más selectivo en el sentido de que se obtiene una inversión de la configuración anomérica (Mena, 2012; Mydock y Demchenko, 2010).

Entre las metodologías más importantes para la síntesis de glicósidos encontramos las de Koenigs-Knorr, Smits, Fischer, tricloroacetamido y 1-O-alkilación (figura 4).

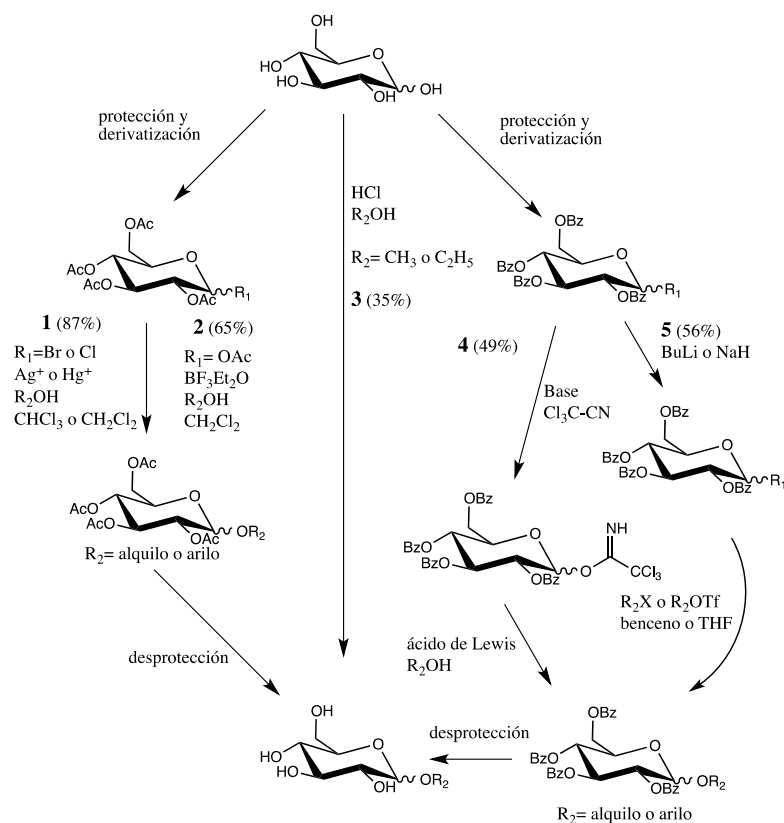


Figura 4. Principales métodos de síntesis química de glicósidos. **1:** método de Koenigs-Knorr, **2:** método Smits, **3:** método Fischer, **4:** método tricloroacetamido, **5:** 1-O-alkilación. Ac: acetilo y Bz: bencilo (imagen tomada de deRoode B., 2001).

De manera particular, en el método de síntesis desarrollado por Fischer en 1893 se identificó al monosacárido desprotegido como un hemiacetal que mediante un proceso relativamente sencillo en fuertes condiciones ácidas y exceso de la aglicona deseada obtiene productos glicósidos. Conceptualmente esta es la forma más simple de obtener glicósidos y uno de los métodos de síntesis empleados; sin embargo, este procedimiento presenta entre sus inconvenientes bajos rendimientos (35%) debido al equilibrio de especies que se convierten entre sí y un limitado número de alcoholes reactivos casi exclusiva para alcoholes de bajo peso. Algunas metodologías como las de Smits, tricloroacetamido y 1-O-alkilación han logrado mejorar los rendimientos sin disminuir la complejidad de etapas de protección para grupos reactivos no proyectados (González, 2014; Mydock y Demchenko, 2010; Michael, 1879).

Desde los trabajos pioneros en la síntesis de O-glicósidos es posible distinguir algunas características mecanísticas indispensables en la formación del enlace glicosídico: un grupo saliente adyacente al carbono anomérico del donador de glucosilo es desplazado por acción de un grupo OH del nucleófilo del aceptor de glicosilo. La reacción generalmente se realiza en presencia de un activador denominado “promotor” cuyo papel es asistir la salida del grupo saliente. Como se ha mostrado la síntesis de glicósidos mediante la química orgánica tradicional presenta complicaciones especialmente las relacionadas al uso de etapas de protección-desprotección para aquellos hidroxilos no previstos para reaccionar, así como el reto de mantener la orientación requerida ya sea como isómeros α o β para obtener productos deseados. En este sentido, una gran parte de las modificaciones que han sufrido metodologías como la de Koenigs-Knorr se han dirigido al desarrollo de nuevos promotores y nuevos grupos salientes adecuados para inducir o mantener la estereoselectividad. Asimismo, se han considerado aspectos para mejorar las metodologías como son el efecto del disolvente, el patrón de grupos protectores tanto en el donador y aceptor de glicosilo, el impedimento estérico, etc (Mydock y Demchenko, 2010; Mena, 2012).

A pesar del gran progreso en técnicas de síntesis química de glicósidos la necesidad del control regio y estereoselectivo del enlace glicosídico hace que en la mayoría de los métodos químicos se recurra necesariamente a múltiples esquemas de protección y desprotección. Estos esquemas se complicarían aún más ante la eventualidad de usar alguna de las metodologías de síntesis química para adicionar múltiples residuos glicosilo.

Así mismo el uso de metales pesados como promotores no es aceptable para productos con uso potencial en el área farmacéutica y alimenticia debido a su toxicidad (Thimm y Thiem, 2008). Estos hechos motivan la constante búsqueda de métodos alternativos para la síntesis de este tipo de compuestos (Shaikh y Withers, 2008).

3.7. Síntesis enzimática de glicósidos

La síntesis de compuestos glicósidos mediante la vía enzimática ha mostrado ser una opción interesante. Las enzimas catalizan reacciones con alta quimio, regio y enantioespecificidad por lo cual mediante su uso se evitan los pasos de protección-desprotección de grupos reactivos, no requiere de transformar el aceptor glicosilo en sales, ni emplean un promotor del grupo saliente (compuestos generalmente tóxicos), tampoco el uso de ácidos fuertes necesarios durante la síntesis química de Fischer. En conjunto, al evitar el empleo de estos reactivos tóxicos se logra menor impacto al ambiente y se reduce gasto de tratamiento de desechos. Cabe mencionar que la mayoría de las reacciones con enzimas utilizan un medio de reacción habitualmente acuoso y condiciones suaves de temperatura y pH. En general los procesos de glicosilación por vía enzimática son procesos simples con tiempos de reacción cortos lo cual puede significar menores gastos de operación. Además, en algunos casos el biocatalizador presenta la posibilidad de su recuperación y reutilización. Por estas ventajas la vía enzimática puede brindar metodologías sustentables para obtener moléculas como los glicósidos (Kaminaga, *et al.*, 2003; Wang, *et al.*, 2010; Mackenzie *et al.*, 1998).

Las enzimas empleadas para glicosilación comprenden diversos tipos. Entre ellas encontramos a las glicosidasas (E.C. 2.4.X.X) y las glicosiltransferasas (E.C. 2.4.1.X). Por una parte, las glicosidasas son de naturaleza hidrolítica, pero bajo ciertas condiciones de reacción pueden realizar la síntesis de glicósidos de diversos compuestos (Daines *et al.*, 2004). Mientras que las glicosiltransferasas son enzimas que se caracterizan por realizar la transferencia de residuos glicosilo hacia diversos aceptores, en este grupo se encuentran las enzimas que de manera natural (*in vivo*) sintetizan glicósidos.

3.7.1. Glicosidasas

Las glicosidasas también conocidas como glicosil-hidrolasas (GHs) están ampliamente distribuidas en la naturaleza y participan en la hidrólisis de enlaces glicosídicos de oligo- y polisacáridos, así como de diferentes glicósidos. Las glicosidasas son enzimas abundantes y accesibles que usan sustratos de bajo costo. Además, muestran ser estables a la presencia de algunos disolventes miscibles con agua, así como a temperatura y pH relativamente extremos (van Rantwijk *et al.*, 1999; Daines *et al.*, 2004). Estas enzimas presentan un alto grado de estereoespecificidad en el centro anomérico del donador glicosilo y una menor quimioespecificidad por los grupos de aceptores de residuo glicosilo, razón por la cual pueden ser aprovechadas para realizar la transferencia sobre moléculas de distinta naturaleza química (Plou *et al.* 2007; van Rantwijk *et al.*, 1999).

Debido a que la actividad hidrolítica predomina en las glicosidasas, estas enzimas suelen mostrar bajos rendimientos en reacciones de síntesis. Es por ello que para inducir o favorecer las reacciones de glicosilación con estas enzimas son necesarias condiciones particulares que favorezcan la transferencia del grupo azúcar hacia un aceptor deseado y en consecuencia la disminuyan hacia el agua (Daines *et al.*, 2004). El interés de usar a las GHs en síntesis de diversos compuestos, incluidos los glicósidos, ha llevado a estudiar los mecanismos de hidrólisis de estas enzimas para establecer que tipo control se pueden emplear para favorecer la síntesis (expresado como condiciones de reacción).

Existen dos principales mecanismos hidrolíticos presentes en las glicosidasas: en uno ocurre **inversión** de la configuración del carbono anomérico; mientras el otro deriva en la **retención** de esta configuración (Plou *et al.*, 2007). Ambos mecanismos se muestran en la figura 5 y se describen a continuación. El mecanismo de las GH que (a) invierten la configuración ocurre cuando el residuo catalítico ácido cede un protón al grupo saliente del donador, mientras que la base catalítica sustrae un protón de una molécula de agua con lo cual incrementa la nucleofilia y facilita el ataque al carbono anomérico, el efecto final es la inversión de la configuración anomérica del carbono (Vuong y Wilson, 2010). Por otro lado, (b) en las GH que retienen dicha configuración, se lleva a cabo un mecanismo de doble inversión en el que un residuo ácido/base general actúa en dos pasos. En un primer paso actúa como ácido que cede un protón al grupo saliente y facilita su salida, mientras otro residuo nucleófilo forma un intermediario covalente aunado a la enzima. En un segundo paso, el residuo desprotonado ácido/base actúa como una base general que activa a la molécula de agua que lleva a cabo el

ataque nucleofílico sobre el intermediario glicosil-enzima. El resultado son dos inversiones de la configuración que, en resumen, son responsables de la retención de la esteoquímica en el centro anomérico (Vuong y Wilson, 2010).

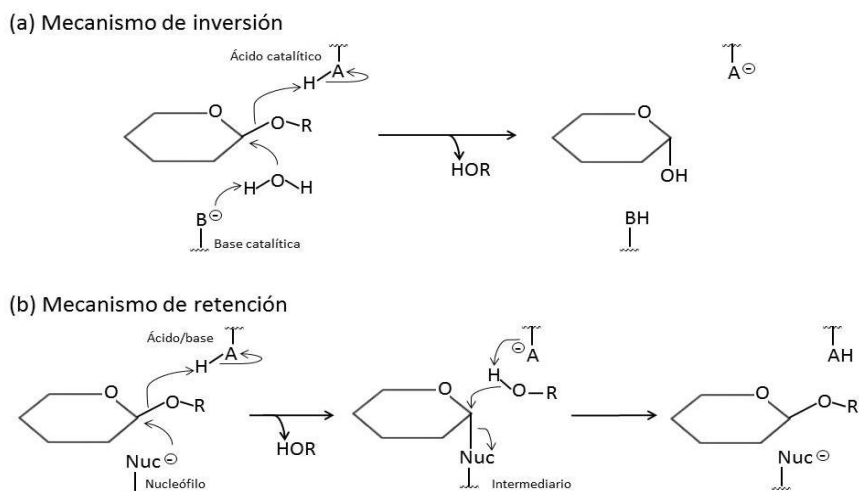


Figura 5. Mecanismos de hidrólisis de enzimas glicosidasas: (a) inversión de la configuración y (b) retención de la configuración del carbono anomérico del residuo glicosilo (imagen modificada de Vuong y Wilson, 2010).

Bajo las condiciones propicias y a partir de los mecanismos expuestos, las glicosidasas pueden catalizar reacciones de glicosilación con distintos aceptores mediante alguna de sus dos vías: transglicosilación o hidrólisis inversa (también llamada glicosilación directa). Estas dos vías se muestran en la Figura 6.

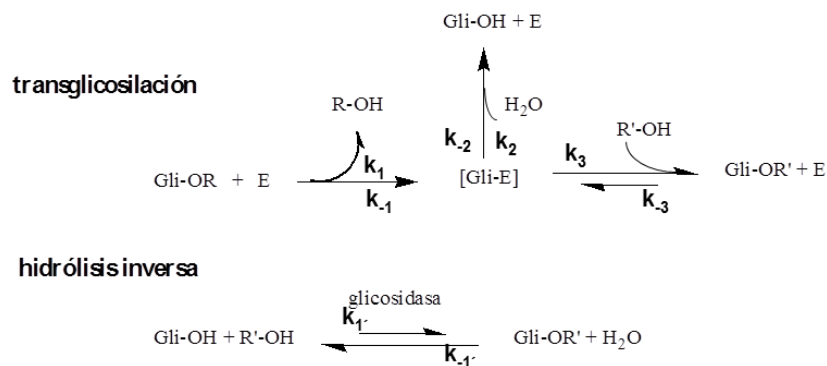


Figura 6. Vías de glicosilación de glicosidasas. Gli-OH y Gli-OR=donador de glicosilo, E=enzima, R'-OH=aglicona, Gli-E= intermediario enzima-glicosilo, Gli-OR'=glicósido (imagen modificada de deRoode *et al.*, 2003)

La transglicosilación la realizan enzimas que presentan retención de configuración, este proceso está relacionado con un control cinético del proceso. En esta vía se presenta la distribución del intermediario *enzima-glicosilo* entre dos posibles aceptores del residuo

glicosilo ya sea hacia el agua o un aceptor distinto (Figura 5b). Esta distribución del intermediario está determinada por la relación entre sus respectivas velocidades k_2 y k_3 . La reacción que predomine será aquella que en un momento puntual del proceso tenga mayor velocidad. Para que ocurra la síntesis depende tanto de la concentración del aceptor como de la afinidad para unir al aceptor deseado y excluir al agua, esto último es una propiedad intrínseca de la enzima. Además, el producto de transferencia puede servir como sustrato para la enzima e hidrolizarlo con una constante de velocidad k_{-3} , en este punto la reacción debe detenerse antes de que se favorezca el consumo del producto glicosido. Así mismo, cabe aclarar que las GHs que presentan la vía de transglicosilación son las más usadas en síntesis debido a que en esta estrategia de síntesis con control cinético se establece una competencia continua entre las velocidades de síntesis e hidrólisis, en la mayoría de los casos los rendimientos no rebasan el 40% (Mena, 2012; Plou *et al.*, 2007; Shaikh y Withers, 2008).

Por otro lado, con enzimas glicosidasas también puede ocurrir la condensación directa de las unidades de azúcar y el aceptor, hidrólisis inversa (figura 5a). Esta vía de síntesis emplea el control termodinámico que usa condiciones donde se disminuye la actividad del agua (a_w) desplazando el equilibrio en el sentido de la síntesis. La forma más común para lograr disminuir la a_w es mediante el incremento en la concentración de los sustratos o la presencia de solventes miscibles con el agua que no comprometan la estabilidad de la enzima (Franssen *M. et al.*, 2005). Si bien en estos sistemas es deseable una baja actividad de agua para favorecer el rendimiento del producto al equilibrio, usualmente se requiere mantener una cantidad suficiente de agua para evitar la inactivación de glicosidasas y favorecer la solubilidad del donador de glicosilo. Asimismo, aunque este sistema es atractivo por su simplicidad, resulta poco eficiente debido a la incompatibilidad de una gran parte de los donadores de glicosilo y las glicosidasas con la baja actividad de agua en medio orgánico. Por estos motivos con frecuencia los rendimientos obtenidos en las reacciones de hidrólisis inversa no rebasan el 20% (Mena, 2012; Plou *et al.*, 2007).

Como se ha mencionado, las glicosidasas presentan bajos rendimientos debido a la preferencia o facilidad para catalizar la reacción hidrolítica y la menor preferencia de la enzima hacia los sustratos aceptores diferentes al agua. Al respecto, de Roode *et al.* (2000) realizaron un estudio de cálculos cuánticos para determinar la baja reactividad de ciertas β -glicosidasas por distintos aceptores mostrando en orden de preferencia: alcohol primario > alcohol secundario > hidroxilos fenólicos. Como podemos observar los fenoles son poco reactivos con estas enzimas y a su vez escasos los reportes de su glicosilación. Algunos de estos reportes refieren a la síntesis de glucósidos de hidroquinona usando α -glucosidasa de levadura y maltosa como donador (por transglicosilación) alcanzando un rendimiento de 4.6% respecto al aceptor, equivalente a apenas 2.3 mM de glúcosido (Prodanovic *et al.*, 2005). Otro ejemplo es la glicosilación de guayacol y curcumina usando amiloglucosidasa de *Rhizopus sp.* en presencia de disolvente orgánico alcanzando 52% de rendimiento respecto a glucosa, equivalente a 2.86

mM de glúcidos (Vijayakumar y Divakar, 2005). Claramente, la productividad de estas enzimas en la síntesis de glicósidos de fenoles es muy baja (van Ranwtwijk, 1999).

3.7.2. Glicosiltransferasas

Las glicosiltransferasas (GTs) son enzimas capaces de transferir selectivamente una unidad de azúcar hacia una amplia variedad de moléculasceptoras (Mena *et al.*, 2011; Aramsangtienchai *et al.*, 2011). Entre este grupo de las glicosiltransferasas se encuentran las enzimas encargadas de realizar la síntesis *in vivo* de la mayoría de los glicósidos, glicoconjugados en la superficie celular y de polisacáridos en la pared de bacterias y hongos (Weijers *et al.*, 2008). Los donadores glicosilo usados por estas enzimas son de distinta naturaleza desde monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos, glicosilfosfatos, glicosildifosfonucleósido, etc. A partir del tipo de donador que emplean las GT se pueden diferenciar los dos tipos de GTs: tipo Leloir y tipo no-Leloir (Weijers *et al.*, 2008).

Las enzimas glicosiltransferasas tipo Leloir (GT-L) utilizan como donadores glicosilo azúcares activados, por ejemplo, nucleótidos uridina 5´-(α -D-glicosildifosfato) (UDP) y que pueden referirse a distintos residuos glicosilo formando donadores como UDP-glucosa, UDP-galactosa, UDP-xilosa, entre otros. Estas enzimas son las encargadas en la naturaleza de realizar la síntesis de glicósidos por lo cual resultan ser muy específicas para sus sustratos donadores y aceptores, con porcentajes de conversión muy altos sin embargo trabajan a concentraciones del orden de micromolar. Así, entre las limitaciones para el empleo de estas enzimas para síntesis a gran escala es el uso de sustratos de alto costo como los azúcares nucleotídicos y cofactores que generalmente requieren (Lairson *et al.*, 2008). Adicionalmente, este tipo de enzimas presentan baja disponibilidad y estabilidad (Daines *et al.*, 2004).

En contraparte, las GTs de tipo no-Leloir (GT-NL) aprovechan la energía contenida en el enlace glicosídico del donador para generar la transferencia de la unidad glicosídica. Entre las enzimas GT-NL podemos encontrar las fosforilasas, ciclodextrin glicosiltransferasas, glicansacarasas, entre otras (Weijers *et al.*, 2008).

Las fosforilasas pueden catalizar la transferencia de residuos glicosilfosfato hacia diversas moléculas, mostrando un amplio espectro de reconocimiento hacia moléculas aceptores (Weijers *et al.*, 2008; Aers, *et al.* 2011), resultando interesantes como enzimas glicosilantes. Por otro lado, su selectividad por el donador glicosilo es muy alta; de hecho, las enzimas fosforilasas realizan como acción característica la fosforilación de sacáridos específicos (glicógeno, maltosa, sacarosa, celobiosa, etc.) generando derivados glicosilfosfato. Este producto posteriormente puede, en presencia de los aceptores adecuados, funcionar como sustratos glicosilo en la actividad glicosiltransferasa y revertir la fosforilación (Renirie *et al.* 2010; Goedl *et al.* 2008). Esta capacidad de glicosilación depende de las propiedades estructurales y mecánicas del tipo de fosforilasa. Por un lado, aquellas que invierten la configuración anomérica se han clasificado en un grupo principal que pertenecen a la familia de las glicósido-hidrolasas y otro grupo pequeño grupo pertenecientes a las

glicosiltransferasas. Otra vía de las fosforilasas es la que se presenta en la sacarosa fosforilasa, la cual lleva a cabo un mecanismo de doble inversión (retención de configuración) y en ausencia de fosfato como aceptor, puede realizar la transferencia del residuo glucosa hacia otros aceptores (Goedl *et al.* 2008).

Entre las GT-NL se destaca también el uso de la ciclodextrin glicosiltransferasa también llamada ciclomaltodextrin glucanotransferasa (CGT) para la transglicosilación de aceptores de distinta naturaleza (Malsagov *et al.*, 2007; Svensson *et al.* 2009; Mathew y Adlercreutz, 2013). Esta enzima usa como sustratos glicosilo almidón o ciclodextrinas (CD) ambos conformados por unidades glucosa con uniones α -1-4 (amilosa). Las CDs son azúcares de estructura cíclica que pueden sintetizarse a partir de oligosacáridos escindidos del almidón para formar compuestos de 6, 7 u 8 unidades de glucosa, denominándose respectivamente α -, β - o δ -ciclodextrinas. Las CDs presentan características anfipáticas y la particularidad de formar complejos de inclusión con moléculas diversas por lo que han sido aprovechadas en distintos ámbitos. Además, el empleo de CD como sustrato glicosilo representa un donador con disponibilidad a bajo costo (Otero y Ballesteros, 1991; Szejtli, 1990).

La CGT es considerada una glicosidasa por similitudes en sus estructuras primarias y terciarias (hasta 60% de su secuencia de aminoácidos) con la familia de amilasas pero clasificada entre las glicosiltransferasas (E.C. 2.4.1.19) por compartir actividades de glicosilación hacia distintos aceptores. Las CGTs presentan cuatro actividades definidas (Jamuna *et al.*, 1993; Nakamura *et al.*, 1993) las cuales se describen a continuación (Miranda, 2010) y se muestran en la figura 7:

- Ciclación: transferencia intramolecular de un extremo reductor (donador) de cadenas de amilosa a un extremo no reductor de la misma cadena (aceptor) formándose un compuesto cíclico (ciclodextrina).
- Acoplamiento: reacción en la que una molécula de ciclodextrina (donador) se transfiere hacia aceptores diversos.
- Desproporciónación: transferencia intermolecular entre dos cadenas de oligosacáridos lineales, una de ellas actúa como donador y la otra como aceptor para producir cadenas distintas de los oligosacáridos originales.
- Hidrólisis: transferencia del extremo reductor del azúcar al agua que funciona como aceptor.

Con base en su actividad de acoplamiento, la CGT puede sintetizar productos glucósidos que presenten múltiples residuos de glucosa transferidos desde el donador glucosilo. Asimismo, los productos de acoplamiento pueden ser utilizados nuevamente por la enzima como sustratos de otras acciones como la desproporciónación o hidrólisis. En el caso que ocurra desproporciónación podría generarse el movimiento de distintas unidades oligoglicosil desde el glucósido hacia otra cadena glicosilo derivando en la reducción de cadena del glucósido, o

de manera inversa ocurrir la adición desde otros donadores con los cuales se alargaría la cadena del glucósido inicial. La síntesis de productos derivados de las actividades de acoplamiento y/o desproporción ha sido reportada para diversos aceptores de tipo sacárido como la sacarosa, la fructosa, la glucosa, la xilosa y la 6-desoxi-glucosa (Monthieu *et al.* 2003; Shibuya *et al.*, 2004; Kitahata, 2000) así como para agliconas de tipo inositoles y resveratrol señalando la formación de derivados o glicósidos que pueden contener cadenas oligoglicosil compuestas principalmente de 1-5 unidades de glucosa (Miranda, 2010; Torres *et al.* 2011).

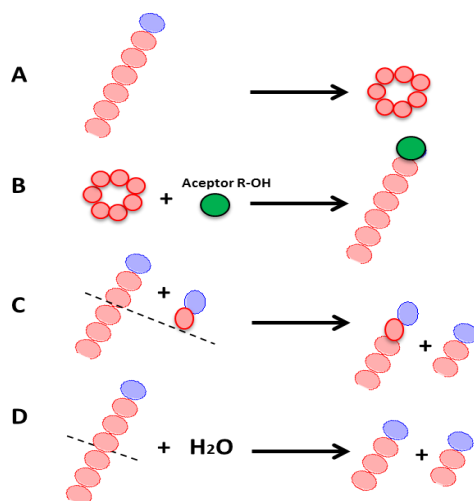


Figura 7. Actividades de ciclodextrin glicosiltransferasa (CGT). A: ciclización, B: acoplamiento, C: desproporción, D: hidrólisis

Al respecto de la multifuncionalidad de la CGT se ha señalado que para las Glicosil hidrolasas, incluida la CGT, el número y tipo de dominios que acompañan al dominio catalítico son importantes para la especificidad de reacciones desarrolladas por cada enzima (Leemhuis *et al.*, 2013). La CGT comparte en la región N-terminal alrededor de 30% de secuencias con el grupo de las α -amilasas (aproximadamente 400 residuos de aminoácidos) generando una clara similitud en sus estructuras tridimensionales al formar la estructura tonel (β/α)₈ que comprende los dominios A, B y C (Lawson *et al.* 1994). Debido a similitudes estructurales entre CGT y α -amilasa se consideran en la misma familia 13 de las GHs. Sin embargo, en contraste con las α -amilasas, las CGT poseen dos dominios C-terminal adicionales: dominios D y E que se pliegan constituyendo cadenas β . El dominio E es determinante para unión de sustrato como se explicará más adelante. El dominio A es de topología TIM (β/α)₈, en él se encuentra la tríada catalítica. El dominio B, es un extenso lazo con estructura secundaria pequeña que interrumpe el dominio A entre la tercera cadena β y la tercera hélice α . El dominio C está formado por 4 cadenas β y se dispone tras la finalización del tonel (β/α)₈. El dominio D es una gran cadena β y dominio E está compuesto por dos cadenas β . En cuanto a las funciones de cada dominio, A y B contienen el centro activo con la tríada catalítica, el eje de ciclización y residuos que contribuyen a la unión del sustrato al sitio catalítico. Las funciones de C y D no están definidas

con certeza. Por último, el dominio E está involucrado en la unión del almidón a la CGT. Para ser exactos, se han descrito en este dominio dos sitios de unión a maltosa. El primero de ellos se encarga de unir el almidón y el otro de guiar y orientar la cadena de almidón hacia el centro activo (Galeote, 1999). La triada catalítica del sitio activo, se encuentra tanto en CGT como α -amilasas, por lo cual la diferencia del comportamiento se debe a otras circunstancias. Concretamente, el aminoácido aromático Phe196 está presente en la zona central del sitio activo de forma que funciona como un eje de ciclización. Este eje modula la actividad de CGT porque interacciona con sustratos cíclicos para reacción de transferencia y con sustratos lineales que van a ser convertidos en productos cíclicos (Nakamura *et al.*, 1994b).

La vía de transglicosilación de las CGT opera mediante un mecanismo de ping-pong bi bi, el cual establece que la transglicosilación ocurre después de que el extremo reductor de la amilosa (donador) ha sido liberado de la enzima (Nakamura *et al.*, 1994a; Nakamura *et al.*, 1994b). Como se ha mencionado, las CGT catalizan de forma reversible transglicosilaciones α -(1-4) inter- e intramoleculares, por lo cual es importante considerar el control cinético mediante el uso de altas concentraciones de sustrato aceptor y regulación en los tiempos de reacción. En este sentido, cuando se habla de la síntesis de glicósidos mediante CGT resulta interesante mencionar ciertas características de estas enzimas incluida la estabilidad ante disolventes orgánicos y a temperaturas relativamente altas (Kelly *et al.*, 2009; Torres *et al.*, 2011). Con base en estas características las CGT son candidatas viables para ser utilizadas en condiciones de reacción de bajo contenido de agua en donde se favorezca la actividad de síntesis e incluso puedan incrementarse concentraciones de aceptores en caso de ser hidrofóbicos.

Un tercer grupo lo conforman las denominadas glicansacarasas (Gli-S), enzimas que de manera natural usan sacarosa como donador para formar oligosacáridos y polisacáridos (Weijers *et al.* 2008; Seibel *et al.* 2006). La energía de enlace del disacárido sacarosa es 5.5kJ/mol, suficiente para realizar la formación de nuevos enlaces glicosídicos por lo que resulta un sustrato conveniente además de ser ampliamente disponible y barato. Por otra parte, las Gli-S pueden subdividirse en fructosil- o glucosil-transferasas (también denominadas fructosil- o glucosil-sacarasas) dependiendo si el azúcar transferido es fructosa o glucosa. Ejemplos de fructosiltransferasas (FTF) son las levansacarasas que forman uniones de fructosa de tipo β -(2-6) con ramificaciones β -(2-1) e inulosacarasas con uniones β -(2-1) y ramificaciones β -(2-6). En el caso de las glucosiltransferasas (GTF), estas pueden formar diferentes uniones de glucosa con enlaces α -(1-4): amilosacarasas, o con enlaces α -(1-6) y ramificaciones tipo α -(1-2) y α -(1-3): dextransacarasas (Wagner y Pesnot, 2010). Las Gli-S presentan actividades diversas (figura 8) según transfieran alguna de las unidades monosacárida (glucosa o fructosa) hacia: molécula de agua (hidrólisis de sacarosa), elongación sobre alguna de las unidades previas (polimerización) o transferencia a un aceptor (van Hijum *et al.* 2003; Olivares-Illana *et al.*, 2003).

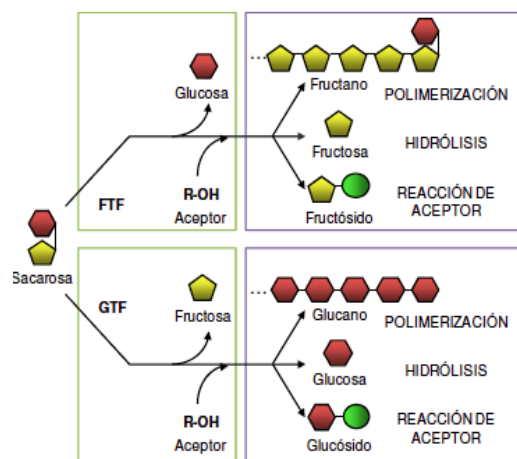


Figura 8. Esquema de las reacciones catalizadas por Glicansacarosas

Es importante señalar que buena parte del potencial tecnológico de las Gli-S radica en el aprovechamiento de su capacidad para llevar a cabo reacciones de aceptador a un amplio espectro de compuestos. El empleo de estas enzimas Gli-S en estrategias de síntesis ha ido reportado para la obtención glicósidos de distintas moléculas como hidroquinona (Seo *et al.*, 2005), polifenoles (Auriol *et al.*, 2009) o α -butil y α -octil-D-glucopiranosidos (Richard *et al.*, 2003).

Las Gli-S poseen un mecanismo de reacción equivalente a las GH (hidrolasas) que mediante transglicosilación forman un intermediario de reacción donde retiene la configuración de carbono anomérico (figura 5a). De hecho, en el sistema de clasificación propuesto por Henrissat, las glicansacarosas son ubicadas en la familia 70 de las glicosil hidrolasas (GH70), clasificación que se basa en el análisis comparativo de la secuencia de aminoácidos y el mecanismo de reacción de más de 2500 enzimas (Plou *et al.*, 2007). Precisamente es la importante actividad hidrolasa de estas enzimas lo que hace buena parte de la diferencia catalítica entre las enzimas Gli-S con respecto a las fosforilasas y las enzimas GT-Leloir. De hecho, la actividad de transferencia hacia aceptador se encuentra muy comprometida con la actividad de hidrólisis en medio acuoso. Ante esta situación de actividad hidrolítica, es relevante mencionar que enzimas pertenecientes a Gli-S han mostrado características de estabilidad ante altas concentraciones de sustratos ya sea donador sacarosa o aceptores tipo fenólicos (Mena, 2012) o ante la presencia de solventes orgánicos como 2-metil, 2-propanol (2M2P) (Castillo y López-Munguía, 2004), DMSO o bis(2-metoxiétil) éter (MEE) (Bertrand *et al.*, 2006; Auriol *et al.*, 2009) gracias a las cuales diversas enzimas pueden ser aprovechadas para mejorar los rendimientos de síntesis.

Como hemos mencionado, entre las enzimas glicosiltransferasas que cuentan con la capacidad de transferir múltiples residuos de azúcares encontramos las Gli-S y CGT. Gracias a sus actividades y características, en el caso de las enzimas Gli-S podrían polimerizar diversos aceptores fenólicos con residuos glicosilos desde sacarosa, mientras CGT puede transferir

cadena de múltiples unidades glucosilo sobre compuestos de interés, diversos reportes de aplicaciones de estas enzimas se muestran a continuación.

3.8. Aplicaciones específicas de Gli-S y CGT para la poliglicosilación de fenoles

La glicosilación enzimática de compuestos fenólicos ha generado un amplio número de reportes donde se destacan el uso de glicosiltransferasas (Meulenbeld y Hartmans, 2000; Moon *et al.*, 2006). En la mayoría de estos reportes se menciona la obtención de productos con un residuo glucosilo. Por el contrario, en el presente trabajo se ha planteado como objetivo la glicosilación de aceptores fenólicos con al menos dos unidades de azúcar incorporadas en cualquiera de sus diferentes posiciones, mediante el empleo de enzimas glicosiltransferasa: específicamente Gli-S y CGT. Estos posibles productos son englobados con el nombre de poliglicósidos. Como se ha expuesto, ambas enzimas presentan características para generar glicósidos con diversas unidades de azúcar. Además, los respectivos sustrato glucosilo usados por estas enzimas son baratos y ampliamente disponibles. Estas enzimas han mostrado resistencia a altas concentraciones de aceptor fenólico y estabilidad ante ciertas condiciones de cosolvente orgánico. Por otro lado, las desventajas de estas enzimas incluyen actividad hidrolítica y la baja preferencia hacia los fenoles.

A continuación, se presentan reportes para cada grupo de biocatalizadores, Gli-S y CGT, donde se muestran ensayos representativos de glicosilación que pueden contribuir a la poliglicosilación, señalando características de los productos y rendimientos.

3.8.1. Glicansacarasa

Algunos de los trabajos interesantes de glicosilación fenólica mediante biocatalizadores glicansacarasa se muestran a continuación en la tabla 4.

Tabla 4. Reportes de glicosilación de fenoles utilizando glicansacarasa

Enzima	Origen	Sustrato aceptor	%Rendimiento ^a (mM producto)	Tipo de glucosilo transferido	Referencia
Levansacarasa	<i>B.subtilis</i>	Hidroquinona	7 (35)	mono-fru	Mena <i>et al.</i> , 2011
Glucansacarasa A	<i>L. reuteri</i> GTFA-ΔN	Catecol	NR	mono-, di-, tri-, -tetra, -penta-glc	Te Poele <i>et al.</i> 2016
Glucansacarasa	<i>L. mesenteroides</i> : NRRL B512 ó	Miricetina, Luteolina y	Hasta 49 (4.4) Hasta 8 (0.7)	mono-glc	Bertrand <i>et al.</i> , 2006
Alternansacarasa	NRRL B-23192	Quercetina		mono, di, tri-glc	
Glucansacarasa	<i>L. mesenteroides</i> B-1299CB	Galato de epicatequina	NR	mono-glc mono-glc (x2)	Moon <i>et al.</i> , 2006
Glucosiltransferasa	Mezcla de 4 GTFs recombinantes de <i>S.sobrunnues</i> y <i>S. mutans</i>	Catequina	90 (9)	mono-glc, di-glc	Meulenbeld <i>et al.</i> , 1999

NR= no reportado, ^a Rendimiento respecto a la concentración inicial de aceptor, glc= glucosilo, fru=fructosilo

En el reporte de [Mena et al. \(2011\)](#) se destaca la obtención de 35 mM de producto monofructosilado para hidroquinona. La glicosilación usando aceptores fenólicos estructuralmente sencillos permitió ensayos con altos contenidos de sustrato aceptor. Bajo estas condiciones la enzima LVS-BS mantuvo su actividad en altas concentraciones de hidroquinona (hasta 500 mM). En un reporte realizado por [Meulenbeld y Hartmans \(2000\)](#) también se estudió la influencia de la posición los hidroxilos utilizando diferentes tipos de aceptores y se determinó que *-orto* y *-para* son las posiciones que presentan mayor reactividad. Por el contrario, en las posiciones *-meta* la transferencia presentó rendimientos significativamente menores. Derivado de lo anterior, se señala que en moléculas fenólicas de mayor complejidad estructural tales como los flavonoides, esta selectividad se mantiene para las Gli-S durante los procesos de glicosilación.

Referente a la capacidad para poliglicosilar dihidroxifenoles mediante enzimas Gli-S, [Te Poele et al. \(2016\)](#) reportan la obtención de productos poliglicosilados de catecol mediante el uso de una glucansacarasa-A proveniente de *Lactobacillus reuteri* 121. Gracias a las características de esta enzima y las condiciones de saturación de los sustratos glicosilo (3 lotes de 1000mM de sacarosa) y aceptor fenólico (250mM) se señala la detección de 11 distintos productos que van desde 1 hasta 5 residuos de glucosa en una distribución similar al polímero reuterana generado por esta enzima. Dichos productos se reportaron unidos a un hidroxilo fenólico con enlaces alternados α -(1-4) y α -(1-6) entre sus residuos glicosilo. Sin embargo no se mencionan los rendimientos de la reacción.

Por su parte, en los ejemplos mostrados para flavonoides ([Bertrand et al., 2006](#); [Moon et al., 2006](#); [Meulenbeld et al., 1999](#)) se señala la obtención de productos de distintos grados de glicosilación cuyas transferencias ocurrieron mayoritariamente en hidroxilos correspondientes a arreglos de tipo *-orto*. En dichos reportes los productos mayoritarios fueron los monoglucósidos alcanzando 9 mM. Los productos con más de un residuo de glucosa contaban con unidades de azúcar transferidas en distintas posiciones ya fueran sobre hidroxilos de naturaleza fenólica o glicosilo. En el ensayo realizado por [Bertrand \(2006\)](#) utilizando alternansacarasa B23192 o glucansacarasa de *L. mesenteroides* B512 se sintetizaron productos de quercetina con cadenas oligosacáridas de dos a tres unidades de glucosa. Mientras en el reporte ([Moon et al., 2006](#)) para galato de epicatequina ocurrieron sustituciones en dos hidroxilos fenólicos cada una con un residuo de glucosa mediante la glucansacarasa de *L. mesenteroides* B-1299CB. Lo anterior señala la factibilidad que presentan estas glicosiltransferasas para la generación de glicósidos fenólicos que contengan más de una unidad de azúcar, pero los rendimientos de estos poliglucósidos no superó los 0.9 mM.

En estos ejemplos de glicosilación de polifenoles, nuevamente se menciona la relación que existe entre la escasa solubilidad de las agliconas en los medios de reacción con los bajos rendimientos de glicosilación, ya que se emplearon valores al límite de su solubilidad en medio mayormente acuoso. Al respecto, la estrategia del uso de cosolvente orgánico miscibles en agua como DMSO, MEE o alcoholes metanol o etanol resulta interesante para incrementar

la solubilidad de flavonoides y a su vez mantener la actividad del biocatalizador ([Gómez de Segura et al., 2006](#)). Estudios han mostrado que porcentajes de cosolvente orgánico pueden favorecer la síntesis enzimática de un producto específico, por ejemplo, la levansacarasa BS-LVS en un medio sustituido al 50% con 2M2P logró incrementar la actividad de transferencia hacia polímero respecto a la hidrólisis, este efecto es relacionado a la menor concentración de agua que puede actuar como aceptor ([Castillo y López-Munguía, 2004](#)). Partiendo de esta observación, se plantea la posibilidad del uso de otras Gli-S que mantengan estabilidad frente a cosolventes orgánicos, a la vez que estos medios de reacción incrementen la solubilidad de aceptores hidrofóbicos y junto con la modificación de actividades de la enzima permitan obtener productos poliglucosilados para aceptores fenólicos.

Como se ha mostrado, diversas glucosiltransferasas resultan interesantes para explorar la síntesis de productos con varios residuos glucosilo que específicamente corresponderían a productos poliglucósidos, es decir productos conformados exclusivamente con residuos glucosa. Entre estas enzimas encontramos las dextransacarasas (a partir de ahora denominada como DXS) provenientes de *L. mesenteroides* en sus cepas B512 y B-1299CB las cuales en ejemplos anteriores poliglucosilaron flavonoides (tabla 4). La evaluación de dichas cepas de DXS para procesos de síntesis constituye un interés en la línea de investigación de nuestro grupo de investigación. Además, entre las ventajas que ofrece el uso de DXS se destaca su fácil producción. La producción de la enzima DXS ocurre exclusivamente durante el crecimiento del cultivo, la enzima es de tipo extracelular y puede permanecer unida a su producto polímero dextrana. A su vez, este polímero puede ser constitutivo de la pared celular, en dicho caso la enzima queda asociada a las células y es designada como fracción enzimática insoluble. Por otro lado, en caso de que la enzima se expulse al medio de reacción correspondería a la fracción soluble. Dicha distribución depende de la cepa empleada ([Brooker, 1977](#); [Kobayashi y Matsuda, 1974](#)).

La DXS se clasifica dentro de las glucansacarasas y como se mencionó anteriormente su mecanismo de reacción involucra la participación de tres residuos catalíticos principales para formar un intermediario de reacción. Al respecto, [Leemhuis et al. \(2013\)](#) reportaron que durante la reacción con las glucansacarasas participan otros residuos además de los residuos catalíticos. De manera general, los residuos catalíticos en conjunto con otros cuatro residuos (tres conservados y uno variable) se encargan de unir y orientar los sustratos a favor de la formación del intermediario covalente en el fondo de la cavidad catalítica generando así el subsitio de unión de sustrato -1. En la figura 9 se muestra una estructura en tercera dimensión propuesta por los autores de dicho reporte para la glucansacarasa GTF 180-ΔN mutante D1025N unida a sacarosa indicando en ella los subsitios de unión -1 y +1 que reconocen sustratos donador y aceptor, respectivamente. Estos subsitios cumplen funciones de estabilización y reconocimiento, además en el caso de los residuos que forman el subsitio -1 generan que la cavidad del sitio activo este bloqueado más allá de este subsitio. Es por estas características que las glucansacarasas incluida la DXS, solamente pueden transferir una

glucosa por ciclo de reacción, lo que las caracteriza respecto a enzimas como la α -amilasa que tienen una cavidad de unión más larga.

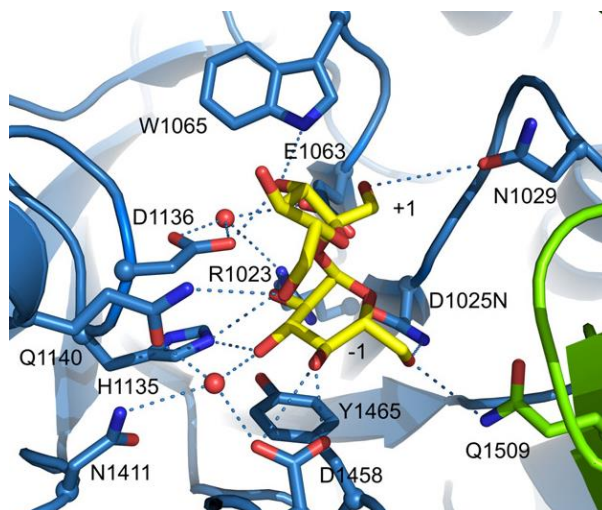


Figura 9. Estructura de glucansacarasa (GTF 180- Δ N mutante D1025N) unida a sacarosa (esqueleto de carbonos en amarillo), indicando los subsitios de unión -1 y +1 y puentes de hidrógeno.

3.8.2. Ciclodextringlucanotransferasa (CGT)

A continuación, en la tabla 5 se muestran algunos ejemplos de síntesis de compuestos glucosilados mediante CGT.

Tabla 5. Reportes de glucosilación de inosoles, fenoles y glicósidos utilizando ciclodextringlicosiltransferasa

Enzima (s)	Origen de enzima	Sustrato aceptor	%Rendimiento ^a (mM producto)	Tipo de residuo glucosilo	Referencia
CGTasa +glucoamilasa	<i>Thermoanero bacter sp.</i> y <i>Aspergillus niger</i>	Myo-inositol	59.8 total y 32 mono-glc (422mM)	oligo-glucosilo mono-glucosilo	Miranda et al. 2010
CGT +glucoamilasa	<i>B.stearothermophilus</i> y <i>Rhizoius sp.</i>	Rutina [Rutinosa: α (1-6)]	Total 67 (p/p) 29.8- 47.3	maltooligosacáridos 4 ^G mono-glucosilo	Suzuki y Suzuki, 1995
CGT + glucoamilasa y naringinasa	<i>Bacillus sp.</i>	Naringina [Neohesperidosa: α (1-2)]	mono-glc 9.5 (p/p), 95mg	maltooligosacáridos 3 ^G mono-glucosilo	Kometani et al., 1996
CGT	<i>Pe anibacillus sp.</i>	Epicatequina	18 (3.1)	3' mono-, di-, tri-, 4' mono-glucosilo	Aramsangtienchai et al., 2011
CGT	<i>Thermoanero bacter sp.</i>	Resveratrol	Total 50 (22mM)	3 ó 4' mono, di-, tri- glucosilo; 3 y 4' tetra- glucosilo	Torres et al., 2011

^a Rendimiento respecto a la concentración inicial de aceptor
4^G y 3^G indican la posición de la glucosa del residuo glicósido aceptor sobre la cual se realizó la transferencia de glucosa(s) provenientes del donador.

Reportes de síntesis de glucósidos para aceptores flavonoide diglicosilados (Suzuki y Suzuki, 1995; Kometani *et al.*, 1996) muestran que las CGT evaluadas realizaron la transferencia sobre el residuo de glucosa contenida en el residuo diglicosilo del aceptor, específicamente en posición 3 para glucosa de neohesperidosa ó 4 para la glucosa de rutinosa. En ambos reportes se obtuvieron productos de tipo mono- y poliglucosilados con conversión hasta 67% (p/p) del aceptor rutina. Sin embargo, posterior a la reacción con CGT las muestras fueron tratadas con amilasas específicas para obtener los productos monoglucosilados que eran el interés de los respectivos estudios.

En este sentido, la capacidad que presenta la CGT para transferir hacia hidroxilos análogos de glucosa fue estudiada por Miranda *et al.* (2010), quién determinó la selectividad de la CGT de *Thermoanaerobacter sp.* para transferir hacia las posiciones específicas de inositoles que sirvieron como análogos estructurales de monosacáridos, empleando β -CD como donador glicosilo. En el caso del myo-inositol (aceptor análogo de glucosa) se señaló que la transferencia ocurre hacia sus posiciones 1 y 4. En este estudio se señaló la detección de 7 productos que suman una conversión de 59.8% de aceptor inositol correspondiente a 622 mM distribuido entre mono y poliglucósidos. En una segunda etapa, la reacción se trató con α -glucoamilasa y se obtuvieron los dos productos regioisoméricos monoglucósidos α -(1-1) y α -(1-4) que sumaron un rendimiento del 32% (422mM) mostrando de los productos maltooligosacáridos digeridos con α -glucoamilasa correspondían a derivados de estas dos conformaciones de regio-isómeros. Cabe observar que la reacción se realizó en condiciones de alta concentración de sustratos 1.04 M inositol y 0.17 M β -CD.

Por otro lado, también se muestran ejemplos del uso de CGT para la transferencia de diversas unidades de glucosa hacia aceptores fenólicos como epicatequina y resveratrol (Aramsangtienchai *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2011). En el reporte de epicatequina se purificaron cuatro productos mayoritarios, dos de ellos monoglucósidos en las posiciones 3' y 4' así como un di- y un tri-glucósido unidos a la posición 3' de la aglicona. Asimismo, se detectaron otros dos productos que no fueron elucidados pero cuyas características corresponde a poliglucósidos con los cuales suman 6 derivados glucósidos y muestran la selectividad de CGT hacia los diversos hidroxilos fenólicos. Cabe mencionar que la baja concentraciones de aceptor inicial 17.2mM (relacionada a la escasa solubilidad del flavonoide en el medio acuoso) determinó la baja cantidad de productos totales de 3.12mM. En cuanto al reporte con resveratrol un total de 11 productos glucósido fueron detectados y elucidados donde se incluyen desde mono- hasta tetra-glucósidos con distribución diversa de la posición de sustitución entre los tres hidroxilos del resveratrol pero ninguno de estos productos presentó sustituciones simultáneas en posiciones 3 y 5 del mismo ciclo aromático lo cual se señaló probablemente tiene relación con el impedimento estérico de residuos los glucosilos en posiciones cercanas. Como parte de la optimización de condiciones de esta reacción se evaluaron diversas concentraciones de DMSO y se determinó que 20% permite el máximo rendimiento de productos glucosilados derivado del compromiso que se mantiene entre la

solubilidad del sustrato y la eficiencia de la enzima. Los 8 principales productos suman una concentración de 20.4mM que equivalen a un rendimiento de 46.4% del resveratrol inicial, cercano al 50% de conversión total reportado.

Estos ejemplos de la tabla 5 muestran la capacidad de la enzima CGT para sintetizar poliglucósidos sobre hidroxilos de diversos tipos como fenólico, sacárido o análogos estructurales de sacáridos como inositol. Hasta el momento en que se realizó esta revisión, no se encontraron reportes del uso de la enzima CGT para glucosilar dihidroxifenoles ni estudios que relacionen el grado de complejidad estructural de los dihidroxifenoles con la capacidad de la CGT para glucosilar este tipo de moléculas.

El mecanismo de glicosilación con esta enzima se realiza por la vía de la transglicosilación que implica la formación del intermediario glucosil-enzima, que puede ser transferido a diversos aceptores. El sustrato glucosilo puede ser CD, pero también otros donadores glucosilo lineales pueden ser utilizados por ejemplo oligomaltósilos o glucósidos. La formación de productos con diversos grados de glucosilación con CGT se explica en base a las actividades particulares de la CGT. Considerando que se involucra la participación de diferentes subsitios de reconocimiento (figura 10). Del lado de aceptor son dos subsitios denominados +1 y +2, del lado de donador se han señalado hasta siete posiciones designadas como -1 hasta -7. Los sitios de donador son estrictos para glicosilos, mientras que los sitios de aceptor son capaces de reconocer diversos sustratos (oligo glicosilos lineales o cíclicos, poliglucosídicos, etc.). Los aceptores o extremos tipo maltosa son los preferidos para su acomodo en los subsitios +2, +1, entonces podría esperarse el acomodo de diversas cadenas oligo-glucosídicas con el extremo reductor orientado hacia subsitio +2 de aceptor, dando origen a dos productos: un monoglucósido más una cadena intermediara. Dicha cadena intermediaria puede a su vez ser transferida nuevamente lo cual daría lugar a un producto de menos un residuo que el original.

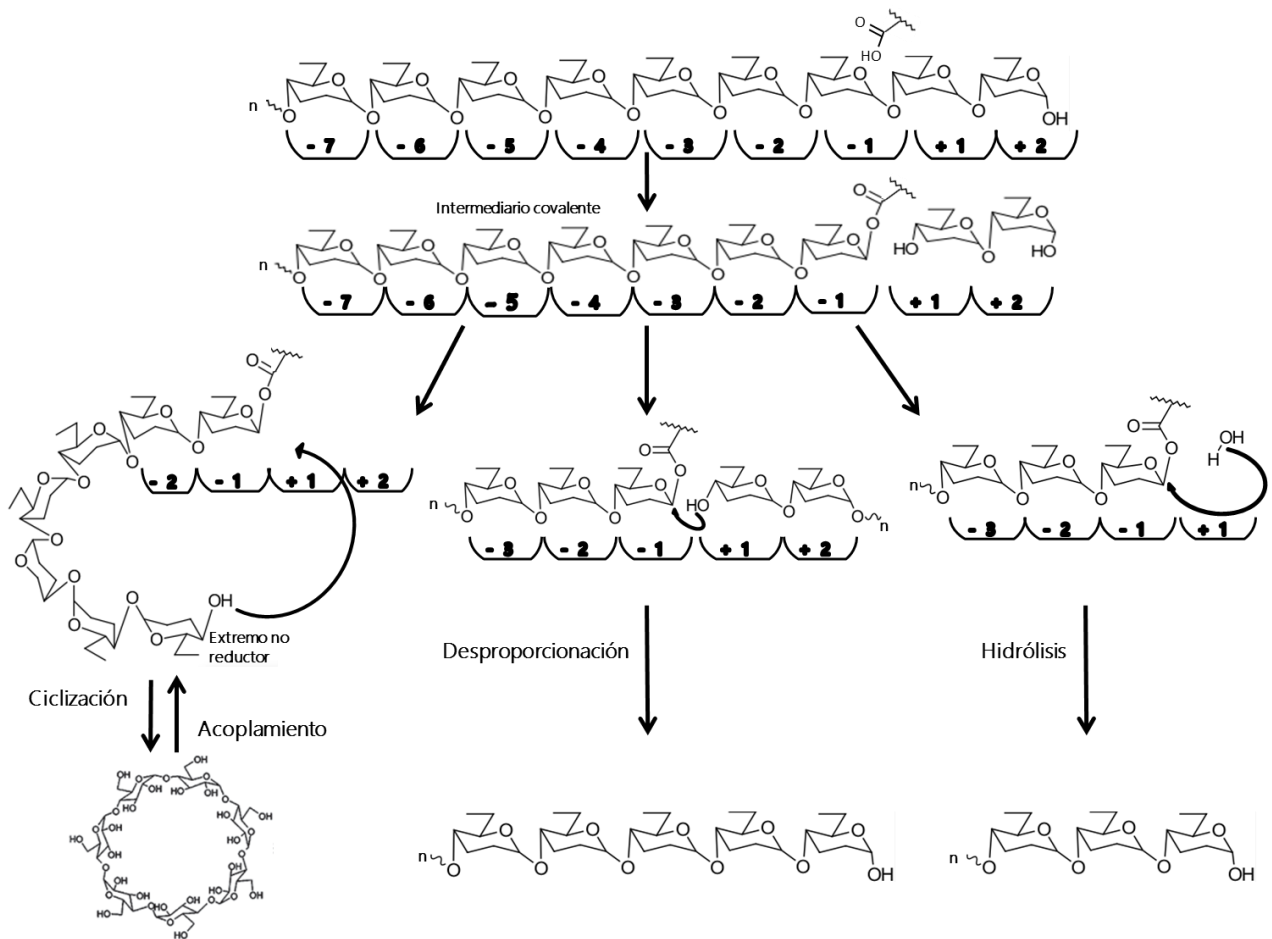


Figura 10. Mecanismo de las actividades presente en la CGT indicando la presencia de subsitos de reconocimiento de sustratos (Kelly *et al.*, 2009)

Como se ha mostrado en la figura 10, diversos tipos de donadores glicosilos (CD o glucosilo) pueden usarse como sustratos para su transferencia sobre varias moléculas aceptoras. Pero también puede utilizarse para desproporciónación, transformando la longitud de cadenas oligomaltosídicas con ello se presenta el cambio en las diferentes proporciones (porcentajes) de los productos. Al respecto también intervienen los sitios de reconocimiento.

Hasta ahora, son pocos los reportes que estudien la contribución de la actividad de desproporciónación de la CGT en reacciones de transferencia hacia aceptores aglicona. En la mayoría de los reportes, se señala que mediante esta actividad se realiza la modificación de cadenas oligomaltosídicas ya sea de tipo glicosilo libre o glucósido. Recientemente, Gudiminch *et al.* 2016 evaluaron el uso de CGT de *Thermoanaerobacter sp* para glucosilar ácido ascórbico (1420mM) usando α -CD (310mM) como donador glicosilo. Los resultados señalan la obtención de productos poliglucósidos con una tendencia de acumulación de productos con los menores grados de glucosilación ($GG \leq 4$). Respecto a la formación de productos con este GG, los autores destacaron la poca influencia que tiene la cadena original α -CD en el grado de glucosilación

mientras que determinaron una alta influencia de la actividad de desproporción mediante la cual se hace transferencia de las diversas cadenas oligomaltosídicas de los productos poliglucosilados. En base a los porcentajes de los diversos productos señalaron el consumo de las cadenas de glucosilo con longitud GG de 5-11 para favorecer a productos de $GG \leq 4$ siendo los de menor longitud los más acumulados, es decir mayor acumulación del monoglucósido. Al respecto señalan que la enzima CGT se favorece el acomodo de un poliglucósido con su extremo aglicona y su contiguo residuo de glucosa en los subsitios de aceptor +2 y +1 de la enzima, respectivamente; lo cual tras su escisión con la actividad de desproporción deriva en un monoglucósido y el resto de la cadena forma el intermediario glicosilo-enzima que puede ser transferir el glicosilo a una nueva molécula de ácido ascórbico generando producto con longitud de un residuo menos que el glucósido de origen.

Además de los ejemplos de obtención de productos poliglucosilados, las enzimas ciclodextrin glicosiltransferasa muestran como ventajas adicionales termoestabilidad respecto a otras glicosiltransferasas (Daines *et al.*, 2004) y más estables a la presencia de disolventes miscibles con el agua (Franssen *et al.*, 2005), lo cual les confiere interés para los procesos de síntesis de glicósidos fenólicos. Entre los distintos reportes de glucosilación mediante el uso de CGT, destaca la enzima producto comercial obtenido a partir de *Thermoanaerobacter sp.*

4. HIPÓTESIS

Con base en las actividades de transferencia y las características de estabilidad y selectividad mostradas por enzimas glicosiltransferasa (dextransacarasa y/o ciclodextrin glicosiltransferasa) es posible obtener productos poliglucosilados de diferentes estructuras fenólicas.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

- Mediante el empleo de enzimas glicosiltransferasas obtener glucósidos de agliconas fenólicas en donde se incorporen dos o más residuos de glucosa.

5.2. Objetivos específicos

- Obtener preparaciones enriquecidas de enzimas dextransacarasas a partir de cultivos de *Leuconostoc mesenteroides*.
- Evaluar la capacidad de enzimas dextransacarasas (DXS) y ciclodextrin glucanotransferasa (CGT) para transferir múltiples residuos glucosa a aceptores modelo tipo dihidroxifenoles.
- Estudiar el efecto de un azúcar en la molécula aceptora sobre la capacidad de DXS y CGT para transferir múltiples residuos glucosilo.
- Estudiar la capacidad de DXS y/o CGT para transferir múltiples residuos glucosilo en presencia de porcentajes de cosolvente orgánico (actividad residual y % transferencia).
- Evaluar de la capacidad de DXS y/o CGT para transferir múltiples residuos glucosilo sobre fenoles complejos como ácido cinámico, estilbeno y flavonoide que contienen arreglos de tipo dihidroxifenoles.

6. METODOLOGÍA

6.1. Producción de enzimas Dextranasa (DXS)

La enzima DXS se obtuvo en su forma asociada a células o liberada en el medio de cultivo a partir de cultivos del microorganismo productor de esta enzima *Leuconostoc mesenteroides* (Lm) en sus cepas 1299 y B512. Las células se desarrollaron a partir de los liofilizados de cada cepa. Los liofilizados se trabajaron de manera separada pero bajo condiciones similares de crecimiento del microorganismo. Los cultivos celulares obtenidos fueron semipurificados para obtener suspensiones enriquecidas de la enzima. Los liofilizados utilizados se resuspendieron en 2 ml de medio cultivo líquido LM (4% de sacarosa, pH=6.9) con sales, que se detalla a continuación:

Tabla 6. Composición del medio de cultivo LM

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN (g/l)
Sacarosa	40
Extracto de levadura	20
K ₂ HPO ₄	20
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.02
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.015
MnSO ₄	0.01
NaCl	0.01

Esta resuspensión se agitó a 200rpm a 31°C durante 14 horas. Una alícuota de 0.2ml fue sembrada en medio sólido LM, dispersado por perlas e incubado a 30°C por 36 horas. Para obtener colonias aisladas, una azada de los microorganismos obtenidos en medio sólido fue sembrada por estría sobre una nueva placa LM e incubada en las condiciones arriba mencionadas. Se seleccionó una colonia aislada que fue resuspendida en 25ml de medio estéril en un matraz de 125ml e incubada a 200rpm y 31°C hasta una densidad óptica (D.O.) que permitiera generar un pre-inóculo cercano a la fase exponencial correspondiente a cada cepa. Dicha fase coincide con la disminución de la velocidad de acidificación del medio (medido como pH) y de crecimiento celular (medido como D.O). La medición de D.O. se realizó a 600nm y se emplearon las diluciones necesarias. Las fermentaciones se realizaron con 1 ml de pre-inóculo llevado a 50ml de medio LM (matraz de 250ml) por tiempos que permitiera alcanzar la fase exponencial de cada cepa. Al final de la incubación se ajustó el pH a 5.4, valor óptimo de la enzima DXS para ambas cepas. Un escalamiento de la producción de DXS-1299 se realizó con el volumen total de 25ml de inóculo, adicionado a 2 l de medio LM estéril e incubado en las condiciones anteriores.

6.2. Concentración y almacenamiento de la enzima DXS

En el caso de la cepa 1299, reportes previos (Sánchez, 1996 y Quirasco, 1994) señalan que la mayor parte de la actividad glicansacarasa se encuentra asociada a la fracción celular. Por lo cual concluido el periodo de crecimiento el cultivo se centrifugó (10,000rpm/15min) para obtener dicha fracción. A continuación, se lavó dos veces adicionando un volumen similar de solución amortiguadora de acetatos al precipitado (5°, 50mM, pH=5.4). Tras el segundo lavado, se adicionó un mínimo volumen de amortiguador obteniendo una suspensión celular homogénea. Una parte de esta fue llevada a liofilización y el resto almacenada en refrigeración en dichas condiciones que permitan la conservación de actividad a lo largo del tiempo de trabajo.

Para la cepa B512, se tiene reportada mayor contenido de enzima en la fracción soluble (Quirasco, 2000). Una vez removidas las células del cultivo, la separación de enzima se realizó por la adición de partes iguales de polietilenglicol (PM: 1500, 50%, p/v) al cultivo. Esta mezcla es posteriormente centrifugada (6000rpm/25min) para precipitar el polímero de dextrana al cual se asocia la enzima soluble dextransacarasa cepa B512.

La actividad enzimática de las diversas fracciones producidas desde ambas cepas fue determinada usando metodología de DNS (explicada posteriormente) y se continuó con el monitoreo de la actividad durante el almacenaje.

6.3. Medición de la actividad enzimática para DXS

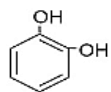
La actividad glucosiltransferasa se estimó con la velocidad de liberación de los azúcares reductores por la enzima en una reacción con sacarosa (10%, p/v) en volumen final de 600µl amortiguador de acetatos pH 5.4 a 30°C. Para la fracción soluble de Lm-B512, las pruebas de actividad se realizaron con un alícuota de 100µl y para Lm-1299 se adicionó 20ul de la suspensión de células para un volumen final 620µl, considerado estos volúmenes en los cálculos de actividad. Los azúcares reductores generados se midieron por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) reportado por Sumner y Howell (1935), cuantificados por absorción a 540nm y calculados en base a una curva patrón de azúcares reductores (1:1 glucosa: fructosa). Una unidad de actividad (UI) se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar un µmol de fructosa por minuto a pH 5.4 y 30°C.

6.4. Reacciones de transferencia sobre diversos aceptores fenólicos

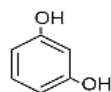
Para evaluar la capacidad de glucosilación de las enzimas DXS y CGT hacia aceptores fenólicos se realizaron pruebas sobre una serie de compuestos fenólicos siguiendo un orden de aumento de la complejidad estructural de los aceptores. De hecho, fue necesario restringir el número de estructuras que representarían los numerosos compuestos fenólicos que existen seleccionándose aquellos que consideramos grupos representativos de la complejidad de los polifenoles. A su vez las moléculas seleccionadas se dividieron en tres categorías por el aumento de complejidad: como compuestos fenólicos sencillos se eligieron los modelos

dihidroxifenoles catecol, resorcinol e hidroquinona y algunos derivados monoglucosilados de estas moléculas tales como la arbutina y la salicina; para el grupo de estructura intermedia se seleccionaron dos compuestos: el ácido cafeíco que presenta cadenas alifáticas laterales, mientras que el resveratrol representa un compuesto tipo biciclo separado por una cadena alifática. En cuanto a compuestos estructuralmente complejos se eligieron como sustratos aceptores a los flavonoides quercetina y naringenina. Todos estos compuestos fenólicos se ejemplifican a continuación:

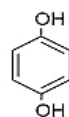
1. De estructura sencilla: Dihidroxifenoles



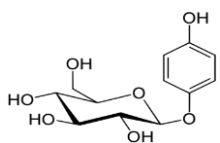
Catecol



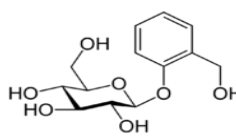
Resorcinol



Hidroquinona

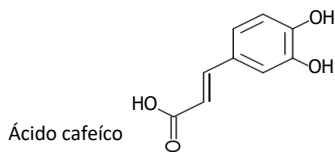


Arbutina: Hidroquinona-4-glucósido

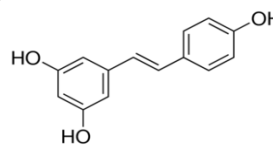


Salicina: 2-(hidroximetil)-fenil-glucopiranósido

2. Estructura intermedia: Fenilpropanoide y estilbeno

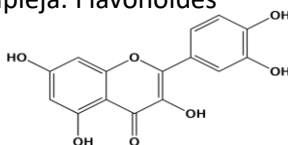


Ácido cafeíco

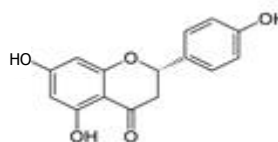


Resveratrol

3. Estructura compleja: Flavonoides



Quercetina



Naringenina

Las particularidades de cada aceptor determinaron que en algunos casos se ensayara la adición de cosolventes orgánicos al medio de reacción. Por otra parte, el tipo de enzima empleada determinó el sustrato donador: sacarosa o CD. Las diversas combinaciones de sustratos, enzima empleada, así como condiciones y preparación de medios de reacción se resumen en la tabla 7.

Tabla 7. Resumen de las condiciones de reacción, sustratos utilizados y enzimas evaluadas en las diferentes reacciones de glucosilación de fenoles

Enzima	Donador	Aceptores	Condiciones de reacción	
			Medio	Observaciones
DXS 10U/ml	300mM Sacarosa	300mM de dihidroxifenoles simples (catecol, resorcinol, hidroquinona) o glucósidos de fenol (arbutina y salicina).	Amortiguador de acetatos 50mM, pH 5.4	Vol. 1ml, 30°C, 24horas, 500rpm
CGT 10U/ml	300mM β-CD (340g/L)	300mM de dihidroxifenoles simples (catecol, resorcinol, hidroquinona) o glucósidos de fenol (arbutina y salicina).	Amortiguador de fosfatos 50mM, pH 6	Vol. 1ml, 50°C, 40horas, 850rpm
CGT 10U/ml	300mM β-CD (340g/l)	g/l equivalente a 300mM de polifenoles (ácido cinámico, estilbeno, flavonoide) Ácido cafeíco 54 g/l Resveratrol 68 g/l Quercetina 90 g/l	20% de 2M2B o DMSO, amortiguador de fosfatos 50mM, pH 6	Vol. 0.5ml, 50°C, 40horas, 850 rpm
CGT 8U/ml	132mM β-CD (150g/l)	90 g/l flavonoides cercano a 300mM Quercetina (298mM) Naringenina (301mM)	35% DMSO, amortiguador de fosfatos 50mM, pH 6.	Vol. 1ml, 50°C, 40horas, 850rpm

Alícuotas a diferentes tiempos de reacción fueron desactivadas sumergiéndolas en un baño 100°C/20min y congeladas a -20°C hasta su análisis.

6.5. Identificación de sustratos y productos por Cromatografía en Capa Fina

El análisis de sustratos y productos de reacción utilizando los aceptores fenólicos se realizó cualitativamente mediante Cromatografía en Capa Fina (TLC, por sus siglas en inglés), usando placas aluminio Merck UV₂₅₄ y una fase compuesta por butanol: ácido acético: agua, 4:1:1. La presencia de compuestos fenólicos en las distintas pruebas se detectó mediante la observación de las placas bajo luz UV a 254 nm que permiten visualizar la fluorescencia emitida por los dobles enlaces presentes en estructuras fenólicas. La detección de compuestos que contienen azúcar en su estructura, compuestos glicosilados, se realizó por revelado de las placas por aspersión con una solución de α-naftol al 2.4% en una mezcla de etanol/agua/H₂SO₄ (83:7:11) y posterior calentamiento a 100°C durante 1 minuto. Los cálculos de factor de retención (Rf) de las diversas señales separadas se muestran en el anexo 2.

6.6. Cuantificación de compuestos dihidroxifenoles y arbutina mediante HPLC

La cuantificación de compuestos hidroquinona y resorcinol se realizó mediante cromatografía de alta resolución (HPLC) Waters, utilizando una columna C₁₈ Cogent Bidentate 4μm, 250 x 4.6 mm y como fase móvil la mezcla agua: acetonitrilo 75:25, a un flujo de 1 ml/min, a 30°C. Para su cuantificación se utilizó una curva estándar con una cantidad conocida cada compuesto. La cuantificación de catecol se realizó usando esta misma columna con fase móvil 95:5 agua:

acetonitrilo (0.1% TFA) a un flujo de 1 ml/min, 30°C y se utilizó una curva estándar con una cantidad conocida de catecol.

Para el cálculo de los porcentajes de conversión de cada sustrato dihidroxifenol se cuantificó la concentración de aceptor inicial y su concentración al tiempo final de reacción, esto para cada aceptor y enzima evaluados. Los cálculos se realizaron de la siguiente manera:

$$\% \text{ Conversión} = (\text{dihidroxifenol}_{\text{inicial}} - \text{dihidroxifenol}_{\text{final}}) / (\text{dihidroxifenol}_{\text{inicial}}) * 100$$

6.7. Detección de productos glicosilados de dihidroxifenoles mediante HPLC

La detección de los derivados glicosilados de moléculas catecol, hidroquinona y resorcinol se realizó utilizando el equipo Waters 717 plus Autosampler, detector de diodos Waters 996 (Waters, USA) acoplado al detector IR. Se empleó la columna Prevail Carbohydrate ES y como fase móvil acetonitrilo: agua 68:32, a un flujo de 1 ml/min, 30°C. Para su detección se utilizaron estándares cada compuesto fenólico así como de algunos oligosacáridos y β -ciclodextrina.

6.8. Cuantificación de actividad de ciclización de la enzima CGT en presencia de cosolventes orgánicos

La actividad de CGT en los distintos medios de reacción se determinó por su velocidad de formación de β -ciclodextrinas las cuales se cuantificaron indirectamente como complejos de inclusión con fenolftaleína (relación 1:1) que disminuyen la coloración de fenolftaleína libre. Los medios de reacciones evaluados fueron 100% buffer, 10 y 15% de 2M2B y 20 y 35% de DMSO preparados a partir de almidón 2% llevando a aforo de 1.45ml con los correspondientes volúmenes de amortiguador de fosfatos (concentración final 50mM, pH 6) y/o co-solvente para una concentración final de 1% de almidón. Los medios de reacción se incubaron a 50°C, 850rpm y se adicionó 50 μ l de la enzima CGT diluida 1:100 en buffer de fosfatos. Alícuotas de 100 μ l de los primeros minutos de reacción fueron llevadas a 350 μ l de NaOH 0.1M, adicionadas con 500 μ l de una solución fresca de fenolftaleína 0.06mM pH 10.5 (derivada de fenolftaleína etanólica 3mM fresca diluida 1:50 en carbonato/bicarbonato pH 10.5) y se determinó su absorbencia a 550nm. La cuantificación se realizó usando una curva estándar de 0 a 1g/L de β -ciclodextrina. Una unidad de actividad (UI) se define como la cantidad de enzima necesaria para formar un micromol de β -ciclodextrina por minuto a pH 6 y 50°C.

6.9. Determinación de solubilidad de agliconas fenólicas en medios adicionados con diferentes cosolventes

Soluciones saturadas de 45 g/L de los fenoles ácido cafeíco, resveratrol, quercetina y naringenina fueron preparados en los diversos medios: 100% buffer, 10 y 20% de 2M2B y 20 y 35% de DMSO. Estas mezclas se mantuvieron en agitación por una hora y posteriormente centrifugadas a 13000 rpm/10minutos. El contenido de compuesto fenólico en el sobrenadante fue cuantificado mediante HPLC.

6.10. Cuantificación de ácido cafeíco, resveratrol, quercetina y naringenina mediante HPLC

La cuantificación de compuestos fenólicos para los ensayos de solubilidad en distintos medios y por conversión enzimática se realizó mediante cromatografía de alta resolución (HPLC) usando el equipo Ultimate3000 (Dionex). Para la cuantificación se utilizó la columna C₁₈ Novapack (Waters) 150x4.6 mm y se empleó como fase móvil agua: acetonitrilo 80:20 con 0.1% ácido trifluoroacético (TFA) a un flujo de 1 ml/min y una temperatura de 40°C. Para su cuantificación se utilizó una curva estándar con una cantidad conocida de cada compuesto.

7. RESULTADOS Y DICUSIÓN

7.1 Producción de la enzima dextransacarasa

La enzima dextransacarasa (DXS) fue producida por *Leuconostoc mesenteroides* (Lm) cepas 1299 y B512 y se determinó su actividad glicosiltransferasa en las fracciones insoluble (asociada a células) y soluble (libre en el medio). En la tabla 8 se muestran los valores de actividad de estas cepas y fracciones con base al peso seco de células, este peso seco fue reportado previamente para cultivos del mismo microorganismo bajo condiciones similares de crecimiento (Sánchez, 1996; Quirasco, 1994).

Tabla 8. Distribución de actividad glucosiltransferasa de cepas de *L. mesenteroides*

Fracción	UI (U/mg células)	
	Lm 1299	Lm B512
Insoluble	5.63	0.11
Soluble	0.38	0.72

Lm= *Leuconostoc mesenteroides*

La actividad glucosiltransferasa para la fracción insoluble de la cepa Lm 1299 fue 5.63 U/mg de células secas, este valor es significativamente mayor frente a las otras 3 fracciones obtenidas (porción soluble de 1299 y las fracciones soluble e insoluble de la cepa B512) cuyas actividades no superan 1U/mg de células secas. Como se esperaba, la mayor parte de la actividad de DXS-1299 se encontró en la fracción insoluble con un 89.6% la cual fue similar a los reportes previos de 84.4% de actividad en la misma fracción obtenida bajo condiciones similares de crecimiento (Sánchez, 1996). Por su parte, la cepa B512 mostró valores de actividad enzimática por debajo de lo esperado.

En relación a la producción de enzima, debido a que ésta ocurre exclusivamente durante la etapa de crecimiento del cultivo celular (Lappan y Fogler, 1994; Dols, 1997), se monitorearon las diferentes curvas de crecimiento de ambas cepas en cultivo líquido, mostrando un crecimiento dentro de lo reportado en la literatura. La cepa 1299 alcanzó valores de DO=14.5 y pH= 5.5 mientras para la cepa 512 se reporta DO de 14 y pH=5) al final de su fase exponencial cuando ocurre la máxima formación de enzima; sin embargo, sólo el cultivo con la cepa Lm-1299 mostró la producción de enzima esperada, mientras que la cepa Lm-B512 manifestó reducida actividad en ambas fracciones con 0.11 y 0.72 UI/mg células en sus fracciones insoluble y soluble. En este sentido, se realizó una inspección de las características de colonias aisladas en medio sólido para lo cual se cultivaron las cepas de Lm B512 y 1299 en diversas diluciones para comparar características fenotípicas en las colonias bajo las mismas condiciones de crecimiento. Los resultados mostraron colonias de Lm-B512 con halos de polímero de menor tamaño comparadas con las colonias de Lm-1299 en las mismas condiciones y tiempo de incubación lo que muestra la baja capacidad de B512 para producir el polímero dextrana, esto como resultado de una pobre producción de enzima dextransacarasa.

A pesar de prolongar el tiempo de incubación, probar con diversos inóculos de cepa B512 y resiembra de las colonias de dichas cepas estas no mejoraron los niveles de producción de polímero mostrado y en consecuencia tampoco se detectó suficiente actividad glicosiltransferasa en cultivos de producción para Lm B512. El interés de contar con la enzima de la cepa B512 es que representaba otra opción de biocatalizador para las reacciones de poliglicosilación. Sin embargo, debido a los problemas para obtener suficiente enzima de DXS de la cepa B512, se decidió realizar los estudios de síntesis solamente con la enzima dextrantransferasa de la cepa Lm-1299 asociada a su fracción celular. Esta fracción insoluble (celular) se denominó a partir de ahora sólo como DXS. Previamente se ha reportado la glicosilación de diversos fenoles utilizando enzimas fructosiltransferasas asociadas a células completas (suspensión semipurificada) reportando características operacionales satisfactorias (Mena, 2012).

Por su parte la ciclodextringlicosiltransferasa (CGT) empleada para los estudios de síntesis fue una enzima comercial aislada a partir de una cepa de *Thermoanaerobacter sp* y producida heterológicamente por Novozymes®.

7.2. Selección de enzima transferasa para poliglicosilar aceptores fenólicos

La evaluación de la capacidad de síntesis de poliglucósidos fenólicos mediante las enzimas DXS y CGT se realizó siguiendo un orden de aumento de la complejidad estructural de los aceptores, seleccionándose aquellos aceptores que consideramos representativos de la complejidad de los polifenoles.

7.2.1. Transferencia sobre agliconas dihidroxifenólicas

Las evaluaciones de poliglicosilación de moléculas fenólicas mediante las enzimas DXS y CGT iniciaron con dihidroxifenoles debido a que estas moléculas sencillas resultan útiles como modelo de otras estructuras fenólicas más complejas. Con ello, en esta primera etapa además de evaluar la capacidad de dichas enzimas para la síntesis de poliglucósidos compuestos fenólicos sencillos, permitiría estudiar al mismo tiempo la regioselectividad de las enzimas DXS y CGT hacia los posibles arreglos di-hidroxilos sustituyentes al benceno, es decir la regioselectividad hacia arreglos de tipo *-orto*, *-meta* o *-para*, los cuales respectivamente corresponden a las moléculas dihidroxifenólicas: catecol, resorcinol o hidroquinona (figura 11). Así mismo, nos permitiría aproximar si las enzimas en cuestión son capaces de reconocer dichos arreglos dihidroxilos cuando se presenten en estructuras fenólicas más complejas.

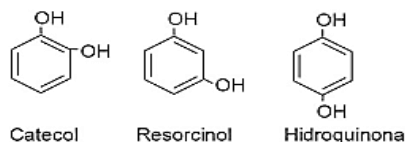


Figura 11. Compuestos dihidroxifenoles evaluados

Las condiciones de reacción se eligieron bajo la consideración de que los rendimientos de glicosilación mediante enzimas Gli-S y CGT mejoran a altas concentraciones de sustratos. En este sentido, un aspecto adicional en esta etapa fue el estudiar el uso de altas concentraciones de sustrato donador glucosilo y aceptor fenólico que permitieran incrementar el rendimiento de la reacción de transferencia y en consecuencia disminuir o desfavorecer la reacción de hidrólisis (Ortíz-Soto *et al.*, 2004). En esta etapa se probaron cantidades equimolares 300mM de donador y aceptor en medio de reacción de solución amortiguadora. Sustratos como los dihidroxifenoles catecol, resorcinol e hidroquinona han mostrado ser solubles en buffer de acetatos hasta valores de 500mM de acuerdo a reportes realizados por Mena *et al.* (2011).

La detección de productos glucósidos de aceptores dihidroxifenoles se realizó de manera preliminar mediante TLC para cada enzima evaluada. Mediante esta técnica se monitorearon tiempos de reacción inicial (0 horas), intermedio (14 horas) y final (40 horas) para cada aceptor y enzima. El revelado con luz UV_{254nm} detectó aquellos compuestos que tuvieran la presencia del grupo químico de benceno, es decir reveló los compuestos dihidroxifenólicos y sus derivados glucosilados (figura 12).



Figura 12a. Análisis de TLC para reacciones catalizada con DXS, reveladas con UV (254 nm). Control sin aglicona (sA), catecol (CT), resorcinol (RS) e hidroquinona (HQ). Carriles 1, 4, 7, 10: tiempo inicial de reacción; 2, 5, 8, 11: 14horas de reacción; 3, 6, 9, 12: 40 horas de reacción. Carril 13: estándares sacarosa, fructosa y arbutina.

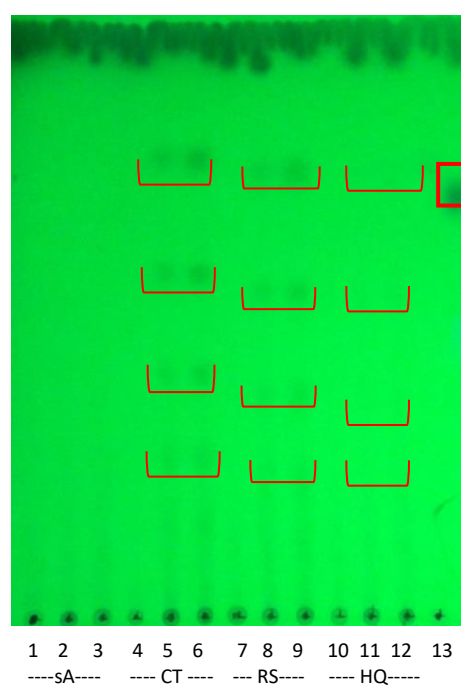


Figura 12b. Análisis de TLC para reacciones catalizada con CGT, reveladas con UV (254 nm). Control sin aglicona (sA), catecol (CT), resorcinol (RS) e hidroquinona (HQ). Carriles 1, 4, 7, 10: tiempo inicial de reacción; 2, 5, 8, 11: 14horas de reacción; 3, 6, 9, 12: 40 horas de reacción. Carril 13: estándares β -ciclodextrina y arbutina.

En ambas placas de TLC de la figura 12 se detectaron las señales del sustrato dihidroxifenol inicial o residual los cuales se confirmaron por sus valores de $R_f=0.98$ similar a sus respectivos estándares. Así mismo, mediante UV_{254nm} se detectaron diversos productos a las 14 y 40 horas de reacción sin que entre estos tiempos se apreciara diferencia del perfil e intensidad de señales. En la tabla 9 se muestran los valores de R_f para el tiempo de 40 horas con cada enzima y aceptor. En el caso de DXS, se detectaron señales de un producto glucósido denominado GG1 para cada uno de los aceptores, estos productos presentan R_f similar al estándar arbutina (compuesto dihidroxifenol-monoglucosilado). En el caso de CGT, se detectaron series particulares de señales de hasta cuatro productos para cada aceptor evaluado, el primero de estos productos en todos los aceptores presentó R_f similar al estándar de arbutina por lo cual fue denominado GG1, el resto de los productos denominados GG2, GG3 y GG4.

Tabla 9. R_f de señales detectadas con UV_{254nm} en TLC para las reacciones con DXS o CGT (40 horas) usando aceptores catecol (CT), resorcinol (RS) o hidroquinona (HQ)

Estándar arbutina o producto detectado	DXS			CGT		
	CT	RS	HQ	CT	RS	HQ
	Factor de retención (R_f)					
Arbutina	0.8					
GG1	0.82	0.78	0.81	0.82	0.79	0.80
GG2	**	**	**	0.60	0.57	0.57
GG3	**	**	**	0.43	0.40	0.26
GG4	**	**	**	0.16	0.14	0.15

CT= catecol, RS= resorcinol, HQ= hidroquinona

**= sin señal

Como era de esperarse, en las reacciones donde no se incorporó aceptor fenólico, es decir en las reacciones control sin aglicona (sA), tanto para DXS como CGT, no se detectó ningún producto que revele al UV (figura 12) ya que estos medios de reacción no contienen compuestos fenólicos. Las señales de los compuestos glicosilos como sacarosa, β -ciclodextrina o productos glicosilos derivados de las actividades enzimáticas fueron visualizadas posteriormente mediante α -naftol que revela compuestos que presentan azúcar en su estructura. Los productos que manifestaron coincidencia de señal en el revelado con luz UV y α -naftol son señalados en rojo en las figuras 13 y 14.

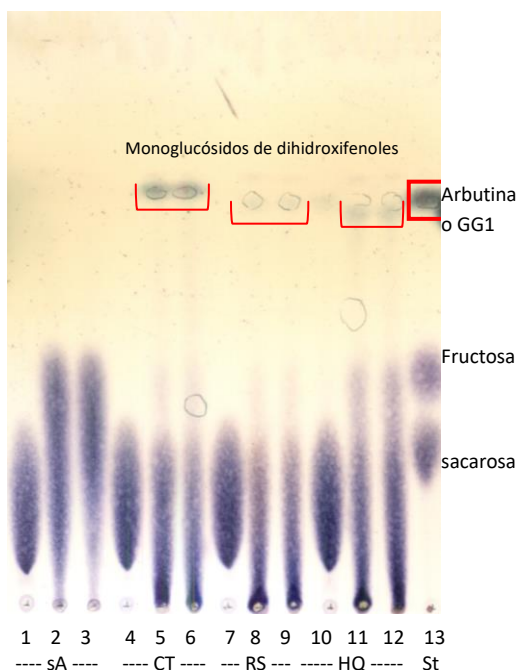


Figura 13. Análisis de TLC para reacciones catalizadas con DXS, revelada con α -naftol. Control sin aglicona (sA), catecol (CT), resorcinol (RS) e hidroquinona (HQ). Carriles 1, 4, 7, 10: tiempo inicial de reacción; 2, 5, 8, 11: 14 horas de reacción; 3, 6, 9, 12: 40 horas de reacción. Carril 13: estándares (St) de sacarosa, fructosa y arbutina.

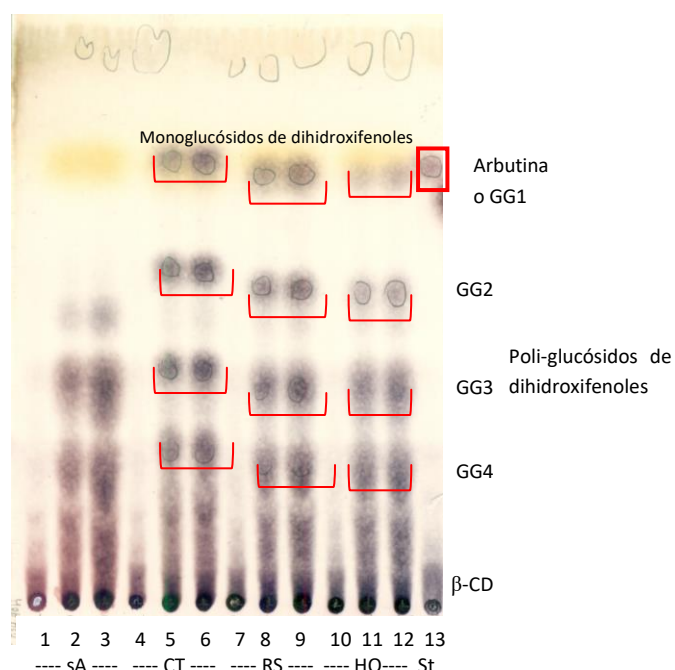


Figura 14. Análisis de TLC para reacciones catalizada con CGT, revelada con α -naftol. Control sin aglicona (sA), catecol (CT), resorcinol (RS) e hidroquinona (HQ). Carriles 1, 4, 7, 10: tiempo inicial de reacción; 2, 5, 8, 11: 14 horas de reacción; 3, 6, 9, 12: 40 horas de reacción. Carril 13: estándares (St) de β -ciclodextrina y arbutina.

En el caso de las reacciones con la enzima DXS y los aceptores dihidroxifenoles (CT, RS, HQ), carriles 4-12 de la figura 13, se detecta un producto dihidroxifenol-glucosa para cada aceptor. Al comparar los Rf (tabla 9) con el estándar de la arbutina (monoglucósido de la hidroquinona) se sugiere que en todos los casos la enzima DXS sólo formó productos monoglucosilados con cada uno de los aceptores evaluados, estos productos fueron denominados GG1.

Cabe recalcar que todos los productos subrayados en rojo en la figura 14 mostraron señal tanto al revelado con luz UV y con α -naftol, indicativo de que se trata de productos de tipo dihidroxifenol-(glucosa)_n. Al analizar los valores de Rf (tabla 9) entre las series de productos de los aceptores indicados como GG2 a GG4, se observa que dichos valores son en general sistemáticamente equivalentes. Además, son valores de Rf menores al de la arbutina, por lo tanto, más polares. Esto quiere decir que para cada aceptor dihidroxifenólico (CT, RS e HQ) se detectó una serie de productos equivalentes en su grado de glucosilación desde GG-2 a GG-4, los cuales representan al menos productos di-, tri- y tetra-glucosilados, además del producto monoglucosilado (GG1).

En una primera instancia estos resultados indicarían que ambas enzimas realizaron la formación del complejo glicosil-enzima descrito en su mecanismo catalítico. Sin embargo, existen diferencias entre las enzimas que pudieron determinar el tipo de productos generados. En el caso de la CGT que utilizó como sustrato donador cadenas de hasta siete unidades de glucosa (β -ciclodextrina), el complejo glicosil-enzima podría formarse con cadenas desde una hasta siete unidades de este azúcar. Por lo contrario, en el caso de la DXS que utiliza como sustrato donador a la sacarosa y en cuyo mecanismo sólo una unidad de glucosa es transferida por cada evento de formación del complejo glicosil-enzima, la DXS sólo podría incorporar una unidad de este azúcar a la vez. En efecto, el crecimiento de las cadenas de dextrana se lleva a cabo por la incorporación de una unidad de glucosa a la vez, mientras que en el caso de la CGT el mecanismo reporta la incorporación de un número variable de glucosas en cada evento de glicosilación (Leemhuis *et al.*, 2013; Jamuna *et al.* 1993; Nakamura *et al.* 1993).

Los perfiles en TLC de productos glicosilados generados por DXS muestran que, con los aceptores y condiciones de reacción evaluados, esta enzima sólo sería capaz de sintetizar moléculas monoglucosiladas. Una información adicional que se observó de las reacciones con DXS es que una vez formado el aceptor monoglucosilado este producto no hace funciones de aceptor dado que en estas reacciones no se observan productos de poliglucosilación. Si bien, la capacidad de la enzima DXS para emplear la molécula monoglucósido como aceptor está influenciada por la disponibilidad del monoglucósido, es relevante señalar que al parecer la especificidad de la enzima por dicho tipo de aceptor juega un papel preponderante. De manera contrastante, en el caso de la CGT se identificaron al menos 4 productos de glucosilación presumiblemente con cuatro residuos de glucosa incorporados. Por el perfil de productos (GG1 –GG4) obtenidos con CGT y en base a la intensidad de las señales de productos semejantes para los cuatro productos detectados en los tiempos monitoreados, se supone que los productos de glucosilación se obtienen en concentraciones muy similares. Esto nos diría que los eventos de mono- o poliglucosilación con CGT se realizaron en eventos paralelos y no necesariamente en eventos sucesivos: los productos con grados de glucosilación bajo (mono- o di-glucosilados) no fueron sustratos aceptores para dar lugar a productos poliglucosilados de tipo tri- o tetra-glucosilados, o viceversa. Esta suposición podría ser confirmada en la medida que se cuente con los perfiles cinéticos de formación de este grupo de productos. Cabe recapitular que la CGT no parece utilizar eficientemente a los productos obtenidos de un primer evento de glucosilación como aceptores y que la poliglucosilación observada con la CGT viene determinada por su capacidad para transferir varias glucosas a la vez. Hasta ahora son pocos los reportes sobre estudios que muestren las acciones involucradas en la continua transformación de productos glucósidos fenólico mediante CGT. Para conocer más sobre la formación de productos glucósidos de fenoles en el presente estudio se realizó una cinética del perfil de productos acumulados o consumidos por efecto de desproporciónación de la enzima CGT (sección 7.2.2).

7.2.2. Cinética de glucosilación de hidroquinona con CGT

Para conocer el perfil de productos generados con CGT en diversos tiempos y detectar el consumo o acumulación de los productos glucósidos que podrían ser transformados por las actividades de la CGT, se monitorearon distintos tiempos de la reacción con el aceptor hidroquinona desarrollada en las condiciones de equimolaridad antes mencionadas de 300:300mM de aceptor: donador. El perfil por HPLC de esta cinética (anexo 3) para los tiempos monitoreados de 0, 4, 8 y 14 horas muestra una acumulación constante de cinco productos y cuya presencia se detecta desde los primeros tiempos de monitoreo de la reacción. El primero de los productos coincide con el tiempo de retención de la hidroquinona monoglucosilada arbutina y es señalado como GG1, mientras que los cuatro productos restantes presentan tiempos de retención mayores que el producto GG1 lo cual indica que se trata de productos más polares los cuales en conjunto con su señal en UV muestran que estas moléculas contienen grupos aromáticos y diversos residuos de glucosa. Dichos productos fueron designados como GG2, GG3, GG4, GG5. Es posible suponer que los productos GG2 a GG5 corresponden a poliglucósidos de hidroquinona conformados por cadenas oligomaltosídicas de longitud 2 a 5 unidades de glucosa, respectivamente. Otros productos con mayor tiempo de retención y por tanto mayor GG también fueron detectados, pero con señales muy bajas en los tiempos de monitoreo. Como ya se mencionó, si bien hasta el tiempo de 14 horas los productos GG1 a GG4 muestran una clara acumulación de sus señales, todos los productos son detectados desde el primer tiempo de monitoreo. A partir de estos resultados se puede deducir que la cadena de oligosacáridos inicialmente transferida en los glucósidos parece posteriormente ser poco utilizada por otras actividades (desproporciónación o hidrólisis) presentes en la enzima. De esta manera, se permite la acumulación de los productos poliglucosilados, los cuales, una vez que la molécula aceptor es glucosilada o poliglucosilada, se vuelve ineficiente como sustrato y/o aceptor.

Recientemente, [Gudiminchi et al. \(2016\)](#) evaluaron la obtención del monoglucósido para el aceptor ácido ascórbico (AA) empleando α -CD (ciclo de 6 glucosas) como donador glicosilo y CGT de *Thermoanaerobacter sp.* (Toruzyme, Novozymes®). Los autores reportan hasta 11 productos de glucosilación por cambio de la posición en la glucosilación, en donde destacan la acumulación de productos glucósidos correspondientes a aquellos con menos de 4 residuos de glucosa. Esto a expensas del consumo de productos con cadenas oligomaltosídicas mayores a 5 glucosas. Los autores sugieren que al inicio de la reacción ocurrió la transferencia de la cadena original de α -CD (6 residuos hexamaltósidos) por actividad de acoplamiento y de manera temprana la actividad de desproporciónación utiliza este producto de 6 glucosas para la formación de otros productos tanto de menor como mayor grado de glucosilación señalando que principalmente se acumulan los productos de 4 glucosas en un orden de mono- > di- > tri- > tetra- glucósido. Al respecto, en dicho reporte se sugiere que la acumulación del monoglucósido está relacionada a la actividad de desproporciónación de la CGT mediante la cual puede hacer uso de los poliglucósidos, sobre todo los de mayor GG.

De manera interesante, en nuestro caso también fue detectada la formación mayoritaria de glucósidos de hidroquinona con GG de 1-4, entre los cuales se manifiesta una acumulación similar para los productos de menor grado de glucosilación. Cabe aclarar que en el cromatograma de HPLC (anexo 4) para la cinética de reacción de hidroquinona no se aprecia la disminución clara de los productos inicialmente formados por lo que suponemos que a diferencia de los productos reportados por *Gudiminchi et al.* (2016) nuestros productos parecen ser transformados de manera poco eficiente como sustratos por la CGT. Para analizar cualitativamente si ocurren cambios del perfil de productos en el progreso de la reacción se calcularon los porcentajes de concentración relativa de cada señal de glucósido en los diferentes tiempos de reacción respecto al área total de 14 horas (área de cada glucósido entre área total de 14 horas que fue el área total máxima). Los resultados de concentración relativa se muestran en la Figura 15.

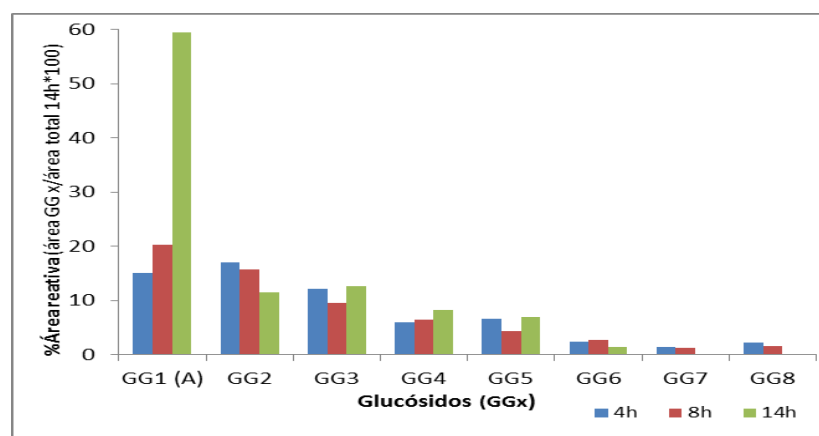


Figura 15. Concentración relativa de especies glucosídicas de hidroquinona en la cinética de reacción mostrada por CGT

En la figura 15, se aprecia que en el progreso de la reacción ocurren cambios en la distribución de porcentajes de los diversos productos. Si bien estos cambios podrían estar relacionados con el efecto de la desproporción entre especies glucosídicas a tiempos de reacción largos, el hecho es que no se altera la observación de formación de los productos de GG 1-8 desde los primeros tiempos de reacción. Es decir, tanto los productos con alto y bajo grado de glucosilación se sintetizan de manera paralela, no secuencial. Una vez generados estos productos (mono- o poliglucósidos) no son tan buenos donadores o aceptores para la CGT. En el caso particular de la especie GG1 existe la acumulación tanto en su contenido total como su proporción relativa respecto a otras especies durante los tiempos monitoreados. La especie GG4 también muestra acumulación, aunque muy modesta. Por otra parte, sólo para la especie GG2 se observa una tendencia de consumo. En cuanto a GG3 y GG5 no mostraron una tendencia absoluta, pero a 14 horas de reacción se observó ligera acumulación de dichas especies. Finalmente, para los productos con GG entre 6 y 8 se manifestó una tendencia de disminución de porcentaje relativo, lo cual hace suponer que ocurrió un consumo de estas especies con el mayor alto grado de glucosilación detectado y que a su vez podrían dar lugar a

la acumulación de otras especies como GG1 y GG4, pero principalmente GG1. Sin embargo, dicha tendencia del consumo de GG>6 no mostró ser determinante en la acumulación progresiva de las especies de menor GG. Por lo tanto la actividad de desproporción parece haber contribuido en menor medida para definir los perfiles finales de productos poliglucosilados del aceptor fenólico hidroquinona.

Por otro lado, cabe señalar que el comportamiento de la CGT hasta ahora descrito no descarta la posibilidad que la transferencia se realice a partir de cadenas oligomaltosídicas “libres” formadas previamente en una actividad hidrolítica temprana y no a partir de la transferencia de los residuos enzima-glucosilo de β -CD. En dicho caso se estarían transfiriendo preferencialmente cadenas oligomaltosídicas de 1-4 glucosas al aceptor fenólico que se contribuya a la acumulación de este grupo de productos. La transferencia de dicha longitud de residuos podría estar ocurriendo porque son los residuos glicosilo más frecuentes y/o por que la enzima presenta cierta afinidad para que los residuos en estas longitudes sean transferidos preferencialmente. Al comparar con reportes de cinética de glucosilación en otras moléculas aglicona mediante CGT, en el estudio realizado por [Molina \(2010\)](#) para la glucosilación del myo-inositol también fue observado un incremento en la acumulación de señales de productos con GG 1-4 para los tiempos de reacción intermedio (6h) y final (24h) sin que se detectara la presencia de productos de mayor GG.

Cabe aclarar que para ambas enzimas DXS y CGT, el perfil cinético de formación de productos poliglucosilados de fenoles no ha sido descrito previamente. En este sentido, de los resultados obtenidos en el perfil cinético con la CGT se propone que la síntesis con esta enzima es a través de un proceso paralelo y no secuencial. En donde, para este tipo de compuestos, la actividad de desproporción presentada por la CGT contribuye en menor medida para definir los perfiles finales de productos. Para el caso de la DXS la dificultad para acumular productos glucosilados depende del mecanismo de incorporación del residuo glucosa ya que esta enzima lo hace unidad por unidad.

7.2.3. Cuantificación de conversión de aceptor dihidroxifenólico por DXS o CGT

De manera complementaria a la descripción cualitativa de productos de reacción por TLC, se determinaron los porcentajes de conversión cada uno de los sustratos dihidroxifenol denominados “simples” en las reacciones a 40 horas realizadas con DXS o CGT (tabla 10).

Tabla 10. Conversión de aceptor en reacciones de glucosilación catalizadas con DXS o CGT

Aceptor en reacción	%Conversión aceptor	
	DXS	CGT
Catecol	1.0	39
Resorcinol	1.5	41
Hidroquinona	1.1	35

Condiciones de reacción: Buffer acetatos (50mM) o fosfatos (20mM). Concentración equimolar 300mM de aceptor y donador (β ciclodextrina o sacarosa). 10U/ml DXS o CGT.

Los resultados presentados en la tabla 10, muestran grandes diferencias en las conversiones de sustrato aceptor alcanzadas con cada una de las enzimas utilizadas. De manera general, mientras que en las reacciones realizadas con la DXS ninguno de los sustratos muestra conversiones por arriba del 1.5%, las conversiones de sustratos aceptor logradas en las reacciones con la CGT alcanzaron en todos los casos valores de alrededor de 40%. En cuanto a la DXS, se puede decir que, si bien los valores de conversión representan de manera exclusiva la producción de monoglucósidos de dihidroxifenol con hasta 4.5 mM, estos valores están muy por debajo de valores que representen un atractivo para su aplicación industrial. Al indagar la o las razones por las cuales la DXS se mostraba ineficiente en las reacciones de glicosilación de dihidroxifenoles se realizó una prueba de estabilidad de la enzima en presencia de altas concentraciones de aceptor y en ausencia del mismo, estas reacciones se realizaron en condiciones y tiempos similares a todos los ensayos anteriores. Los resultados señalaron que la reacción control sin aglicona (sA) convirtió un 73.3% de sacarosa mientras en el caso de los alcoholes dihidroxifenoles la conversión disminuye hasta el 22.5% de conversión de sacarosa. Esto, en términos prácticos, representa una pérdida importante de actividad inicial de la DXS. Si además de esta inestabilidad, consideramos las observaciones de la TLC en las cuales se supone que una vez que la DXS transfiere un primer glucosilo al aceptor dihidroxifenol, la enzima difícilmente puede transferir residuos de glucosa sobre el mismo en eventos sucesivos, la eficiencia para poliglucosilar dihidroxifenoles con la DXS resulta poco conveniente.

En el caso de la CGT, los resultados de TLC y los valores de conversión de aceptor fenólico del orden de 40% (alrededor de 120 mM) indican una mayor producción de derivados fenólicos mono- y poliglucosilados respecto a lo reportado en la literatura previa. Reportes de glicosilación de catecol e hidroquinona mediante el uso de diferentes glicosiltransferasas mencionan valores de conversión máximos de 30 mM y 35 mM, respectivamente ([Mena et al. 2011](#); [Meulenbeld y Hartmans, 2000](#)). Además de la alta conversión molar alcanzada en el presente trabajo, resulta interesante mencionar que se trata de los primeros reportes de glicosilación de dihidroxifenoles a través de CGT, destacando la eficiencia de este biocatalizador para realizar la glicosilación en altas concentraciones de moléculas tipo fenólico.

7.2.4. Transferencia sobre fenoles monoglucosilados: reconocimiento de los productos de glicosilación como moléculas aceptoras

Para una primera evaluación tendiente a saber si las enzimas estudiadas la CGT y la DXS eran capaces de reconocer a los productos monoglucosilados como aceptores y si este proceso sucesivo ayudaba a generar moléculas poliglucosiladas, se realizaron reacciones con ambas enzimas en presencia de fenoles monoglucosilados, la arbutina y la salicina. En este experimento se planteó la posibilidad de que ante una alta concentración de aceptor monoglucosilado las enzimas pudiesen utilizar este aceptor como precursor a partir del cual realizar la transferencia sucesiva de glucosas y obtener productos poliglucosilados. Nuevamente las evaluaciones se realizaron en condiciones similares de concentración y

tiempo con respecto a las reacciones previas, pero ahora utilizando los aceptores arbutina y salicina (figura 16).

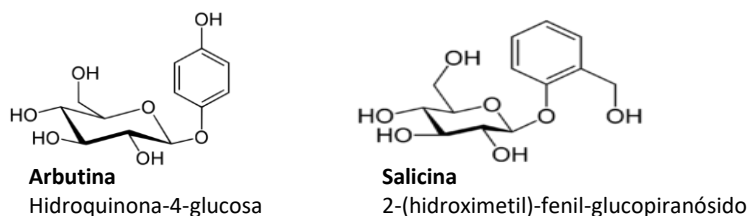


Figura 16. Estructura de arbutina y salicina

La arbutina es el monoglucósido de hidroquinona y presenta hidroxilos libres tanto en el compuesto fenólico como en el residuo glicosilo. En tanto que la salicina es una estructura fenólica con sustituyentes glucosa e hidroximetilo que presenta hidroxilos glucosílico y alcohol primario. Hasta el momento de hacer este estudio no se habían encontrado reportes de glicosilación de aceptores monoglucosilados arbutina y salicina usando DXS ni CGT.

En condiciones similares a los ensayos de estabilidad presentados en secciones anteriores, en el caso de DXS se consideró evaluar además la estabilidad del biocatalizador en condiciones de saturación de arbutina. De manera interesante, el resultado señaló que no ocurrió variación en el porcentaje de conversión de sacarosa en la reacción en presencia de arbutina con respecto a la reacción control sin aceptor. Esto indica que la estabilidad de esta enzima DXS frente a arbutina es similar a la presentada en las reacciones sA. Los resultados de TLC para los ensayos de transferencia hacia fenoles monoglucosilados se muestran a continuación en la figura 17 para ambas enzimas.

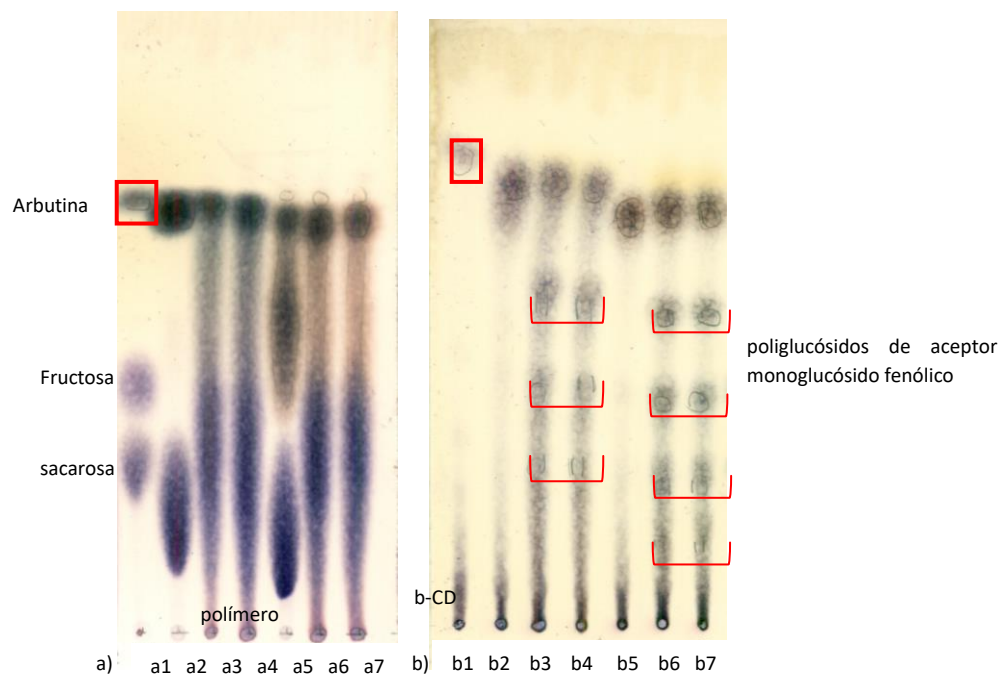


Figura 17. Análisis de TLC para reacciones catalizadas con a) DXS y b) CGT usando aceptores arbutina (AR) y salicina (SL). Carril a1: estándares de sacarosa, fructosa y arbutina. Carriles a2 y a5: tiempo cero de reacción con DXS; a3 y a6: 14 horas; a4 y a7: 40 horas de reacción. Carril b1: estándares de β -ciclodextrina y arbutina. Carriles b2 y b5: tiempo cero de reacción con CGT, b3 y b6: 14 horas; b4 y b7: 40 horas.

Cabe señalar que en el caso de DXS, en la figura 17a no se detectaron señales de productos de glucosilación con las moléculas aceptoras. Se descarta la inactivación de la enzima porque los carriles de tiempos de reacción a2, a3, a6 y a7 muestran señales de productos de hidrólisis como glucosa, fructosa y la formación de polímero y oligosacáridos de glucosa que no se encuentran en tiempos iniciales. Además, como se había mencionado el porcentaje de conversión de sacarosa en el control sin aceptor fue similar al porcentaje mostrado en el medio con presencia de arbutina. Así, la enzima es estable frente al aceptor arbutina pero no utiliza a este aceptor para aumentar su grado de glucosilación. Se concluye entonces que la enzima DXS en su preparación celular aquí utilizada difícilmente reconoce fenoles glucosilados como moléculas aceptoras para una poliglucosilación sucesiva.

En contraste, CGT (Figura 17b) generó diversas señales para los aceptores arbutina y salicina que corresponden a productos poliglucosilados generados a partir de un compuesto monoglucosilado. Con estos resultados, se concluye que la enzima CGT si puede transferir una o varias unidades hacia aceptores de naturaleza tanto aglicona como monoglucósidos fenólicos. Ello coincide con reportes donde esta enzima mostró glucosilación sobre el aceptor diglicósido del flavonoide rutina (Kometani *et al.*, 1996) o sobre inositoles que son moléculas estructuralmente análogas de monosacáridos (Miranda *et al.*, 2011). En los reportes en donde se utilizan como aceptores flavonoides diglicosilados como aceptores, la glucosilación se reporta sobre el hidroxilo 4 de glucosa perteneciente al aceptor y no sobre los hidroxilos

fenólicos disponibles. La regioselectividad de la enzima CGT hacia dicha posición de la glucosa coincide con los señalamientos del estudio con inositoles. Así, en el caso del myo-inositol se reporta que la glucosilación ocurre de manera exclusiva en las posiciones 1 y 4 de este análogo estructural de glucosa. Con base en estos resultados, podría suponerse que en la reacción de glucosilación catalizada por CGT la transferencia de cadenas oligomaltosídicas ocurre en la posición 4 de la glucosa presente en los aceptores monoglucosilados arbutina y salicina.

Como se ha mostrado hasta ahora, existe una notable diferencia entre las capacidades de las enzimas DXS y CGT para poliglucosilar las moléculas fenólicas. En el caso de la DXS, pese a que se trata de una enzima eficiente para formar oligo- y polisacáridos de glucosa, únicamente fue capaz de monoglucosilar agliconas de tipo catecol, resorcinol e hidroquinona. De hecho, no se detectan productos con más de una glucosa incorporada en presencia de las agliconas libres ni tampoco muestra un segundo evento de transferencia sobre arbutina y salicina. Asimismo, los rendimientos de conversión con DXS no superaron el 1.5% lo cual se ha señalado tiene relación con la baja estabilidad de la enzima a altas concentraciones de dihidroxifenoles y al hecho de no reconocer fácilmente fenoles glucosidados como aceptores.

Por su parte, todas las reacciones evaluadas con CGT presentaron resultados de poliglucosilación hacia aceptores de tipo dihidroxifenoles libres o dihidroxifenoles monoglucosilados. En este sentido, la enzima resultó estable y eficiente en presencia de altas concentraciones de aceptor y donador mostrando alta conversión de dihidroxifenoles de hasta 123 mM. Estos resultados destacan frente a reportes anteriores de reacciones de glucosidación utilizando este tipo de aceptores, en donde se obtiene un máximo de 35 mM para el producto monofructósido (Mena *et al.* 2011). Además, resulta interesante que se trata de los primeros reportes de glucosilación de dihidroxifenoles utilizando CGT.

7.2.5. Cuantificación y distribución de los glucósidos sintetizados por DXS y CGT

La cuantificación de los monoglucósidos generados por DXS se realizó de manera directa mediante HPLC y tomando como estándar de producto monoglucosilado a la arbutina. Los resultados de la cuantificación se reportan como milimolar de equivalentes de arbutina (mM eq. Arb) y son mostrados en la tabla 11.

Tabla 11. Cuantificación de producto glucósido de dihidroxifenol generados por DXS

Aceptor	mM eq. Arb
dihidroxifenol	GG1 (monoglucósido)
Catecol	2.5
Resorcinol	3.7
Hidroquinona	3.2

Condiciones de reacción: Buffer acetatos (50mM). Concentración equimolar 300mM de dihidroxifenol y sacarosa. 10U/ml DXS.

Por otra parte, la distribución de productos sintetizados por CGT se realizó en base a la abundancia relativa de los productos calculados a partir de sus áreas en el perfil (HPLC) de

productos las reacciones finales (40 horas) con cada aceptor. En la figura 18, se muestra el perfil de productos obtenidos en las reacciones con hidroquinona en presencia de CGT. Cabe mencionar que se obtuvieron perfiles similares de productos en las reacciones con catecol y resorcinol a tiempos de reacción equivalentes de 40h (cromatogramas no incluidos).

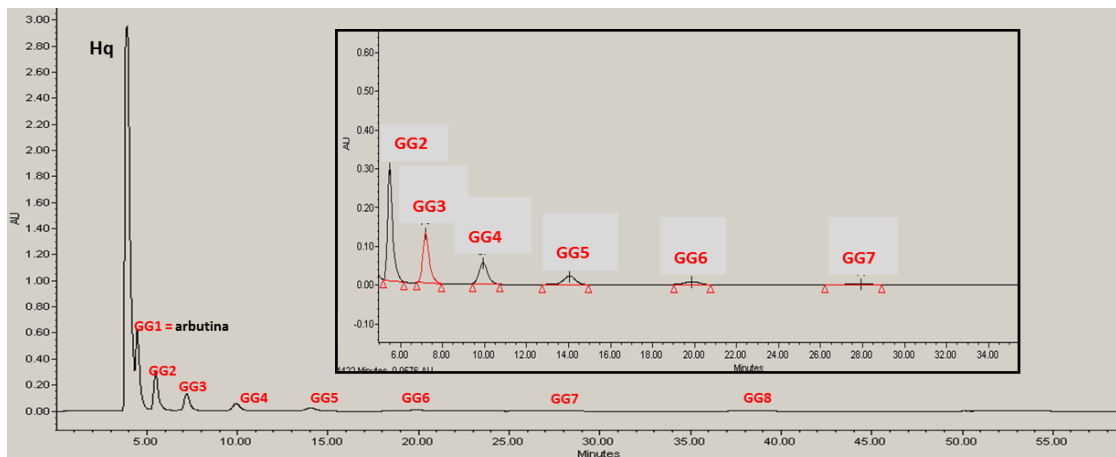


Figura 18. Cromatograma de 40 h de reacción del aceptor hidroquinona con CGT, ampliado en las señales de los productos glucósidos. Columna Prevail, fase normal, UV 280nm.

El perfil para el tiempo de 40h con CGT muestra la formación de productos de GG 1 a 8. Mediante las observaciones del perfil de áreas de productos se aprecia que los productos más abundantes son los que tienen GG de 1 a 5 y cuya acumulación preferencial ha sido discutida previamente. Anteriormente se determinaron los valores de conversión milimolar para cada aceptor en las reacciones con CGT (tabla 10, sección 7.2.3). Ahora se incluye la determinación del porcentaje de área individual de cada producto con respecto al área total para tiempo de 40 horas detectadas mediante HPLC. De esta manera, dicho porcentaje relativo puede representar la concentración relativa de los productos poliglucósidos sintetizados por CGT para los tres aceptores. Para dicha determinación se consideró que la totalidad de aceptor convertido se incorpora a los diferentes productos glicosilados definiendo con ello un perfil individual de cada reacción de glucosilación. Los valores de distribución relativa de glucósidos generados con CGT para aceptores dihidroxifenoles se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Distribución de productos glucósido de dihidroxifenol generados por CGT

Aceptor dihidroxifenol	Distribución relativa (%) de glucósidos (GGx)							
	GG1	GG2	GG3	GG4	GG5	GG6	GG7	GG8
Catecol	54.64	23.11	12.17	5.93	2.57	0.97	0.41	0.19
Resorcinol	54.90	26.33	11.42	4.75	1.79	0.65	0.17	n.d.
Hidroquinona	55.49	25.48	11.18	4.83	2.00	0.69	0.26	0.08

Condiciones de reacción: Buffer fosfatos 20 mM. Concentración equimolar 300 mM de dihidroxifenol y β -ciclodextrina. 10 U/ml de CGT. n.d.= no detectado.

A manera de resumen, en el Anexo 4 se propone un esquema comparativo entre las enzimas DXS o CGT respecto al tipo de residuo glucosilo que cada enzima transfiere sobre aceptores fenólicos, la presencia de subsitios de reconocimiento para cada sustrato en cada enzima y la posterior acumulación o degradación de productos debido a las actividades enzimáticas adicionales a la transglucosilación. De tal manera que lo que aquí se ha discutido sobre las diferencias entre DXS y CGT en lo referente a su capacidad de poliglucosilación de los dihidroxifenoles y el perfil de glucósidos producidos puede ser ilustrado.

Para proseguir con los ensayos de glucosilación en moléculas fenólicas más complejas se seleccionó la enzima CGT por su destacada capacidad para transferir residuos glucosilo sobre aceptores fenólicos y formar productos poliglucosilados. Por otra parte, como ya se ha mencionado la DXS fue capaz de monoglucosilar aceptores de tipo dihidroxifenólico. Sin embargo, no fue capaz de llevar a cabo reacciones de poliglucosilación de estos productos. Bajo este argumento, se decidió no utilizar esta enzima para los ensayos posteriores.

7.3. Poliglucosilación de diversas estructuras fenólicas mediante CGT comparando medios de reacción acuosos o con 20% cosolventes orgánico

A partir del reporte en donde la enzima CGT ha mostrado ser capaz de sintetizar poliglucósidos del polifenol epicatequina evaluado al límite de su solubilidad acuosa (17.2mM) (Aramsangtienchai et al. 2011) y del reporte donde este biocatalizador mostró realizar la poliglucosilación de resveratrol usando un 20% de DMSO como porcentaje óptimo de cosolvente (0 a 50% de co-solvente) (Torres et al., 2011), se decidió evaluar la transferencia hacia moléculas fenólicas de creciente complejidad con el uso de 20% de los cosolventes DMSO y 2M2B además del medio de reacción acuoso (amotiguador o buffer de fosfatos) como control. Las moléculas evaluadas en esta etapa fueron el ácido cafeico (molécula dihidroxifenólica que contiene una cadena lateral propil-ácido) y el resveratrol (molécula que contiene dos anillos fenólicos unidos a través de una cadena tipo etanoide), ambas estructuras fenólicas y sus reacciones se ejemplifican en la figura 19.

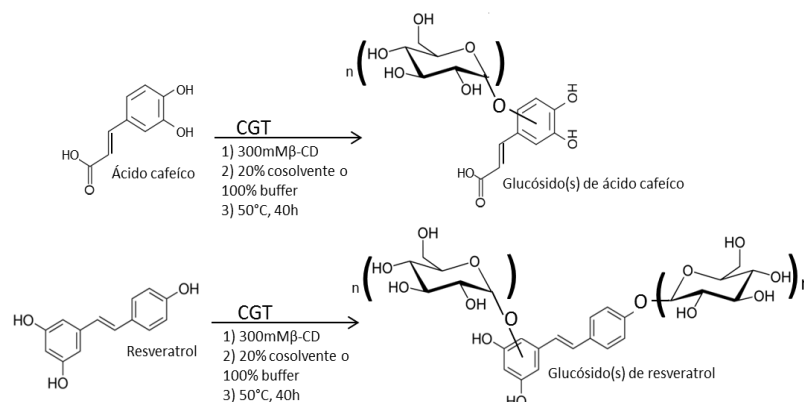


Figura 19. Reacciones de glucosilación de aceptores ácido cafeico y resveratrol. Condiciones de reacción: 20% cosolvente (2M2B o DMSO) y/o buffer de fosfatos (20mM), 300 mM aglicona fenólica (54 g/l ácido cafeico o 68 g/l resveratrol) y 300 mM β-ciclodextrina, 10 U/ml CGT. Literal n representa el número de glucosas transferidas.

En trabajos previos al interior de laboratorio, el cosolvente 2M2B mostró eficacia en la síntesis de glicósidos de aceptores glicósidos de flavonoides mientras el DMSO ha sido empleado en reportes previos de glucosilación de estructuras polifenólicas de tipo resveratrol con enzima CGT (Torres *et al.*, 2011). Los aceptores fenólicos evaluados fueron el ácido cafeíco y resveratrol cuyas estructuras aumentan en su complejidad respecto a dihidroxifenoles simples y en consecuencia disminuyen su solubilidad acuosa. Las condiciones de reacción fueron 20% cosolvente (2M2B o DMSO) en buffer de fosfatos (20 mM), 300 mM de β -ciclodextrina, 300 mM de equivalentes de ácido cafeíco (54 g/l) o resveratrol (68 g/l) y 10 U/ml CGT. Debe resaltarse que los aceptores mostraron diferente grado de solubilidad en los distintos medios de reacción empleados. Al respecto, en los medios de reacción acuoso y con 2M2B se generó leve precipitación de las agliconas en el transcurso de la reacción, pese a la agitación constante. Así mismo en el medio con 20% de 2M2B una vez avanzada la reacción se detectó la formación de dos fases, la fase superior no superaba el 10% del volumen total y se determinó correspondió al cosolvente. Los tiempos de reacción en las diversas condiciones de reacción fueron monitoreados por TLC para ambos aceptores (figura 20).

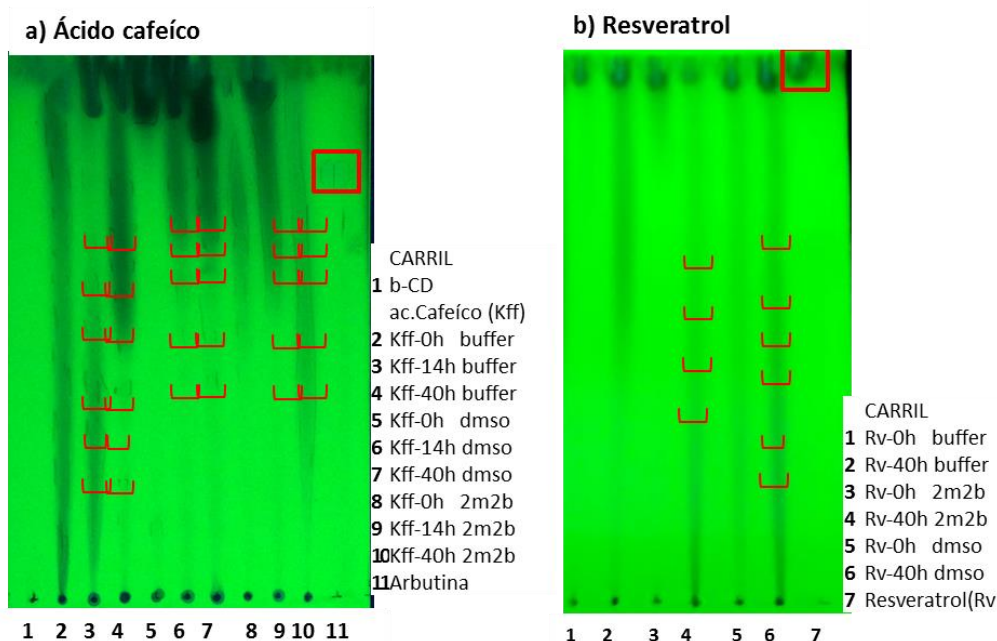


Figura 20. Análisis de TLC (UV_{254nm}) para reacciones con a) ácido cafeíco o b) resveratrol en medios con 20% cosolvente (2M2B o DMSO) y/o buffer de fosfatos (20mM). Condiciones de reacción: 300 mM equivalentes de aglicona (54 g/l ácido cafeíco o 68 g/l resveratrol); 300 mM β -ciclodextrina; 10 U/ml CGT. Carril a1: estándar β -CD, ácido cafeíco (Kff). Carriles a2, a3 y a4: 0, 14 y 40h de reacción en buffer; a5, a6 y a7: 0, 14 y 40 horas en 20% DMSO (dms0); a8, a9 y a10: 0, 14 y 40 horas en 20% 2M2B (2m2b); a11: estándar arbutina. Carriles b1 y 2b: 0 y 40h de reacción en buffer; b3 y b4: 0 y 40 horas en 20% 2M2B (2m2b); a5 y a6: 0 y 40 horas en 20% DMSO (dms0). Carril b7: estándar resveratrol.

Los resultados de la figura 20 mostraron que al incrementarse la complejidad de la estructura fenólica la presencia de cosolvente ayudó a obtener un mayor número de señales de productos glucósidos. Así, para ácido cafeico el perfil de productos por TLC mostró de 5 a 6 señales de productos poliglucosilados en las 3 condiciones de medio de evaluadas. Mientras que para las reacciones con resveratrol la presencia de 20% de los cosolventes fue determinante al detectarse productos (mono y/o poliglucósidos) respecto al medio acuoso. Es decir, en las detecciones por TLC para el ácido cafeico (figura 20a) no se aprecian cambios significativos en el número de señales de productos glucósidos respecto a la composición de cosolvente en el medio de reacción, pero para el caso de resveratrol (figura 20b) se detectaron 4 y 6 señales para los medios con presencia de cosolventes orgánicos 2M2B y DMSO respectivamente, sin que en el medio acuoso se detectaran señales.

Complementario a las detecciones por TLC, se cuantificaron mediante HPLC los porcentajes de conversión del ácido cafeico y resveratrol para las tres condiciones de medio de reacción empleadas, los cuales se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Conversión en porcentaje y mM de aceptores fenólicos en medios de reacción con 20% co-solvente y control buffer

Aceptor	% conversión de aceptor (mM)		
	100% buffer	20% 2M2B	20% DMSO
Ácido cafeico	18.6 (55.8 mM)	24.8 (74.4 mM)	17.8 (53.4 mM)
Resveratrol	2.5 (7.5 mM)	41.4 (124.2 mM)	22.3 (66.9 mM)

Condiciones de reacción: 20% cosolvente en buffer de fosfatos 20 mM. Aceptor fenólico equivalente a 300 mM (54 g/l ácido cafeico, 68 g/l resveratrol) y 300 mM de β -ciclodextrina. 10U/ml CGT.

Como podemos observar en la tabla 13, en el caso de ácido cafeico los porcentajes de conversión muestran poca variación entre los tres medios empleados, lo cual sugiere que para la glucosilación de esta estructura fenólica la presencia del cosolvente en el medio de reacción no resulta determinante. En efecto, el ácido cafeico es un compuesto con mayor solubilidad en medio acuoso que el resveratrol (Tabla 1). Por su parte, las reacciones de resveratrol donde se emplearon cosolventes mostraron notables aumentos del porcentaje de conversión del aceptor fenólico respecto al medio buffer acuoso. Destaca la alta conversión en presencia del 20% de 2m2b correspondiente a un 41.4% (124mM) que es altamente superior a lo mostrado en reportes previos en los cuales empleando condiciones de 20% DMSO y CGT se obtuvieron hasta 50% de conversión de resveratrol equivalentes a 22 mM (Torres *et al.*, 2011). En el presente trabajo, se considera que el porcentaje de conversión de resveratrol se encuentra distribuido entre las diversas señales de producto detectadas por TCL y por HPLC. Asimismo, para el resveratrol resultó interesante la comparación entre los perfiles de producto detectados por HPLC para los tres medios de reacción (figura 21).

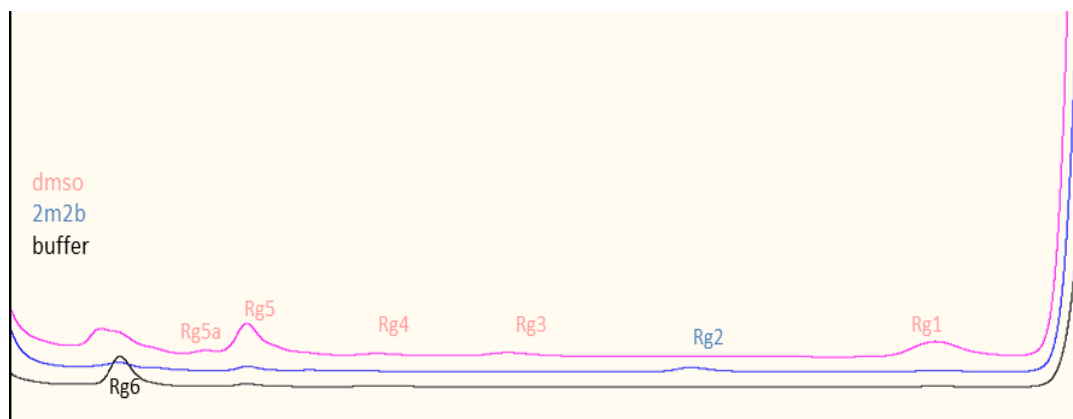


Figura 21. Cromatograma de 40 horas de reacción de resveratrol con CGT en tres medios de reacción: buffer fosfatos 20mM (línea negra); 20% 2M2B (2m2b, línea azul); 20% DMSO (dms0, línea rosa). Columna C_{18} fase inversa, UV 280nm.

A partir del perfil de productos de resveratrol en diversos medios de reacción, podemos apreciar que en buffer (fosfatos, 20 mM) se detecta la señal mayoritaria de un producto con alto grado de glicosilación (indicado como Rg6). Esta señal predominante de producto podría explicarse considerando que dicho compuesto presenta un alto grado de glucosilación (múltiples residuos de glucosa incorporados) y por lo tanto características hidrófilas que favorecen su acumulación en el medio acuoso respecto a otras especies con menor GG. En efecto, las especies con menor GG presentarían un carácter hidrofóbico propio de polifenoles cuya formación en las condiciones evaluadas no se ve favorecida (Mena *et al.* 2011). Por otro lado, en los medios conformados con cosolventes se aprecian señales de diversos glucósidos de resveratrol, asignados desde Rg1 a Rg5 que corresponderían a varios grados de glucosilación. Destaca que en el medio de reacción en presencia de DMSO ocurre la acumulación de un compuesto indicado como Rg5 que se supone corresponde al grado de glucosilación de 5 unidades de glucosa. Los diversos productos glucósidos obtenidos resultan interesantes para los objetivos de síntesis de glucósidos con grado de glucosilación superior a dos unidades de glucosa de diversas estructuras difenólicas.

Como se ha señalado, estos resultados apuntan a que para lograr la formación enzimática de diversos glucósidos de los polifenoles denominados de complejidad estructural “intermedia” (los cuales presentan una escasa solubilidad acuosa, 0.65 g/l para ácido cafeico y 0.03 g/l para resveratrol) resulta determinante el empleo de cosolventes. En efecto, en la medida que aumenta su complejidad estructural y en consecuencia disminuye su solubilidad, la presencia de cosolventes es determinante para la conversión de aglicona hacia productos poliglucósidos.

Un detalle que resulta importante señalar es que la composición del medio de reacción además de ser un factor determinante en el perfil de glucósidos que se acumulan (debido a las características de hidrofilia que adquieren los productos glucósidos) y en la conversión de sustrato, mostró generar efectos sobre el aumento de solubilidad de las agliconas. Al respecto, las condiciones de 20% cosolvente también fueron aplicadas para la aglicona flavonoide

quercetina la cual mostró muy escasa solubilidad aun en los medios de reacción con cosolvente. Este ensayo de síntesis con quercetina se realizó a la par con los aceptores fenólicos de estructura intermedia, pero por conveniencia en su presentación dichos resultados se muestran en sección 7.5.

7.4. Efecto del porcentaje de cosolventes en la solubilidad de la agliconas flavonoide y la estabilidad de enzima CGT

Como se ha señalado, para la poliglucosilación de los flavonoides se planteó la necesidad de realizar estudios de los efectos del porcentaje de cosolvente 2M2B y DMSO sobre dos parámetros determinantes en las reacciones: la solubilidad de las agliconas y la estabilidad de la enzima. Para el estudio de ambos parámetros se seleccionaron los cosolventes anteriormente evaluados en distintos porcentajes.

El estudio de solubilidad de flavonoides por efecto de cosolventes se realizó con agliconas quercetina y naringenina. Un contenido de 10% de 2M2B se exploró en base a referencias previas en laboratorio para trabajos de glicosilación (Mena, 2012). Sin embargo, en porcentajes mayores al 15% se formaban dos fases por lo cual contenidos mayores de este cosolvente no fueron consideradas y el cosolvente 2M2B se evaluó en hasta 15%. En cuanto al empleo de DMSO reportes previos (Auriol *et al.*, 2009) señalaron que su uso en hasta 35% contribuyó a la formación por vía enzimática de compuestos glucosilados de diversos fenoles incluidos flavonoides sin que hasta dicho porcentaje se generen fases en las mezclas evaluadas. Los resultados de solubilidad de los flavonoides seleccionados por efecto de cosolventes se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Solubilidad (g/l) de agliconas flavonoides en medios acuoso y con distintos contenidos de cosolventes

Aglicona flavonoide	Solubilidad (g/l)				
	Medio acuoso (amortiguador de fosfatos)	2M2B		DMSO	
		10%	15%	20%	35%
Quercetina	Insoluble	0.013	0.018	0.098	0.041
Naringenina	0.09	0.244	0.274	0.500	1.612

La solubilidad de ambas agliconas aumentó notablemente en presencia de los cosolventes con respecto al medio acuoso. De manera interesante, el mayor porcentaje del cosolvente no representa necesariamente la mayor solubilidad de los compuestos. Al respecto, se ha señalado que las propiedades intrínsecas de mezclas los cosolventes son determinantes para la solubilidad de solutos, señalando que parámetros como la viscosidad y energía libre particular de la mezcla pueden generar cambios significativos sobre la solubilidad de especies solutos (Cowie y Toporowski, 1961; MacGregor *et al.*, 1967). Al comparar entre los cosolventes

evaluados, los mayores valores de solubilidad de las agliconas se presentaron para el uso de DMSO en sus dos porcentajes.

Por su parte, para la evaluación de la estabilidad de la CGT ante cosolventes se evaluaron los mismos contenidos estudiados en la solubilidad de flavonoides. La estabilidad de la CGT se determinó en base a la retención de su actividad de ciclización en los medios con los cosolventes. Los resultados se presentan en la tabla 15.

Tabla 15. Actividad de ciclización y porcentaje de actividad retenida (%) por CGT en distintos contenidos de cosolventes respecto al medio acuoso

Medio acuoso (amortiguador de fosfatos)	2M2B		DMSO	
	10%	15%	20%	35%
<i>actividad de ciclización (unidades de β-ciclización/ml CGT)</i>				
133	28	n.d.	119	110
<i>% actividad retenida</i>				
100	21	n.d.	89	82

n.d.= no determinado

Respecto a la determinación de actividad de ciclización de CGT, este parámetro presentó problemas para ser determinado en el medio con 15% de 2M2B ya que en dicho porcentaje del cosolvente se detectó un efecto de disociación del complejo formado por sustrato indicador fenolftaleína y la β -CD, generando lecturas falsas de actividad de CGT ciclodextrina. Para el resto de los medios evaluados la determinación de actividad empleada mostró ser eficaz respecto a sus controles. Los resultados mostraron que con 20 y 35% de DMSO es posible retención de actividad con hasta 89 y 82%, respectivamente. Estos resultados, apuntan a que DMSO es un cosolvente adecuado para favorecer la solubilidad de las agliconas flavonoide evaluadas y retener la actividad de la enzima CGT. Por lo cual se decidió evaluar este cosolvente al 35% para poliglucosilar quercetina y naringenina.

7.5. Poliglucosilación de flavonoides mediante CGT

Como se mencionó anteriormente, las condiciones de 20% cosolvente, con las cuales se evaluaron los aceptores fenólicos de complejidad intermedia ácido cafeico y resveratrol, también fueron aplicadas para el aceptor quercetina, pero este último presentó muy escasa solubilidad en dichas condiciones. A pesar ello, los resultados con la aglicona quercetina mostraron un comportamiento similar al observado para los aceptores de complejidad intermedia: a mayor complejidad estructural la presencia de cosolventes es determinante para la conversión de aglicona hacia productos poliglucósidos, resultados mostrados en la figura 22.

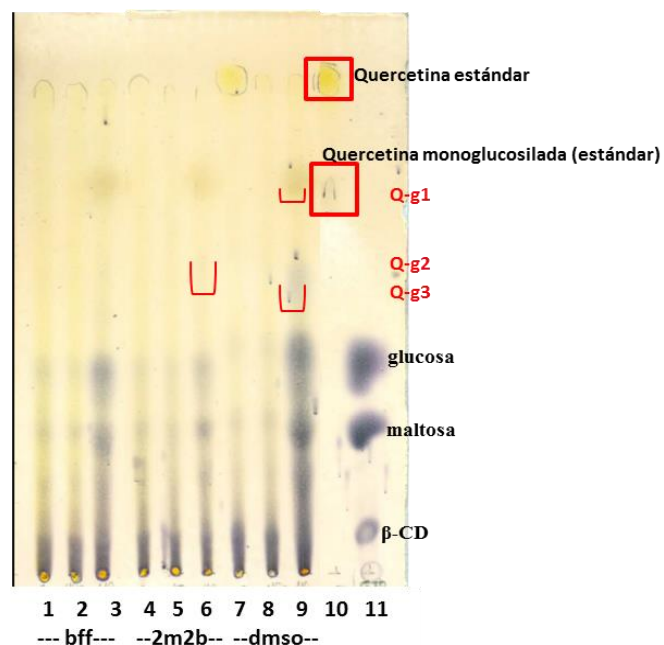


Figura 22. Análisis de TLC (α -naftol) para reacciones de quercetina con CGT en buffer (fosfatos, 20 mM) o 20% cosolvente (2M2B o DMSO). Condiciones de reacción: quercetina equivalentes 301 mM (90 g/l) y 300 mM de β -ciclodextrina. 10 U/ml CGT. Carriles 1, 2 y 3 reacciones en buffer (bff): 0, 40h incubación sin CGT y 40h de reacción con CGT; 4, 5 y 6 reacciones en 2M2B (2m2b): 0, 40h incubación sin CGT y 40h de reacción con CGT; 7, 8 y 9 reacciones en DMSO (dms): 0, 40h incubación sin CGT y 40h de reacción con CGT. Carril 10: estándares Quercetina y monoglucósido de quercetina. Carril 11: estándares glucosa, maltosa, β -ciclodextrina (β -CD).

Un control de incubación sin enzima se realizó para las tres condiciones de medio de reacción para descartar la formación de señales de falsos productos glucósidos por efectos la incubación de quercetina en los medios de reacción con buffer, 2M2B o DMSO (carriles 2, 5 y 8) a las 40 horas. Los resultados de TLC señalan que para quercetina no se mostraron productos en el medio acuoso (carril 3 en la figura 22). Por otra parte, si fue posible detectar un producto aparentemente di glucósido (carril 6 en la figura 22, indicado como Q-g2) empleando cosolvente 2M2B; mientras que en el medio con DMSO se detectaron hasta mono- y triglucósidos (Q-g1 y Q-g3, carril 9). De manera complementaria, el análisis de HPLC mostró conversión del aceptor fenólico sólo en los ensayos con cosolventes. Esto resulta similar al caso aceptor de complejidad intermedia resveratrol en el cual ocurrió mayor conversión en presencia de cosolvente. Es importante señalar que la quercetina es estructuralmente más compleja que resveratrol y que la conversión de quercetina en 20% de DMSO destacó con un valor de 14.8% (44.4mM), que se espera corresponda a las dos señales glucósidos ($GG \leq 2$) detectadas.

A partir de los experimentos anteriores realizados con ácido cafeico, resveratrol y quercetina (compuestos con solubilidades menores a 300 mM tanto en medios acuosos y 20% de cosolvente), y considerando el estudio de retención de actividad para CGT, se estableció que en la presencia de 35% de DMSO como cosolvente, es posible favorecer la poliglucosilación de

flavonoides mediante la CGT. A diferencia de las reacciones hasta ahora descritas, las reacciones de glucosilación realizadas a continuación con los aceptores flavonoides quercetina y naringenina se realizaron en una relación de sustratos 132 mM donador : 300 mM aceptor. Estos valores de concentración fueron establecidos en la medida que en el medio de reacción con 35% de DMSO, los flavonoides a 300mM y el sustrato donador β -CD a 132mM alcanzaba valores máximos de solubilidad. De manera similar, el contenido de 35% de DMSO redujo el volumen disponible para otros componentes del medio por lo cual en estos ensayos fueron empleadas 8 U/ml que corresponden al máximo volumen disponible para el aforo final. En el análisis por TLC de estas reacciones después de 40 horas, se detectaron 5 señales de productos de glucosilación tanto para quercetina y naringenina (Figura 23).

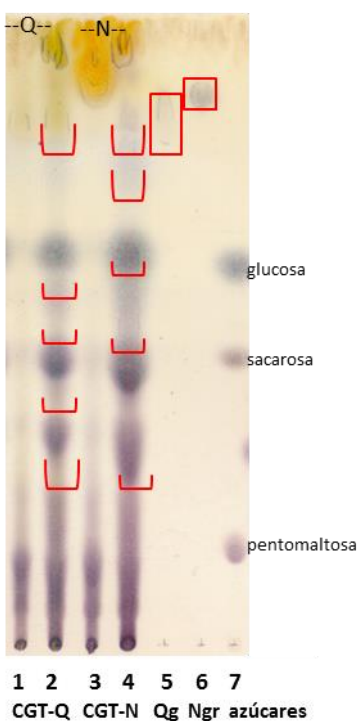


Figura 23. TLC de transferencia sobre quercetina (Q) y naringenina (N) empleando CGT en 35% DMSO. Revelado con α -naftol. Aceptor equivalente a 301mM quercetina o 298mM naringenina, 132mM β -ciclodextrina. 8 U/ml CGT. Carriles 1 y 3: tiempos iniciales (0 horas); carriles 2 y 4: tiempo final (40 horas); carril 5: estándares quercetina monoglucosilada (Qg); carril 6: estándar naringenina diglicosilada (naringina, Ngr); carril 7: estándares glucosa, sacarosa, pentomaltosa.

Al comparar los valores de Rf de los productos obtenidos con los valores de Rf de estándares de los flavonoides glicosilados: monoglucósido de quercetina con $R_f=0.82$ ubicado en el carril 5 y con el estándar diglicósido serial de naringenina (naringenina-7-(glucosil)1-2-(ramnosa)) que se conoce como naringina, con un $R_f =0.87$ en el carril 6, se observa que varios de los productos detectados (subrayados en la figura 23) corresponden a estos valores de Rf. Esto permite pensar que en ambas reacciones la CGT incorpora al menos 2 residuos de glucosa a dichos

flavonoides y que además se obtienen productos de mayor grado de glucosilación. De manera similar a las reacciones realizadas con los diferentes fenoles simples y complejos hasta ahora evaluados, las señales de TLC de los productos obtenidos en las reacciones con los flavonoides muestran señales de intensidad aparentemente similar.

En el análisis realizado por HPLC de las reacciones con los flavonoides se confirmó la presencia de al menos 7 productos de glucosilación. En donde todos los picos identificados como productos presentan señal de absorción al UV típica de los anillos bencénicos (280nm) además de tiempos de retención en fase reversa (C₁₈) más cortos que la aglicona correspondiente. Es decir, se trata de compuestos que integran en su molécula anillos bencénicos y azúcares. La detección de productos glucósidos para el flavonoide naringenina se muestran en la Figura 24.

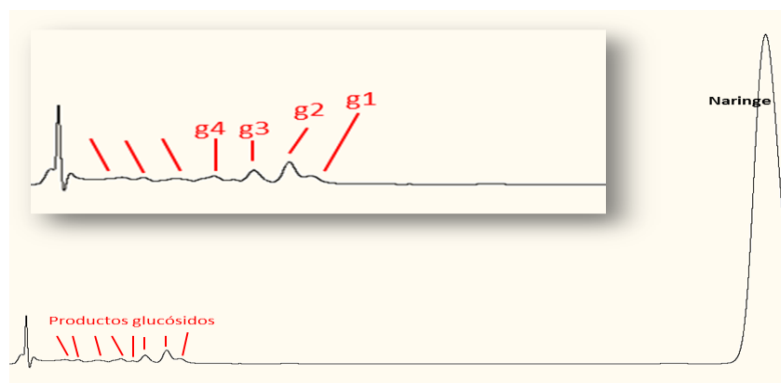


Figura 24. Cromatograma de reacción de Naringenina (Naringe) con CGT, ampliado en las señales de los productos glucósidos. Condiciones de reacción: 300 mM aglicona; 132 mM β -ciclodextrina; 8 U/ml CGT, 35% DMSO. Productos mayoritarios indicados como g1-g4. Columna C₁₈, fase reversa, UV_{280nm}.

De manera similar al perfil de productos observado en las reacciones con dihidroxifenoles y el polifenol resveratrol, la distribución de áreas para Naringenina muestra una acumulación preferencial de los productos con grado de glucosilación ≤ 4 señalados como g1 a g4. Bajo esta perspectiva, se confirma que la CGT muestra un mecanismo de incorporación de residuos de glucosa similar en todos los compuestos fenólicos evaluados en este trabajo. En otras palabras, la CGT incorpora residuos de glucosa de manera paralela y/o por bloque y no de manera secuencial como lo haría la DXS.

En términos de la conversión de aceptores flavonoides hacia productos glucosilados, las conversiones alcanzadas se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Conversiones de aceptor flavonoide para reacciones con CGT

Aceptor	Conversión de aceptor
Quercetina	26%
Naringenina	15%

Condiciones de reacción: 35% cosolvente DMSO en buffer de fosfatos (20 mM), 301 mM aceptor quercetina o 298 mM naringenina, 132 mM β -ciclodextrina, 8 U/ml CGT.

Las conversiones de flavonoides quercetina y naringenina fueron de 26 y 15%, respectivamente. Estos valores resultan alentadores cuando se comparan con conversiones alcanzados en reportes anteriores para la glucosilación con CGT para aceptores flavonoide. Reportes de [Kometani *et al.* \(1996\)](#) señalaron la obtención de un tri glicósido sobre aceptor naringina con rendimientos de 0.95 mg (9.5%, p/p). Por otra parte, [Aramsangtienchai *et al.* \(2011\)](#) señalaron la obtención de hasta 5 productos poliglucosilados para epicatequina siendo cuatro productos los principales. Estos cuatro productos presentaron un grado de glucosilación máximo de tres residuos de glucosa y en conjunto sumaron conversiones cercanas al 18% (3.1 mM). Estos reportes corresponden a síntesis desarrolladas en medios conformados en general por medios acuosos, lo cual limitó el empleo de concentraciones mayores de aceptores flavonoides o derivados glucósido. En este sentido, resulta interesante señalar el empleo de cosolventes en el medio de reacción que permitieron aumentar la productividad de las reacciones enzimáticas planteadas.

Al final de la parte experimental y considerando los resultados obtenidos en todas las reacciones de glucosilación aquí realizadas, es importante señalar que CGT resultó mejor enzima que la DXS para la obtención de moléculas fenólicas poliglucosiladas. En efecto, la CGT es una enzima capaz de poliglucosilar aceptores de tipo dihidroxifenol, incluyendo desde estructuras “simples” hasta estructuras tipo polifenol. En la síntesis de poliglucósidos de estructuras fenólicas más complejas la enzima requiere la presencia de cosolventes orgánicos para facilitar la solubilidad de la aglicona hidrofóbica, además esta enzima fue capaz de tolerar dichas condiciones (35% DMSO) sin una pérdida considerable de sus capacidades catalíticas (alrededor de 82% de actividad residual).

8. CONCLUSIONES

El objetivo principal de síntesis enzimática de productos poliglucosilados de agliconas fenólicas se cumplió de manera efectiva utilizando la enzima CGT como biocatalizador.

La evaluación de la capacidad de las enzimas DXS y CGT para poliglucosilar distintas moléculas dihidroxifenoles, así como aceptores monoglucósidos (arbutina y salicina) mostró que el mecanismo particular de cada enzima para transglucosilar fueron determinantes en el tipo de productos sintetizados.

La CGT reconoció como aceptor a moléculas tipo agliconas y monoglucósidos a los cuales transfirió al menos un residuo de glucosa desde el donador β -CD para generar hasta 8 productos desde mono- a poliglucosilados.

La DXS sintetizó exclusivamente monoglucósidos para los aceptores agliconas. Estos productos monoglucosilados difícilmente fueron reconocidos como aceptores por la DXS para una segunda transferencia.

La conversión de los aceptores alcanzaron conversiones de hasta 41% para los dihidroxibenzenos, de 25% para el ácido cafeico, de 41% para el resveratrol y de hasta 26% para los flavonoides, todo esto utilizando a la enzima CGT como biocatalizador.

La DXS generó conversiones máximas de aceptor dihidroxifenol de 1.5% que corresponden exclusivamente a productos monoglucósidos.

El mecanismo particular de transferencia de CGT mostró una transferencia de residuos de glucosa por bloques de longitud variable formando de manera paralela los diversos productos mono- y poliglucosilados.

Los eventos de mono- o poliglucosilación desarrollados por CGT se realizaron en eventos simultáneos desde tiempos iniciales y la actividad de desproporción contribuyó en menor razón para definir los perfiles de productos.

Para la glucosilación de moléculas de tipo resveratrol y flavonoides el uso de cosolventes resultó determinante para que la reacción se lleve a cabo.

9. PERSPECTIVAS

- Determinar la regioselectividad de CGT en la síntesis de compuestos poliglucósidos mediante la elucidación estructural de los productos generados por CGT, mediante el empleo de técnicas de espectrometría de masa (EM) y resonancia magnética nuclear (RMN).
- Caracterización de propiedades de solubilidad acuosa y capacidad antioxidante (método DPPH) de productos poliglucosilados (grado de glucosilación > 2) respecto a los derivados aglicona y monoglucosilados.
- Realizar estudios de biodisponibilidad de los glucósidos sintetizados considerando que la ingestión de moléculas fenólicas poliglucosiladas genere un incremento de tiempo de vida en torrente sanguíneo respecto a los derivados aglicona.
- Mediante colaboraciones interdisciplinarias, realizar catálogos de los derivados poliglucósidos fenólicos que permitan relacionar sus características estructurales con las diversas propiedades fisicoquímicas, actividades biológicas o aplicaciones potenciales de estos derivados.

10. ANEXOS

Anexo 1. Nomenclatura indicativa de tipo de enlace glicosídicos en los compuestos reportados de las tablas 3 y 4 (sección 3.5)

AGLICONA FENÓLICA	GLUCÓSIDO		REFERENCIA
	# residuo(s) glucosil	Nomenclatura con tipo de enlaces	
TABLA 3			
Hidroquinona (HQ)	0	n.a.	Mathew y Adlercreutz, 2013
	1	HQ- α -glc	
	0	n.a.	Kaminaga <i>et al.</i> 2003
	1	no mostrado	
Ácido cafeico (AC)	0	n.a.	Nam <i>et al.</i> 2017
	1	AC-3- α -glc	
	0	n.a.	Nishimura <i>et al.</i> 1995
	1	AC-3- α -glc	
	1	AC-4- α -glc	
Resveratrol (RV)	0	n.a.	DeWinter <i>et al.</i> 2015
	1	RV-3- α -glc	
	2	RV-3- α -[(glc)4-1(β glc)]	
	3	RV-3- α -[(glc)4-1(β glc)4-1(β glc)]	
TABLA 4			
Kaempferol (KF)	0	n.a.	Choung <i>et al.</i> 2017
	1	KF-3- β -glc	
	2	KF-3- β -[(glc)4-1(α -glc)]	
Luteolina (LT)	0	n.a.	Kaminaga <i>et al.</i> 2003
	1	LT-7-x-glc	
	2	LT-3',7'-x-di-glc	
Galato de Epigallocatequina (GEGC)	0	n.a.	Moon <i>et al.</i> 2006
	1	GEGC -7- α -glc	
	1	GEGC -4'- α -glc	
	2	GEGC -7,4'- α -di-glc	
Quercetina (Q)	0	n.a.	Moon <i>et al.</i> 2007
	1	Q-4'- α -glc	
Curcumina (CC)	0	n.a.	Kaminaga <i>et al.</i> 2003
	1	CC-4'- β -glc	
	2	CC-4'- β -[(glc)6-1(β -glc)]	
	2	CC-4', 4''- β -di-glc	
	3	CC-4' β -[(glc)6-1(β -glc)],-4''- β -glc	
4	CC-4',4''-di- β -[(glc)6-1(β -glc)]		

Anexo 2. Metodología para calcular el Rf de los productos separados en TLC (sección 6.5)

La determinación de Rf de las diversas señales en TLC se realizó de la siguiente manera:

1. Medir la distancia entre el centro de la señal separada (n) y el punto de aplicación (dn).
2. Medir la distancia entre frente del solvente y el punto de aplicación (ds).
3. Calcular el valor de Rf de cada señal separada de la siguiente manera: (dn/ds).

Anexo 3. Cromatograma de cinética de reacción de Hidroquinona con CGT (sección 7.3)

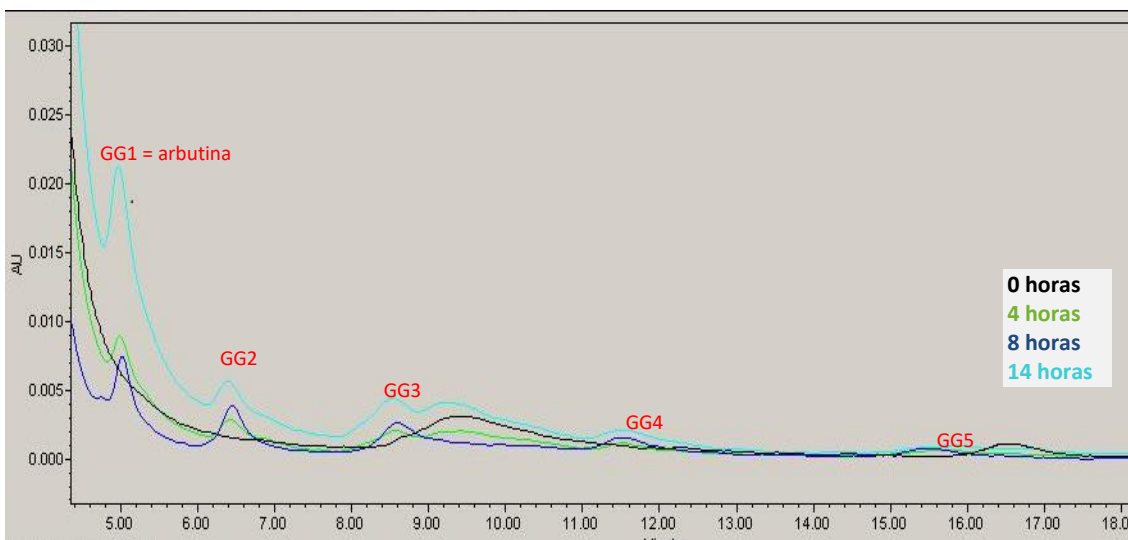
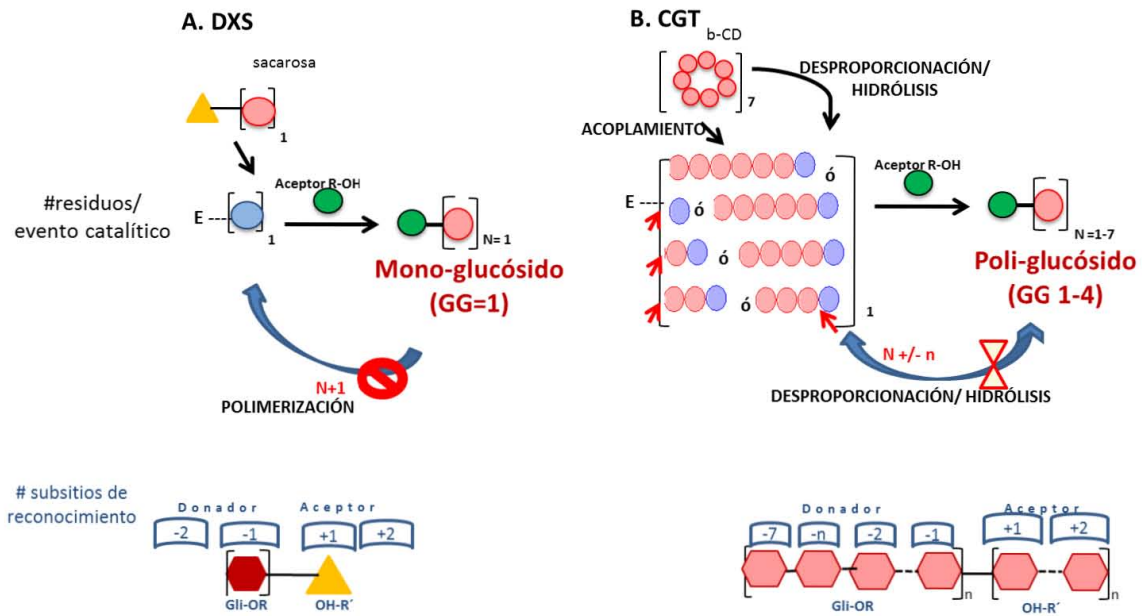


Figura A3. Cinética de reacción para aceptor hidroquinona con CGT. UV 280nm

Anexo 4. Esquema comparativo del tipo de residuo glicosilo transferido por enzimas DXS o CGT, mostrando sus actividades complementarias que determinan el grado de glucosilación de fenoles



11. BIBLIOGRAFIA

- Aerts, D., Verhaeghe, T. F., Roman, B. I., Stevens, C. V., Desmet, T. y Soetaert, W. (2011). Transglucosylation potential of six sucrose phosphorylases toward different classes of acceptors. *Carbohydrate research*, 346(13), 1860-1867.
- Amri, A., Chaumeil, J. C., Sfar, S. y Charrueau, C. (2012). Administration of resveratrol: what formulation solutions to bioavailability limitations? *Journal of Controlled Release*, 158(2), 182-193.
- Aramsangtienchai, P., Chavasiri, W., Ito, K. y Pongsawasdi, P. (2011). Synthesis of epicatechin glucosides by a β -cyclodextrin glycosyltransferase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 73(1), 27-34.
- Auriol, D., Nalin, R., Robe, P., y Lefevre, F. (2009). *U.S. Patent Application No. 12/304,212*.
- Bertrand, A., Morel, S., Lefoulon, F., Rolland, Y., Monsan, P. y Remaud-Simeon, M. (2006). *Leuconostoc mesenteroides* glucansucrase synthesis of flavonoid glucosides by acceptor reactions in aqueous-organic solvents. *Carbohydrate research*, 341(7), 855-863.
- Brooker, B. E. (1977). Ultrastructural surface changes associated with dextran synthesis by *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of bacteriology*, 131(1), 288-292.
- BROWN, E. J., Khodr, H., HIDER, C. R. y RICE-EVANS, C. A. (1998). Structural dependence of flavonoid interactions with Cu^{2+} ions: implications for their antioxidant properties. *Biochemical Journal*, 330(3), 1173-1178.
- Castillo, E. y López-Munguía, A. (2004). Synthesis of levan in water-miscible organic solvents. *Journal of biotechnology*, 114(1), 209-217.
- Choung, W. J., Hwang, S. H., Ko, D. S., Kim, S. B., Kim, S. H., Jeon, S. H., Choi H. D., Lim S. S. y Shim J-H. (2017). Enzymatic Synthesis of a Novel Kaempferol-3-O- β -d-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-O- α -d-glucopyranoside Using Cyclodextrin Glucanotransferase and Its Inhibitory Effects on Aldose Reductase, Inflammation, and Oxidative Stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(13), 2760-2767.
- Cowie, J. M. G. y Toporowski, P. M. (1961). Association in the binary liquid system dimethyl sulphoxide-water. *Canadian Journal of Chemistry*, 39(11), 2240-2243.
- Cren-Olivé, C. y Rolando, C. (2003). Chapter 5. Synthesis, Identification, quantification, and chemical reactivity of methylated flavan-3-ols. 123-144p [En](#) Rice-Evans, C y Parker, L. 2003. *Flavonoids in health and disease*. Second Edition Marcel Dekker, USA: 467 pp.
- Daines, A. M., Maltman, B. A., y Flitsch, S. L. (2004). Synthesis and modifications of carbohydrates, using biotransformations. *Current opinion in chemical biology*, 8(2), 106-113.
- de Roode B. M. The integrated enzymatic production and downstream processing of glucosides. Tesis de doctorado. Universidad de Wageningen. 2001.
- de Roode B. M., Zuilhof H., Franssen R., van der Padt A. y de Groot, A. (2000). Why are some alcohols easy to glucosylate with β -glucosidase while others are not? A computational approach. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (11), 2217-2224.
- de Roode, B. M., Franssen, M. C., Padt, A. V. D. y Boom, R. M. (2003). Perspectives for the industrial enzymatic production of glycosides. *Biotechnology progress*, 19(5), 1391-1402.
- De Winter, K., Dewitte, G., Dirks-Hofmeister, M. E., De Laet, S., Pelantová, H., Kren, V. y Desmet, T. (2015). Enzymatic glycosylation of phenolic antioxidants: phosphorylase-

- mediated synthesis and characterization. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(46), 10131-10139.
- Del Pozo, B. M. 2011. Descifrando las claves químicas que explican el aroma del vino; Ciencia y Tecnología, consultado el 30 junio 2017 en: http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/claves_quimicas_aroma_cienc1010.htm
- Dembitsky, V. M. (2005). Astonishing diversity of natural surfactants: 5. Biologically active glycosides of aromatic metabolites. *Lipids*, 40(9), 869-900.
- Dewick, P. M. (2002). Medicinal natural products: a biosynthetic approach. John Wiley & Sons. Ltd, pp 35-252.
- Dols, M., Remaud-Simeon, M. y Monsan, P. F. (1997). Dextranucrase production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. Comparison with *L. mesenteroides* NRRL B-512F. *Enzyme and microbial technology*, 20(7), 523-530.
- Du, Y., Wei, G. y Linhardt, R. J. (2004). Total synthesis of quercetin 3-sophorotrioside. *The Journal of organic chemistry*, 69(6), 2206-2209.
- Fischer, E. (1893). Ueber die glucoside der alkohole. *Berichte der Deutschen chemischen Gesellschaft*, 26: 2400-2412.
- Franssen, M. C., Alessandrini, L. y Terraneo, G. (2005). Biocatalytic production of flavors and fragrances. *Pure and applied chemistry*, 77(1), 273-279.
- Galeote, M. A. (1999). Modificación química y estabilización de glicosiltransferasas: ciclodextrín glicosiltransferasa y dextranucrase (Tesis de Doctorado, Universidad Complutense de Madrid).
- Goedl, C., Sawangwan, T., Mueller, M., Schwarz, A. y Nidetzky, B. (2008). A High-Yielding Biocatalytic Process for the Production of 2-O-(α -D-glucopyranosyl)-sn-glycerol, a Natural Osmolyte and Useful Moisturizing Ingredient. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(52), 10086-10089.
- Gómez de Segura, A., Alcalde, M., Bernabé, M., Ballesteros, A. y Plou, F. J. (2006). Synthesis of methyl α -D-glucooligosaccharides by entrapped dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-1299. *Journal of biotechnology*, 124(2), 439-445.
- González R.J. (2014). Síntesis enzimática de glicósidos de fenilpropanoides con actividad antioxidante. Tesis de maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM.
- González-Ríos, J., Pedraza-Chaverri, J., Medina-Campos, O., Reina, M., Romero, Y., Martínez, A., López-Munguía, A. y Castillo, E. (2016). The influence of the carbohydrate anomeric linkage on the free radical scavenging activity of enzymatically-synthesized phenolic glycosides. *RSC Advances*, 6(51), 45452-45461.
- Gudimochi, R. K., Towns, A., Varalwar, S. y Nidetzky, B. (2016). Enhanced Synthesis of 2-O- α -D-Glucopyranosyl-l-ascorbic Acid from α -Cyclodextrin by a Highly Disproportionating CGTase. *ACS Catalysis*, 6(3), 1606-1615.
- Harborne, J. B., y Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504.
- Harris, C. S., Mo, F., Migahed, L., Chepelev, L., Haddad, P. S., Wright, J. S., Willmore W. G. Arnason J. T. y Bennett, S. A. (2007). Plant phenolics regulate neoplastic cell growth and survival: a quantitative structure–activity and biochemical analysis This article is one of a selection of papers published in this special issue (part 2 of 2) on the Safety and Efficacy

- of Natural Health Products. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 85(11), 1124-1138.
- Jamuna, R., Saswathi, N., Sheela, R. y Ramakrishna, S. V. (1993). Synthesis of cyclodextrin glucosyl transferase by *Bacillus cereus* for the production of cyclodextrins. *Applied biochemistry and biotechnology*, 43(3), 163-176.
- Kaminaga, Y., Nagatsu, A., Akiyama, T., Sugimoto, N., Yamazaki, T., Maitani, T. y Mizukami, H. (2003). Production of unnatural glucosides of curcumin with drastically enhanced water solubility by cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Febs Letters*, 555(2), 311-316.
- Kelly, R. M., Dijkhuizen, L. y Leemhuis, H. (2009). The evolution of cyclodextrin glucanotransferase product specificity. *Applied microbiology and biotechnology*, 84(1), 119-133.
- Kim, H., Kong, H., Choi, B., Yang, Y., Kim, Y., Lim, M. J., Neckers L. y Jung, Y. (2005). Metabolic and pharmacological properties of rutin, a dietary quercetin glycoside, for treatment of inflammatory bowel disease. *Pharmaceutical research*, 22(9), 1499-1509.
- Kitahata, S. (2000). Studies on the development of functional oligosaccharides using amylases and related enzymes. *Journal of Applied Glycoscience*, 47(1), 87-97.
- Kobayashi, M. y Matsuda, K. (1974). The dextranucrase isoenzymes of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 370(2), 441-449.
- Kometani T., Nishimura T., Nakae T., Takki, H. y Okada S. (1996). Synthesis of Neohesperidin glycosides and Naringin Glycosides by Cyclodextrin glucano-transferase from an alkalophilic *Bacillus* species. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 60: 645-649.
- Kren V. (2008). Glycoside vs aglycon: The role of glycosidic residues in biological activity. En: Glycoscience. Chemistry and chemical biology (eds Fraser-Reid, B., Tatsuta, K., Thiem, J.) Springer-Verlag, New York. pp: 2589-2644.
- Kren, V., y Řezanka, T. (2008). Sweet antibiotics—the role of glycosidic residues in antibiotic and antitumor activity and their randomization. *FEMS microbiology reviews*, 32(5), 858-889.
- Kuhnert, N. (2013). Polyphenole: Vielseitige Pflanzeninhaltsstoffe. *Chemie in unserer Zeit*, 47(2), 80-91.
- Maestro-Durán, R. y Borja-Padilla, R. (1993). Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. *Grasas y Aceites*.
- Lairson, L. L., Henrissat, B., Davies, G. J. y Withers, S. G. (2008). Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.*, 77, 521-555.
- Lappan, R. E. y Fogler, H. S. (1994). *Leuconostoc mesenteroides* growth kinetics with application to bacterial profile modification. *Biotechnology and bioengineering*, 43(9), 865-873.
- Lawson, C. L., van Montfort, R., Strokopytov, B., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H., de Vries, G. E., Penninga, D., Dijkhuizen, L. y Dijkstra, B. W. (1994). Nucleotide sequence and X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 in a maltose-dependent crystal form. *Journal of molecular biology*, 236(2), 590-600.

- Leemhuis, H., Pijning, T., Dobruchowska, J. M., van Leeuwen, S. S., Kralj, S., Dijkstra, B. W. y Dijkhuizen, L. (2013). Glucansucrases: three-dimensional structures, reactions, mechanism, α -glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications. *Journal of biotechnology*, 163(2), 250-272.
- Liu, R. H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of nutrition*, 134(12), 3479S-3485S.
- MacGregor, W. S. (1967). The chemical and physical properties of DMSO. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 141(1), 3-12.
- Mackenzie, L. F., Wang, Q., Warren, R. A. J. y Withers, S. G. (1998). Glycosynthases: mutant glycosidases for oligosaccharide synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 120(22), 5583-5584.
- Maestro-Durán, R. y Borja-Padilla, R. (1993). Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. *Grasas y Aceites*.
- Malsagov, M., Tugan, T., Timur's. Varuzhan, H.A. (2007). US Patent Application Publication, US2007/0082102 A1.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. y Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727-747.
- Martínez-Valverde, I., Periago, M. J. y Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 50(1), 5-18.
- Mathew, S. y Adlercreutz, P. (2013). Regioselective glycosylation of hydroquinone to α -arbutin by cyclodextrin glucanotransferase from *Thermoanaerobacter sp.* *Biochemical engineering journal*, 79, 187-193.
- Mena, A. (2012). Glicosilación enzimática de fenoles mediante el uso de fructosiltransferasas bacterianas. Tesis de doctorado. Instituto de Biotecnología, UNAM.
- Mena-Arizmendi, A., Alderete, J., Águila, S., Marty, A., Miranda-Molina, A., López-Munguía, A. y Castillo, E. (2011). Enzymatic fructosylation of aromatic and aliphatic alcohols by *Bacillus subtilis* levansucrase: Reactivity of acceptors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 70(1), 41-48.
- Meulenbeld, G. H. y Hartmans, S. (2000). Transglycosylation by *Streptococcus mutans* GS-5 glucosyltransferase-D: Acceptor specificity and engineering of reaction conditions. *Biotechnology and bioengineering*, 70(4), 363-369.
- Meulenbeld, G. H., Zuilhof, H., van Veldhuizen, A., van den Heuvel, R. H., y Hartmans, S. (1999). Enhanced (+)-catechin transglucosylating activity of *Streptococcus mutans* GS-5 glucosyltransferase-D due to fructose removal. *Applied and environmental microbiology*, 65(9), 4141-4147.
- Michael, A. (1879). On the synthesis of helicin and phenolglucoside. *American Chemical Journal* 1: 305-312
- Middleton, E., Kandaswami, C., y Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 52(4), 673-751.
- Miranda, M. A. (2010). Síntesis enzimática estereoselectiva de derivados acilados y/o glicosilados de aldioles e inositoles selectos con probable actividad biológica. Tesis de doctorado, Facultad de Ciencias y Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, UAEM.

- Mishra, B., Priyadarsini, K. I., Kumar, M. S., Unnikrishnan, M. K. y Mohan, H. (2003). Effect of O-glycosilation on the antioxidant activity and free radical reactions of a plant flavonoid, chrysoeriol. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 11(13), 2677-2685.
- Monthieu, C., Guibert, A., Taravel, F. R., Nardin, R. y Combes, D. (2003). Purification and characterisation of polyglucosyl-fructosides produced by means of cyclodextrin glucosyl transferase. *Biocatalysis and Biotransformation*, 21(1), 7-15.
- Moon, Y. H., Kim, G., Lee, J. H., Jin, X. J., Kim, D. W. y Kim, D. (2006). Enzymatic synthesis and characterization of novel epigallocatechin gallate glucosides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 40(1), 1-7.
- Moon, Y. H., Lee, J. H., Jhon, D. Y., Jun, W. J., Kang, S. S., Sim, J., Choi, H., Moon, J.H. y Kim, D. (2007). Synthesis and characterization of novel quercetin- α -D-glucopyranosides using glucansucrase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Enzyme and microbial technology*, 40(5), 1124-1129.
- Mydock, L. K., y Demchenko, A. V. (2010). Mechanism of chemical O-glycosylation: from early studies to recent discoveries. *Organic & biomolecular chemistry*, 8(3), 497-510.
- Nakamura, A., Haga, K. y Yamane, K. (1993). Three histidine residues in the active center of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus sp.* 1011: effects of the replacement on pH dependence and transition-state stabilization. *Biochemistry*, 32(26), 6624-6631.
- Nakamura, A., Haga, K. y Yamane, K. (1994a). The transglycosylation reaction of cyclodextrin glucanotransferase is operated by a Ping-Pong mechanism. *FEBS letters*, 337(1), 66-70.
- Nakamura, A., Haga, K. y Yamane, K. (1994b). Four aromatic residues in the active center of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus sp.* 1011: effects of replacements on substrate binding and cyclization characteristics. *Biochemistry*, 33(33), 9929-9936.
- Nam, S. H., Kim, Y. M., Walsh, M. K., Wee, Y. J., Yang, K. Y., Ko, J. A., Han, S., Nguyen, T. T. H., Kim, J. Y. y Kim, D. (2017). Synthesis and Functional Characterization of Caffeic Acid Glucoside Using *Leuconostoc mesenteroides* Dextranucrase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(13), 2743-2750.
- Nishimura, T., Kometani, T., Takii, H., Terada, Y. y Okada, S. (1995). Glucosylation of caffeic acid with *Bacillus subtilis* X-23 α -amylase and a description of the glucosides. *Journal of fermentation and bioengineering*, 80(1), 18-23.
- Olivares-Illana, V., López-Munguía, A. y Olvera, C. (2003). Molecular characterization of inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: a fructosyltransferase within a glucosyltransferase. *Journal of bacteriology*, 185(12), 3606-3612.
- Ortiz-Soto, M. E., Olivares-Illana, V. y López-Munguía, A. (2004). Biochemical properties of inulosucrase from *Leuconostoc citreum* CW28 used for inulin synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation*, 22(4), 275-281.
- Otero, C., Cruzado, C. y Ballesteros, A. (1991). Use of cyclodextrins in enzymology to enhance the solubility of hydrophobic compounds in water. *Applied biochemistry and biotechnology*, 27(2), 185-194.
- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63(7), 1035-1042.
- Plou, F. J., Gómez de Segura, A. y Ballesteros, A. Application of glycosidases and transglycosidases in the synthesis of oligosaccharides. *En Industrial Enzymes* (Ed. Polaina J, MacCabe A. P.), Springer, Valencia, España. 2007. 141-157.

- Prodanović, R., Milosavić, N., Sladić, D., Zlatović, M., Božić, B., Veličković, T. Ć. y Vujčić, Z. (2005). Transglucosylation of hydroquinone catalysed by α -glucosidase from baker's yeast. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 35(4), 142-146.
- Quirasco, B. M. 1994. Producción y caracterización de un biocatalizador con actividad glicosiltransferasa. Tesis de maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM.
- Quirasco, B. M. 2000. Estudios de expresión de la dextranasa producida por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. Tesis de doctorado. Facultad de Química, UNAM.
- Renirie, R., Pukin, A., van Lagen, B. y Franssen, M. C. (2010). Regio- and stereoselective glucosylation of diols by sucrose phosphorylase using sucrose or glucose 1-phosphate as glucosyl donor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 67(3), 219-224.
- Richard, G., Morel, S., Willemot, R. M., Monsan, P. y Remaud-Simeon, M. (2003). Glucosylation of α -butyl- and α -octyl-D-glucopyranosides by dextranase and alternansucrase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Carbohydrate research*, 338(9), 855-864.
- Sánchez G. M. N. 1996. Estudios cinéticos de las reacciones de aceptor catalizadas por la glicosiltransferasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1299. Tesis de maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM.
- santacruzbiotechnology; no. CAS 331-39-5, ficha técnica: <https://www.scbt.com/scbt/es/product/caffeic-acid-331-39-5?requestFrom=search>, consulta: 25 mayo 2017.
- Schmid, A., Dordick, J., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., Witholt, B. (2001). Industrial biocatalysis today and tomorrow, *Nature* 409: 258.
- Seibel, J., Moraru, R., Götze, S., Buchholz, K., Na'amnieh, S., Pawlowski, A. y Hecht, H. J. (2006). Synthesis of sucrose analogues and the mechanism of action of *Bacillus subtilis* fructosyltransferase (levansucrase). *Carbohydrate research*, 341(14), 2335-2349.
- Seo, E. S., Lee, J. H., Park, J. Y., Kim, D., Han, H. J. y Robyt, J. F. (2005). Enzymatic synthesis and anti-coagulant effect of salicin analogs by using the *Leuconostoc mesenteroides* glucansucrase acceptor reaction. *Journal of biotechnology*, 117(1), 31-38.
- Shaikh, F. A. y Withers, S. G. (2008). Teaching old enzymes new tricks: engineering and evolution of glycosidases and glycosyl transferases for improved glycoside synthesis This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled CSBMCB—Systems and Chemical Biology, and has undergone the Journal's usual peer review process. *Biochemistry and Cell Biology*, 86(2), 169-177.
- Shibuya, T., Mandai, T., Kubota, M., Fukuda, S., Kurimoto, M. y Tsujisaka, Y. (2004). Production of turanose by cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of Applied Glycoscience*, 51(3), 223-227.
- Shulman, M., Cohen, M., Soto-Gutierrez, A., Yagi, H., Wang, H., Goldwasser, Lee-Parsons, C W., Benny-Ratsaby, O., Yarmush, M. y Nahmias, Y. (2011). Enhancement of naringenin bioavailability by complexation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *PloS one*, 6(4), e18033.
- Sumner, J. B. y Howell, S. F. (1935). A method for determination of saccharase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 108(1), 51-54.
- Suzuki, Y. y Suzuki, K. (1991). Enzymatic formation of 4G- α -D-glucopyranosyl-rutin. *Agricultural and biological chemistry*, 55(1), 181-187.

- Svensson, D., Ulvenlund, S. y Adlercreutz, P. (2009). Efficient synthesis of a long carbohydrate chain alkyl glycoside catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase). *Biotechnology and bioengineering*, 104(5), 854-861.
- Szejtli, J. (1990). The cyclodextrins and their applications in biotechnology. *Carbohydrate Polymers*, 12(4), 375-392.
- te Poele, E. M., Grijpstra, P., van Leeuwen, S. S. y Dijkhuizen, L. (2016). Glucosylation of catechol with the GTFA glucansucrase enzyme from *Lactobacillus reuteri* and sucrose as donor substrate. *Bioconjugate chemistry*, 27(4), 937-946.
- Thimm, J. y Thiem, J. (2008). Enzymatic glycosylation by glycohydrolases and glycosynthases. En *Glycoscience* (pp. 1387-1409). Springer Berlin Heidelberg.
- Torres, P., Poveda, A., Jimenez-Barbero, J., Parra, J. L., Comelles, F., Ballesteros, A. O. y Plou, F. J. (2011). Enzymatic Synthesis of α -Glucosides of Resveratrol with Surfactant Activity. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 353(7), 1077-1086.
- Van Hijum, S. A. F. T., Van Der Maarel, M. J. E. C. y Dijkhuizen, L. (2003). Kinetic properties of an inulosucrase from *Lactobacillus reuteri* 121. *FEBS letters*, 534(1-3), 207-210.
- Van Rantwijk, F., Woudenberg-van Oosterom, M., y Sheldon, R. A. (1999). Glycosidase-catalysed synthesis of alkyl glycosides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 6(6), 511-532.
- Vijayakumar, G. R. y Divakar, S. (2005). Synthesis of guaiacol- α -D-glucoside and curcumin-bis- α -D-glucoside by an amyloglucosidase from *Rhizopus*. *Biotechnology letters*, 27(18), 1411-1415.
- Vuong, T. V. y Wilson, D. B. (2010). Glycoside hydrolases: catalytic base/nucleophile diversity. *Biotechnology and bioengineering*, 107(2), 195-205.
- Wagner, G. K., y Pesnot, T. (2010). Glycosyltransferases and their assays. *ChemBioChem*, 11(14), 1939-1949
- Wang, A., Zhang, F., Huang L., Yin, X., Li, H., Wang, Q., Zeng, Z. y Xie, T. (2010). New progress in biocatalysis and biotransformation of flavonoids. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 4(10), 847-856.
- Weijers, C. A., Franssen, M. C. y Visser, G. M. (2008). Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides. *Biotechnology advances*, 26(5), 436-456.
- Weymouth-Wilson, A. C. (1997). The role of carbohydrates in biologically active natural products. *Natural product reports*, 14(2), 99-110.
- www.caymanchem.com, consultado 13 junio 2017: http://www.merckmillipore.com/MX/es/product/Quercetin%2C-Dihydrate---CAS-6151-25-3---Calbiochem,EMD_BIO-551600#anchor_PDS.
- Zhang, G., Fang, L., Zhu, L., Aimiwu, J. E., Shen, J., Cheng, H., Muller .T. Lee, G.E. Sun, D. y Wang, P. G. (2005). Syntheses and biological activities of disaccharide daunorubicins. *Journal of medicinal chemistry*, 48(16), 5269-5278.