



LIPOFILIZACIÓN DE FLAVONOIDES BIOACTIVOS CON CARBOXILESTERASAS INMOVILIZADAS DE *BACILLUS PUMILUS* GMA1

Eva P. Bermúdez G., Carolina Peña Montes, Arturo Navarro-Ocaña, Amelia Farrés
Universidad Nacional Autónoma de México, Fac. Química. Depto. Alimentos y Biotecnología,
Ciudad Universitaria, 04510, D.F. México. farres@unam.mx, Tel. y fax (55) 5622-5305

Palabras clave: Bacillus pumilus, carboxilesterasas, inmovilización, antioxidantes, lipofilización.

Introducción. Los microorganismos extremófilos son importantes para procesos biotecnológicos que requieren condiciones extremas de operación. Estos organismos producen enzimas hidrolíticas como carboxilesterasas activas en amplios rangos de pH y temperatura. Estas enzimas pueden inmovilizarse y generar un biocatalizador capaz de llevar a cabo reacciones de biocatálisis con alta selectividad.

Dentro del grupo de trabajo se aisló un microorganismo proveniente de aguas termales azufradas identificado como *Bacillus pumilus* GMA1 con actividad lipolítica en intervalos de pH y temperatura elevadas. El extracto crudo proveniente de un medio optimizado para producción de carboxilesterasas se inmovilizó para llevar a cabo reacciones de acetilación y esterificación de flavonoides.

Metodología. Se creció a *Bacillus pumilus* en el medio optimizado (1) y se liofilizó el extracto crudo obtenido de este. Posteriormente, se inmovilizó sobre un soporte hidrofóbico de Accurel MP1000 según Zúñiga (2) y se cuantificó proteína por Bradford y actividad espectrofotométricamente utilizando PNP-acetato (3). Una vez obtenido el biocatalizador se probaron reacciones de acetilación química /desacetilación enzimática, esterificación enzimática directa y transesterificación enzimática con 3 flavonoides y con diferentes donadores de grupos hidrofóbicos variando condiciones como solvente, temperatura, a_w y tiempo de reacción. Los productos obtenidos se evaluaron por resonancia magnética nuclear (RMN).

Resultados. Se obtuvo un biocatalizador con una actividad específica de 2.17 U/mg de soporte y con rendimiento de 61.7% en comparación con el extracto crudo. Los contenidos de proteína y unidades de actividad se enlistan en la tabla 1.

Tabla 1: Comparación de contenido de proteína y actividad durante el proceso de inmovilización.

	mg Proteína	U actividad
Extracto crudo	5.229	1945
Sobrenadante	1.643	740.28
Inmovilizado	3.586	1204.72

Se probaron 3 estrategias de lipofilización, variando las condiciones de reacción hasta encontrar las condiciones óptimas. Los resultados se enlistan en la tabla 2:

Tabla 2: Condiciones óptimas de lipofilización de flavonoides

Condición	Acetilación/ desacetilación	Esterificación directa	Trans- esterfi- cación
Temperatura	30°C	40°C	40°C
Tiempo	36 horas	72 horas	24 horas
Solvente	Isopropanol	Terbutanol	Terbutanol
a_w	Sin control	0.37	0.37
Donador de acetilo	Anhídrido acético	Ácido octanoico	Vinil acetato

De las estrategias probadas, la más viable fue la transesterificación (Tabla 3); sin embargo el biocatalizador fue capaz de llevar a cabo las 3 estrategias, variando las condiciones de reacción.

Tabla 3: Evaluación cualitativa de lipofilización de flavonoides por cromatografía en capa fina (CCF).

Flavonoide	Acetilación/ desacetilación	Esterificación directa	Trans- esterificación
Quercetina	✓	✓	✓✓
Rutina	✓	✓	✓✓
Naringina	✓	✓	✓✓

Conclusiones. Se obtuvo un biocatalizador a partir de la inmovilización de carboxilesterasas de *Bacillus pumilus* GMA1 con un rendimiento alto de enzima adherida, la cual conservó la actividad de la forma libre. Después de determinar las condiciones óptimas de cada reacción, el biocatalizador fue capaz de llevar a cabo la lipofilización regioselectiva de flavonoides, conservando de esta manera su poder antioxidante. Estos resultados se corroboraron por RMN. La mejor vía de obtención de productos es la transesterificación.

Agradecimiento. PAPIIT IN2148092.

Bibliografía.

- (1) Ibáñez A, (2007), Optimización del medio de cultivo para *Bacillus pumilus* GMA1, Tesis Licenciatura, UNAM
- (2) Zúñiga, V, (2004), Inmovilización de la lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1, Tesis de Licenciatura. UNAM
- (3) Bornscheuer, U.T. (2002) Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis'. FEMS Microbiol. Rev.26:1, 73-81.