



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**OBTENCIÓN DE ÁCIDO CAFÉICO MEDIANTE LA
HIDRÓLISIS DE ÁCIDOS CLOROGÉNICOS CON
FERULOILESTERASAS COMERCIALES INMOVILIZADAS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA EN ALIMENTOS**

**PRESENTA
ERIKA ALEJANDRA MUHL BARQUERA**



MÉXICO, D.F., marzo de 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente	Prof. Raúl Genaro Aguilar Caballero
Vocal	Prof. Agustín López Munguia Canales
Secretario	Prof. Arturo Navarro Ocaña
1er sup.	Profa. Amelia Maria de Guadalupe Farres González Saravia
2do sup.	Profa. Sandra Paola Sanchez Rodriguez

Sitio en donde se desarrolló el tema:

- Laboratorio 321 del Departamento de Alimentos y Biotecnología en el conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Laboratorio 3 del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR DE TEMA

SUSTENTANTE

Dr. Arturo Navarro Ocaña

Erika Alejandra Muhl Barquera

Agradecimientos:

Agradezco al Dr. Arturo Navarro Ocaña por permitirme usar las instalaciones del laboratorio 321 del departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química y por ser mi asesor y maestro durante este tiempo.

Agradezco al Dr. Edmundo Castillo y al laboratorio 3 del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología por permitirme usar sus instalaciones y por la asesoría que me brindaron para terminar este trabajo experimental.

Un agradecimiento muy especial a María Elena Rodríguez Alegría por la excelente asesoría y dirección técnica brindada durante mi estancia en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología. Gracias por todo el aprendizaje y tiempo invertido en este proyecto, así como la enorme paciencia y calidad humana que te caracterizan.

Agradezco de manera especial al ICYTDF (Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal) por el apoyo económico otorgado durante la realización de este proyecto (PICS08-40).

Gracias al Jurado por sus importantes aportaciones para este trabajo y por su apoyo para mi evaluación.

Agradecimientos Generales:

Agradezco a mis padres por ser en cada etapa de mi vida mi ejemplo de constancia, mi motor y soporte. Estoy sumamente agradecida por todo el esfuerzo que han demostrado para hacer de mí y mis hermanos las personas que hoy en día somos. Nunca habrá suficientes palabras y acciones que puedan demostrar el AMOR, ADMIRACIÓN y AGRADECIMIENTO que les tengo. ¡¡GRACIAS!!

Agradezco a mis hermanos por ser mis ejemplos, mis guías, mis protectores cuando así se requiere y por darme ese apoyo incondicional que difícilmente se encuentra.

A mi familia y amigos por todas las experiencias que hemos tenido juntos y el amor y unión que hemos cultivado a través de los años. Cada uno de ustedes es indispensable para mí y gracias por iluminar y enriquecer mi vida.

¡A seguir cultivando éxitos y experiencias juntos!

Un agradecimiento muy especial a la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Química por formarme como profesional y permitirme ser parte de la mejor casa de estudios. Que orgullo haber sido parte de esta institución.

LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS

4NFF	4-nitrofenilferulato
4NF	4-nitrofenol
AC	Ácido Caféico
ACG	Ácido Clorogénico
ACGs	Ácidos Clorogénicos
AFE	Ácido Ferúlico Esterasa
ASB	Albúmina de suero bovino
BHT	Butil-hidroxitolueno
CCF	Cromatografía en capa fina
CMC	Carboximetilcelulosa
DCC	N,N'-diciclohexilcarbodiimida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNS	ácido 3'-5'- dinitrosalicílico
DPPH	2,2-difenil-1-picril hidrazilo.
PG	Propil galato
RMN	Resonancia Magnética Nuclear

INDICE

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN	8
CAPITULO 2. ANTECEDENTES	10
2.1 Antioxidantes naturales	10
2.1.1 Definición y generalidades	10
2.1.2 Polifenoles	10
2.1.3 Tocoferoles y tocotrienoles (Vitamina E)	12
2.1.4 Fenoles simples	13
2.2 Ácidos hidroxicinámicos	14
2.2.1 Generalidades	14
2.2.2 Estructura de los ácidos hidroxicinámicos	15
2.3 Ácido caféico	16
2.3.1 Generalidades	16
2.3.2 Principales fuentes	17
2.3.3 Propiedades fisicoquímicas	18
2.3.4 Derivados del ácido caféico	18
2.4 Ácidos clorogénicos	19
2.4.1 Generalidades	19
2.4.2 Principales fuentes	19
2.4.3 Propiedades fisicoquímicas	20
2.5 Biocatálisis	21
2.5.1 Generalidades	21
2.5.2 Enzimas en solventes orgánicos	22
2.5.3 Hidrolasas	23
2.5.4 Ácido Ferúlico Esterasas	23
2.6 Inmovilización enzimática	25
2.6.1 Definición y generalidades.	25
2.6.2 Eupergit C	29
CAPITULO 3. HIPÓTESIS	31
CAPITULO 4. OBJETIVOS	32
CAPITULO 5. METODOLOGÍA.	33
5.1 Diagrama general de la investigación	33

5.2 Materiales y métodos	34
5.2.1 Reactivos y equipos	34
5.2.1.1 Determinación de actividad enzimática con Espectrofotómetro	34
5.2.1.2 Reacción enzimática	34
5.2.1.3 Inmovilización enzimática	34
5.2.1.4 Hidrólisis de ACG	35
5.2.1.5 Purificación del AC	35
5.3 Desarrollo del trabajo experimental	36
5.3.1 Primera Etapa: Determinación de un método espectrofotométrico para medir la actividad enzimática de AFE.	36
5.3.1.1 Síntesis y purificación del 4NFF	37
5.3.1.2 Actividad enzimática de AFE presente es D740L y D670L	38
5.3.1.3 Actividad enzimática de celulasa y pectinasa presente en D670L	39
5.3.2 Segunda Etapa: Inmovilización enzimática de la AFE mediante unión química empleando Eupergit C como soporte.	40
5.3.2.1 Determinación de la cantidad de proteína y tiempo de reacción para la reacción de inmovilización	40
5.3.2.2 Cálculo de la actividad que presenta la AFE inmovilizada	41
5.3.2.3 Evaluación de la estabilidad que presenta la enzima inmovilizada al ser almacenada en refrigeración (4°C)	41
5.3.3 Tercera Etapa: Hidrólisis de ACG's y purificación de AC	42
5.3.3.1 Hidrólisis de ACG's empleando la AFE inmovilizada	43
5.3.3.2 Purificación del ácido caféico obtenido mediante cromatografía en columna	43
5.3.3.3 Hidrólisis enzimática de ACG empleando dioxano, isopropanol y acetona como medio de reacción	44
CAPITULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	45
6.1 Primera etapa	45
6.1.1 Determinación de un método espectrofotométrico para medir la actividad enzimática de la feruloilesterasa presente en Depol 740L y Depol 670L	45
6.1.2 Actividad enzimática de Acido Ferúlico Esterasa	47
6.2 Segunda etapa	49
6.2.1 Inmovilización enzimática de AFE mediante unión química empleando Eupergit C como soporte	49
6.2.2 Cálculo del rendimiento de la inmovilización.	51
6.2.3 Actividad de AFE inmovilizada a los 30 y 60 días de almacenamiento a 4°C	53
6.3 Tercera etapa	55
6.3.1 Hidrólisis de ACG y purificación del AC	55
6.3.2 Purificación y cálculo del rendimiento del AC obtenido en la reacción Enzimática	56

6.3.3 Evaluación de la hidrólisis enzimática de ACGs empleando dioxano, isopropanol y acetona como medio de reacción	58
CAPITULO 7. CONCLUSIONES	60
CAPITULO 8. ANEXOS	61
ANEXO I	61
ANEXO II	62
ANEXO III	68
ANEXO IV	72
ANEXO V	72
ANEXO VI	74
ANEXO VII	75
CAPITULO 9. BIBLIOGRAFÍA	77

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha generado mayor interés por los antioxidantes naturales ya que existen datos experimentales, clínicos y epidemiológicos que demuestran sus efectos benéficos tanto en enfermedades degenerativas como el cáncer, las inducidas por el estrés oxidativo y del sistema cardiovascular, como en la prevención de la rancidez y descomposición que presentan los alimentos y que son causados principalmente por la oxidación de algunos compuestos.

Uno de los antioxidantes que ha generado un gran interés es el Ácido Caféico (AC), un ácido fenólico con la fórmula molecular $C_9H_8O_4$ y físicamente se encuentra en forma de cristales color amarillo solubles en agua caliente y en alcoholes.

Su estructura molecular presenta un anillo aromático, 2 grupos hidroxilo y una función carboxílica que le confiere características que lo hacen uno de los antioxidantes más potentes dentro de la gran familia de ácidos fenólicos.

Está presente en las paredes celulares de tejidos vegetales mayoritariamente esterificado con glucósidos, alcoholes alifáticos, ácido quínico (formando ácidos clorogénicos, ACGs) y otros metabolitos secundarios.

Presenta amplias aplicaciones como antioxidante en la industria de alimentos y medicina.

Hong Chen et al. (1997) estudiaron las propiedades antioxidativas y de inhibición de radicales libres de algunos compuestos como AC, ácido ferúlico, α -tocoferol y BHT utilizando el test de Rancimat y el modelo de captura para radicales libres con DPPH, siendo el AC el que generalmente demostraba mayor eficiencia aún comparado con antioxidantes sintéticos como el BHT.

En cuanto a la salud humana, la reducción en padecimientos cardiovasculares es un ejemplo de las múltiples ventajas en el consumo de antioxidantes naturales, debido principalmente a la interrupción que ejercen los compuestos fenólicos en la peroxidación lipídica inducida por las especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen species, ROS) y que está implicada en el inicio de la arteroesclerosis (Virgili et al, 2001).

El AC se obtiene por la hidrólisis química y enzimática de ACGs. Los métodos químicos que suelen emplearse para este tipo de reacciones involucran el uso excesivo de reactivos y por lo general se obtienen bajos rendimientos debido a la descomposición que pueden presentar los sustratos o productos.

Los biocatalizadores suelen presentar una alta afinidad hacia los sustratos y altos rendimientos en los productos. Además permite tener un medio de reacción con el que se logra una química verde, es decir, una química sustentable que reduce y elimina el uso y generación de sustancias peligrosas para la salud humana o el medio ambiente.

En estudios anteriores realizados en el laboratorio 321 del Departamento de Alimentos y Biotecnología, UNAM, se demostró la capacidad de dos extractos enzimáticos comerciales (Depol 670L y Depol 740L) que contienen la enzima feruloilesterasa o ácido ferúlico esterasa (AFE) de hidrolizar los ACGs y de obtener AC, sin embargo, un gran inconveniente de esta metodología es que una vez que se utiliza el extracto enzimático para la reacción, éste se desecha junto con el medio de reacción después de la recuperación del producto.

Por esta razón se determinó un procedimiento que nos permitiera inmovilizar y evaluar la estabilidad de la enzima inmovilizada con el fin de reutilizar el biocatalizador en las reacciones de hidrólisis de ACG y hacer el sistema más viable con el propósito de que se pueda escalar a nivel industrial.

2. ANTECEDENTES

2.1 ANTIOXIDANTES NATURALES

2.1.1 *Definición y generalidades.*

Los antioxidantes naturales son sustancias que se encuentran en tejidos de plantas y animales y que tienen la capacidad de inhibir o retrasar la oxidación de ciertos productos.

En los últimos años se ha generado un gran interés hacia el papel que ejerce un tipo de antioxidantes naturales conocidos como compuestos fenólicos, ya que, además de tener importantes aplicaciones para la conservación de alimentos, existe un número creciente de datos experimentales, clínicos y epidemiológicos que demuestran sus efectos benéficos frente a las enfermedades degenerativas inducidas por el estrés oxidativo, las enfermedades relacionadas con la edad así como algunos tipos de cáncer.

Los compuestos fenólicos son moléculas orgánicas clasificadas como metabolitos secundarios de las plantas en cuyas estructuras moleculares se encuentra al menos un anillo aromático unido a por lo menos un grupo funcional hidroxilo. Su capacidad de actuar como antioxidante depende principalmente de la reacción del hidrógeno fenólico con los radicales libres, de la estabilidad de los radicales formados con los antioxidantes durante la reacción y de las sustituciones químicas presentes en su estructura básica.

Es un grupo de sustancias químicamente heterogéneas tales como polifenoles, fenoles simples, tocoferoles, entre otros.

2.1.2. *Polifenoles:*

Se caracterizan por tener más de un grupo fenol por molécula. Constituyen uno de los grupos más abundantes en el reino vegetal y cuentan con una gran diversidad de moléculas. Dentro de los representantes más comunes se encuentran los flavonoides, las ligninas y los taninos. (Virgil, **2001**)

Se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas, frutas, verduras, semillas y en diversas bebidas como cerveza, vino, té verde entre otros. Por lo general se encuentran unidos con azúcares siendo la D-glucosa el residuo de azúcar más frecuente.

Otros residuos de azúcar que se pueden encontrar son la D-galactosa, L-ramnosa, L-arabinosa, L-xilosa así como el ácido D-glucurónico.

Se estima que la ingesta diaria de polifenoles en los países occidentales es de 23 mg por día. La presencia de estos compuestos en los alimentos es relativamente alta. Como ejemplos, el glucósido de quercetina presente en las hojas superficiales de la lechuga puede llegar a ser de 237mg/kg de peso fresco y el contenido en glucósido de kemferol en col rizada puede llegar a ser de 250mg/ kg de peso fresco. (Yanishlieva, **2001**).

Su actividad antioxidante depende de las propiedades redox que tengan sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural que presenten. Además, cuentan con excelentes propiedades de quelación de hierro y otros metales de transición, depuración de radicales libres y efectos protectores en patologías tales como cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, inflamaciones, acciones antivirales y antialérgicas. (Johnson I.T. **2001**; Yanishlieva, **2001**)

Se han identificado más de 5000 polifenoles, lo que lo hace el grupo de mayor presencia en la naturaleza. La composición y concentración de flavonoides es muy variable en las plantas y depende de la especie, así como de los factores ambientales. (Martínez, González, et al. **2002**; Hall, **2001**).

Los flavonoides son uno de los principales subgrupos pertenecientes a los polifenoles, y son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo de pirano C y que contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo (Figura 1). Esta estructura base puede sufrir muchas modificaciones y adiciones de grupos funcionales, por lo que los flavonoides son una familia muy diversa de compuestos. Se pueden clasificar en 6 principales clases de acuerdo a las isomerizaciones y los grupos funcionales que les son adicionados: chalconas, flavonas, flavonoles, isoflavonas, antocianinas y taninos condensados.

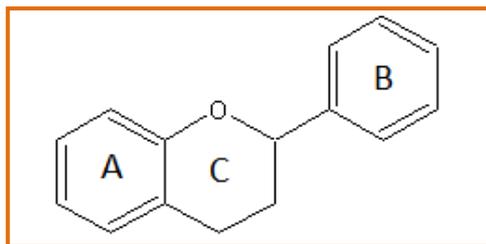


FIGURA 1. Estructura de los flavonoides

El interés en estos compuestos ha aumentado debido a la capacidad antioxidante que presentan, además, cuentan con propiedades anticancerígenas, disminuyen las enfermedades cardíacas y presentan características antimicrobianas. En la figura 2 se encuentran las estructuras químicas de las subclases más usuales de flavonoides. (Martínez, González, et al. **2002**; Virgil, **2001**).

2.1.3 Tocoferoles y tocotrienoles (Vitamina E)

Los tocoferoles y tocotrienoles pertenecen al grupo de moléculas liposolubles y son el grupo antioxidantes mejor conocidas y ampliamente usadas, siendo el mayor representante el α -tocoferol. Este grupo está conformado por 8 vitámeros, cuyas estructuras constan de dos partes primarias: un anillo complejo cromano y una larga cadena lateral. Estos 8 vitámeros se dividen en 2 grupos fundamentales: 4 tocoferoles y 4 tocotrienoles, que se diferencian entre ellos por la saturación de la cadena lateral, mientras los tocoferoles tienen una cadena saturada, los tocotrienoles una insaturada con 3 dobles enlaces. Dentro de cada grupo los vitámeros difieren en el número y posición de los grupos metilo en el anillo cromano y tienen las formas alfa α , beta β , gamma γ y delta δ (Yanishlieva, **2001**).

Actúan principalmente a nivel de las membranas biológicas hidrófobas de las paredes celulares, son muy estables al calor y se ha observado que estos compuestos incrementan la estabilidad oxidativa conforme aumenta la temperatura. En la figura 3 se observa la estructura general de los tocoferoles y tocotrienoles

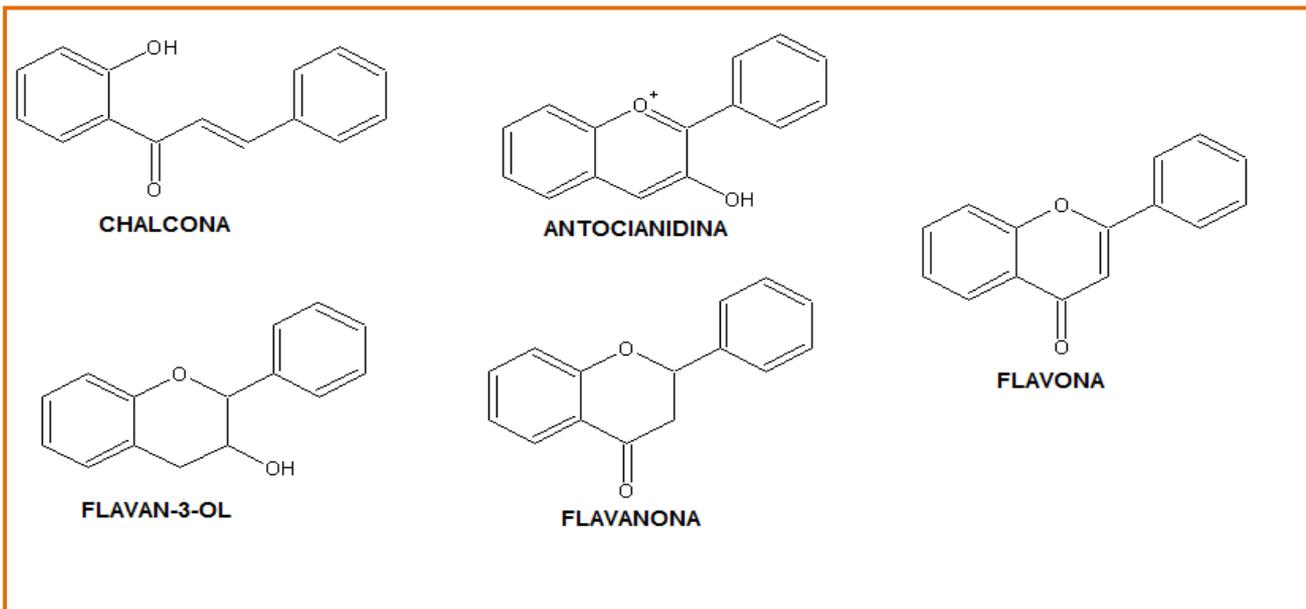


FIGURA 2. Estructuras químicas de subclases de flavonoides

Se encuentran en gran variedad de alimentos. Sus fuentes fundamentales son el aceite de soya, algodón y girasol, los chícharos garbanzos y lentejas, el trigo, avena y arroz integral, la mantequilla y el huevo. También puede encontrarse en alimentos de origen vegetal, sobre todo en los de hoja verde como brócoli y espinacas (Yanishlieva, **2001**). Su actividad antioxidante se basa en la donación de un hidrógeno del grupo hidroxilo localizado en la posición 6 del anillo cromano, a los radicales libres solubles en los lípidos de las membranas, así el nuevo radical formado a partir de esta donación se estabiliza por deslocalización del electrón solitario sobre la estructura del anillo aromático y finalmente se forman productos no radicales , (Virgil, **2001**).

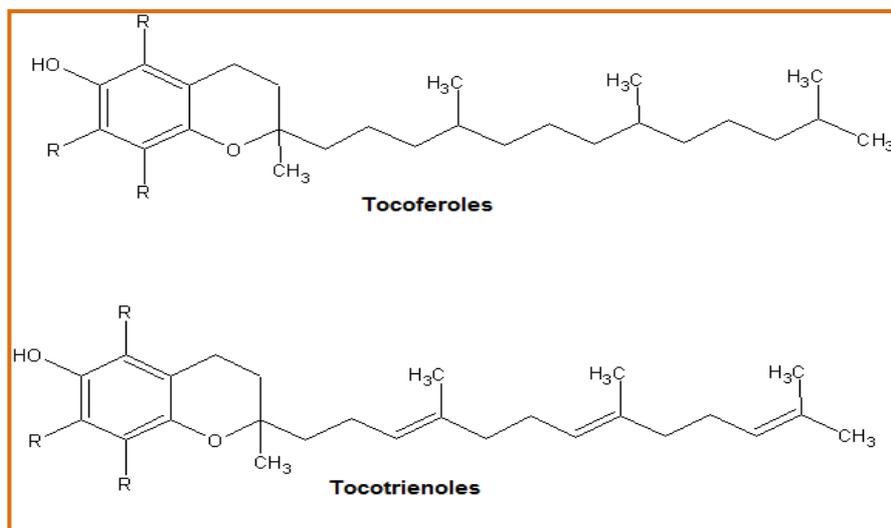


FIGURA 3. Tocofenoles y tocotrienoles

2.1.4 Fenoles simples:

Este grupo de moléculas se destaca por poseer en su estructura química un anillo aromático con al menos un grupo hidroxilo. Algunos ejemplos son el cresol (Figura 4), fenol (Figura 5), timol, los ácidos fenólicos y fenilpropanoides. Los ácidos fenólicos y fenilpropanoides contienen además una función carboxílica que les da sus propiedades ácidas.

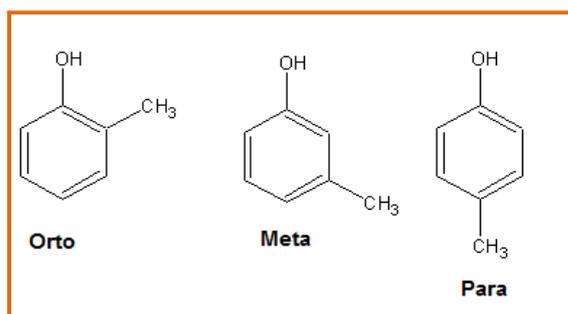


FIGURA 4. Orto, meta, para – cresol.

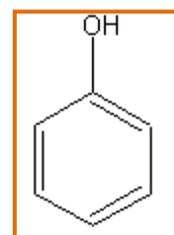


FIGURA 5. Fenol

Se encuentran principalmente en los tejidos vegetales de frutas y verduras, así como de semillas y están mayoritariamente esterificados (Yanishlieva, **2001**; Laranjinha, **2001**).

Su actividad antioxidante radica en la capacidad que tienen de donar grupos hidrógeno y de eliminar radicales libres. El radical antioxidante formado se estabiliza por deslocalización del electrón sobrante (Hall, **2001**).

2.2 ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS

2.2.1 Generalidades:

Los ácidos hidroxicinámicos son metabolitos secundarios que se producen en las plantas y se clasifican dentro del grupo de fenoles simples como Fenilpropanoides, ya que tienen un esqueleto básico de un anillo aromático unido a una cadena de 3 carbonos.

Estos compuestos derivan principalmente del ácido cinámico y son muy abundantes en la naturaleza.

Se encuentran principalmente en las paredes celulares de los tejidos vegetales y forman cuatro estructuras básicas: ácido caféico, p-cumárico, ferúlico y sinápico, las cuales casi siempre se encuentran esterificados con glicósidos, alcoholes alifáticos, ácido quínico (formando ácidos clorogénicos) y otros metabolitos secundarios. (Hall, **2002**; Yanishlieva **2001**; Faulds y cols., **1993**; Rice y cols., **2001**).

En cuanto a la actividad antioxidante, los ácidos hidroxicinámicos participan en reacciones de donación de hidrógenos y de captación de radicales.

En la figura 6 se describe el mecanismo de donación de hidrógenos y de captación de radicales de un fenol simple, el cual representa la forma en que los ácidos hidroxicinámicos llevan a cabo su actividad.

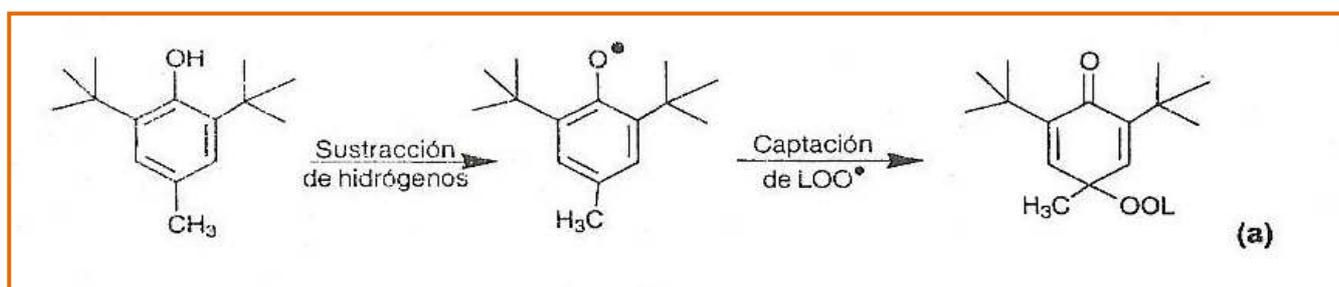


FIGURA 6. Mecanismo de donación de hidrógenos y captación de radicales (Hall, 2001)

La posición de los grupos hidroxilo y el grado de hidroxilación determinan en gran medida su actividad antioxidante. Cuvelier et al (**2000**) estudiaron la relación existente entre la estructura molecular de muchos ácidos hidroxicinámicos y su actividad antioxidante, con lo que aseguran lo siguiente:

- La introducción de un segundo grupo hidroxilo en posición *orto* o *para* incrementa la actividad antioxidante, como ejemplo se puede mencionar que el ácido caféico (Figura 12) es mejor antioxidante que los ácidos ferúlico (Figura 9) y p-cumárico (Figura 11).

Esto se debe principalmente a que la presencia de un segundo grupo hidroxilo en esa posición forma puentes de hidrógeno intramoleculares durante la reacción con los radicales libres (Figura 7), lo cual provoca un aumento en la estabilidad de los radicales fenoxi.

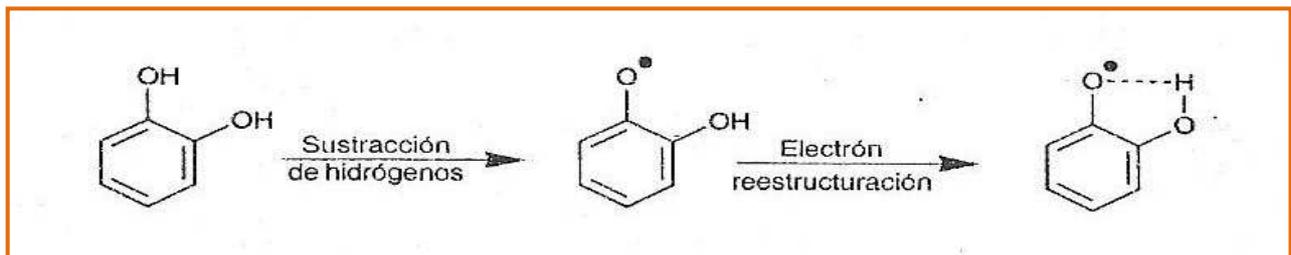


FIGURA 7. Formación de puentes intramoleculares. (Hall, 2001)

- La actividad antioxidante de monofenoles es menor que de polifenoles.
- La combinación de dos ácidos hidroxicinámicos incrementa la actividad antioxidante, por ejemplo, el ácido rosmarínico (Figura 15) es mejor antioxidante que el ácido caféico.
- La presencia de tres grupos hidroxilo proporciona una protección añadida, ya que presentan mayor poder antioxidante. Tal es el caso de los ácidos trihidroxibenzóicos como el ácido gálico.
- La esterificación de los ácidos fenólicos disminuye su actividad, por ejemplo, el ácido clorogénico es menos efectivo que el ácido caféico.

2.2.2 Estructura de los ácidos hidroxicinámicos:

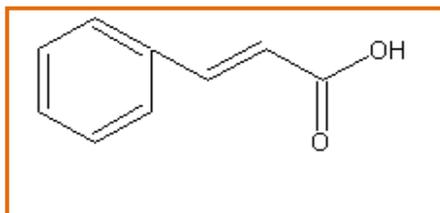


FIGURA 8. Ácido cinámico

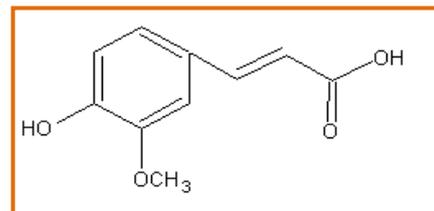


FIGURA 9. Ácido ferúlico

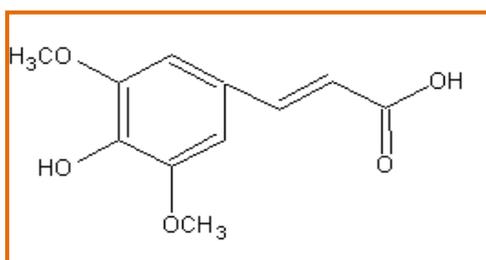


FIGURA 10. Ácido sinápico

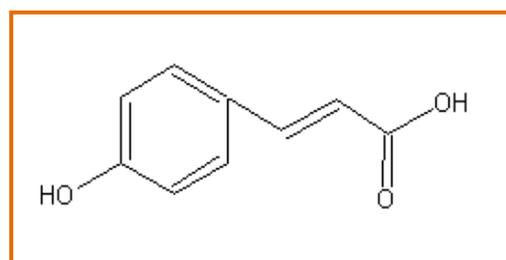


FIGURA 11. Ácido cumárico

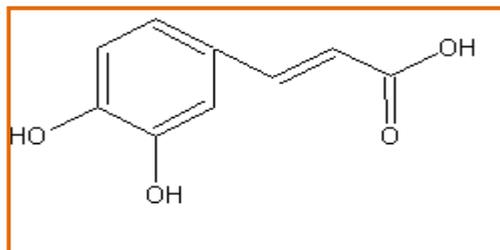


FIGURA 12. Ácido caféico

2.3 ACIDO CAFEICO

2.3.1 Generalidades:

El ácido caféico es un compuesto que posee en su estructura un anillo aromático, una función carboxílica y 2 grupos hidroxilo.

Junto con los ácidos clorogénicos, que son el éster formado con ácido quínico, y su precursor el ácido cumárico, el ácido caféico es de los ácidos hidroxicinámicos más abundantes y mejor distribuidos en los tejidos vegetales de las plantas (Laranjinha, **1999**).

Sus principales funciones son dar estructura a las paredes celulares, ser intermediarios en la biosíntesis de compuestos como la lignina y proteger a los tejidos.

Existe una gran cantidad de estudios que se han hecho sobre la capacidad antioxidante de este compuesto.

Como ejemplo, O'Connell y Fox (**2000**) realizaron estudios para evaluar el efecto de los compuestos polifenólicos sobre la estabilidad de las proteínas de la leche frente al calor. Se observó que el ácido cafeico era uno de los pocos compuestos que lograba aumentar su estabilidad y que otros antioxidantes como el ácido clorogénico, el guayacol, el timol, la vanilina, el BHT el PG y los ácidos 2,5-dimetoxicinámico no la mejoraban.

El método Rancimat se usa comúnmente para evaluar la actividad antioxidante de varios compuestos, se basa en la formación de compuestos volátiles por la oxidación lipídica que son atrapados en agua destilada causando un cambio en la conductividad eléctrica.

Hong Chen, et al (**1997**) emplearon este método y demostraron la capacidad antioxidante de diferentes compuestos como ácido cafeico, α -tocoferol, fenetil éster del ácido cafeico (CAPE), BHT, ácidos clorogénico y ferulico en diferentes medios como emulsiones, aceite

vegetal y grasa sólida. En el estudio del aceite vegetal y la grasa sólida, se demostró que el ácido caféico es igual de efectivo que el α -tocoferol, y muestra mayor poder antioxidante que los compuestos CAPE, ácido clorogénico, ácido ferúlico y BHT. Mientras que en las emulsiones, el ácido cafeico resultó más efectivo que los mencionados salvo por el BHT.

Otra aplicación que presenta el AC es su capacidad de copigmentar las antocianinas presentes en bebidas como el vino, logrando una mayor estabilización de los colorantes si se compara con dejarlos en su estado natural, lo que permite y promueve el uso de colorantes naturales en los alimentos. (Gris et al., **2007**).

En cuanto a la salud humana, el ácido cafeico ha demostrado ser un potente inhibidor del crecimiento de células cancerígenas y de enfermedades cardiovasculares. Esta correlación se explica en parte sobre la base de que el ácido caféico y los compuestos fenólicos en general interrumpen la peroxidación lipídica inducidas por las especies reactivas de oxígeno (ROS) lo que impide la modificación de la fracción lipoprotéica de baja densidad (LDL) y con eso el inicio de la arterioesclerosis.

Dadas las características de este compuesto y al constante interés que en los últimos años se ha presentado por el uso de antioxidantes de fuentes naturales, las aplicaciones del ácido cafeico en la industria de los alimentos, farmacia y medicina son amplias.

2.3.2 Principales fuentes:

Se encuentra principalmente en las paredes celulares de alimentos de origen vegetal tales como frutas, vegetales, semillas, entre otros. Mayoritariamente está esterificado con glicósidos, alcoholes alifáticos, ácido quínico (formando ácidos clorogénicos), otros metabolitos secundarios y pueden estar amidificados.

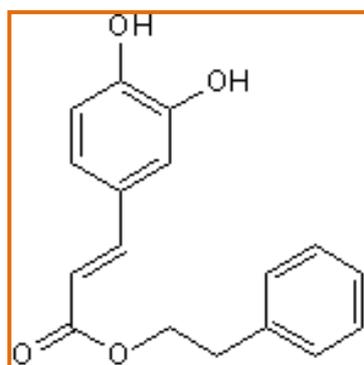
En las especies de *Salvia*, la mayor cantidad de ácidos fenólicos está constituida por ácido caféico, y éste a su vez es el bloque de construcción de una gran variedad de metabolitos en la planta, desde los monómeros más simples hasta las condensaciones múltiples. (Lu Yinrong, Foo Yeap L. **2002**; Jiang, **2005**).

2.3.3 *Propiedades fisicoquímicas:*

El ácido caféico o ácido 3,4-dihidroxicinámico tiene la fórmula molecular $C_9H_8O_4$ y físicamente son cristales de color amarillo solubles en agua caliente y en alcoholes, con un PM de 180 g/mol y un p.f de 223-225°C (Merck Index, **2001**; Castillo, **2007**).

2.3.4 *Derivados del ácido cafeico:*

- ✓ Fenetil –éster del ácido cafeico (CAPE, por sus siglas en inglés):



Se encuentra en las paredes celulares de origen vegetal. Es un potente antioxidante, anticarcinogénico, así como supresor de la peroxidación lipídica.

Propiedades fisicoquímicas:

Fórmula molecular= $C_{17}H_{16}O_4$

P.M = 284.31

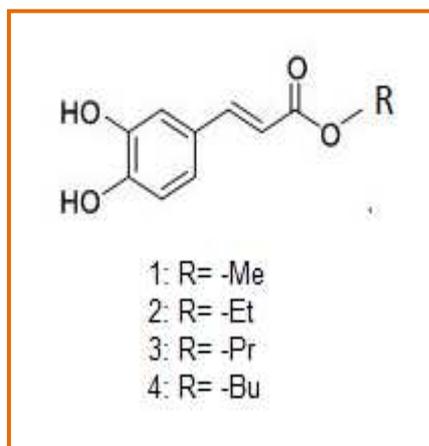
Solubilidad: 100% etanol y DMSO.

(Fiuza, **2004**; Kurata, **2010**)

FIGURA 13. CAPE

- ✓ Metil – cafeato y compuestos relacionados:

Se encuentran ampliamente distribuidos en los tejidos vegetales. Se les conocen propiedades antioxidantes, antitumorales, inhibidores de microorganismos y hongos.



Propiedades fisicoquímicas:

Todas presentan solubilidad en DMSO, etanol y acetona.

1: P.M = 194.2; Formula: $C_{10}H_{10}O_4$

2: P.M = 208.2; Formula: $C_{11}H_{12}O_4$

3: P.M = 222.2; Formula: $C_{12}H_{14}O_4$

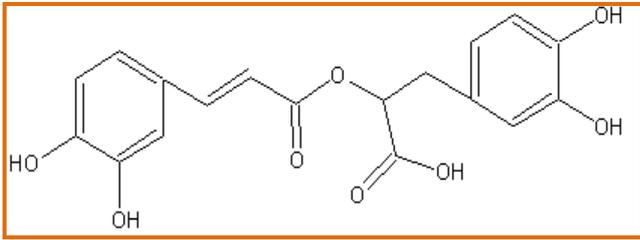
4: P.M = 236.2 ; Formula: $C_{13}H_{16}O_4$.

(Fiuza, **2004**; Shin, **2010**)

FIGURA 14. Metil-cafeato y compuestos relacionados

✓ Ácido rosmarínico:

Se encuentra en muchos tejidos vegetales de la familia de las *Lamiaceae*. Dentro de las



actividades biológicas que se le han encontrado destaca su capacidad antiviral, antibacterial, antiinflamatoria y antioxidante.

Fórmula molecular: $C_{18}H_{16}O_8$ P.M = 360.31

Solubilidad: agua y solventes orgánicos.

FIGURA 15. Ácido rosmarínico

(Petersen, 2003).

Dentro de los principales derivados del ácido caféico se encuentran los ácidos clorogénicos:

2.4 ÁCIDOS CLOROGÉNICOS

2.4.1 Generalidades:

El AC se obtiene mayoritariamente por la hidrólisis enzimática o química de los ACGs, que están formados por ésteres entre ácidos hidroxicinámicos y ácido quínico. Existen tres grandes grupos de ACG, los cuales son ácidos cafeoilquínicos, ácidos dicafeoilquínicos y ácidos feruloilquínicos, cada uno de éstos con sus respectivos isómeros.

El más común y encontrado comercialmente es el ácido 5-O- cafeoilquínico, también llamado ácido clorogénico (Clifford, 2000).

Entre sus principales funciones destacan el dar estructura a las paredes celulares, ser intermediarios en la biosíntesis de compuestos como la lignina y proteger a los tejidos vegetales.

Diversos estudios sobre los ácidos clorogénicos demuestran los efectos benéficos que tienen sobre la salud humana, entre los que destacan la disminución de la hipertensión, la regulación de la glucosa en el metabolismo y el control sobre diversas enfermedades como las cardiovasculares, inflamatorias y neurológicas. Además, los ácidos clorogénicos presentan efectos antioxidantes que pueden ser funcionales para diversas industrias como la de alimentos y farmacéutica (Clifford, 2000; Castillo, 2007).

2.4.2 Principales fuentes:

Se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, en frutas, verduras y semillas como la alcachofa (10-15%), café verde (5-8%), mora azul, manzana, níspero, durazno, zanahoria, entre otros. (Rice y cols., **2001**).

2.4.3 Propiedades fisicoquímicas:

También llamado ácido 3-cafeoilquínico, ácido 3-(3,4-dihydroxicinamoilquínico). Físicamente son cristales de color crema solubles en agua, acetona y alcoholes. El ácido clorogénico, $C_{16}H_{18}O_9$, presenta un PM de 354.2 g/mol y un p.f. 203-205°C

Cuentan con un alto poder antioxidante y estudios demuestran su relación con la anticarcinogénesis, y en contra de las enfermedades cardiovasculares (Merck Index, **2001**; Castillo, **2007**).

Grupos de ACGs:

Ácidos cafeoilquínicos:

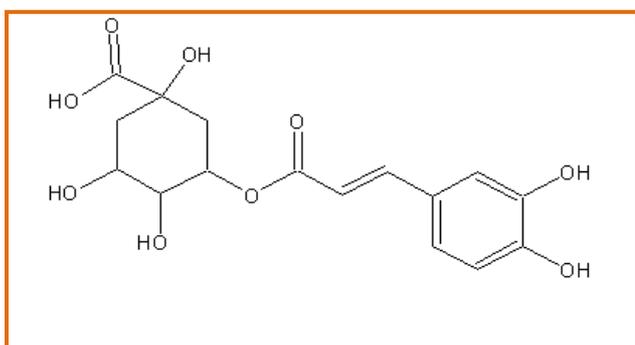


FIGURA 16. Ácido 5-O-cafeoilquínico

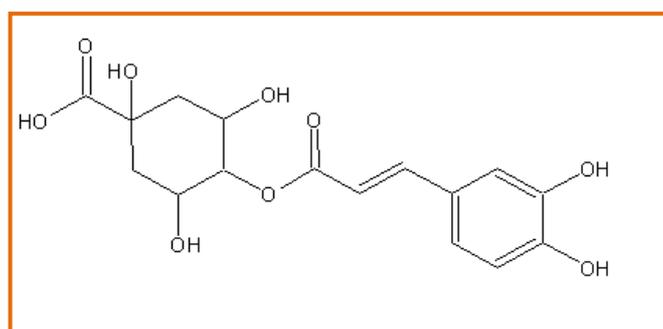


Figura 17. Ácido 4-O-cafeoilquínico

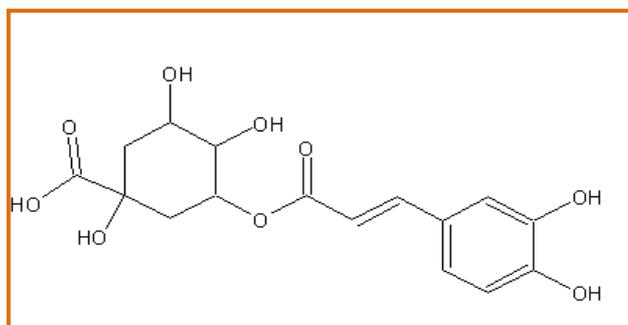


FIGURA 18. Ácido 3-O-cafeoilquínico

2.5 BIOCATÁLISIS

2.5.1 Generalidades:

Se conoce como biocatálisis a la capacidad que tienen las enzimas de llevar a cabo transformaciones mediante una reacción o un grupo de reacciones simultáneas sobre ciertos sustratos específicos.

La naturaleza es un sistema muy diverso en términos de la gran cantidad y tipos de moléculas orgánicas que existen y que se requieren para la vida. Esta diversidad es en gran parte posible debido a la existencia de las enzimas que llevan a cabo de manera natural las biotransformaciones (Dordick, **1991**).

Desde tiempos muy antiguos se ha aprovechado el poder catalítico que presentan estas moléculas para la obtención de alimentos, bebidas u otro tipo de sustancias, los productos de pan, queso y bebidas fermentadas son ejemplos sobresalientes de su utilización.

No fue sino hasta el siglo pasado cuando el potencial de los procesos enzimáticos empezó a ser explotado a nivel industrial para la obtención de algunas sustancias como fructosa, ácido cítrico, penicilina y cefalosporinas, así como en procesos donde se obtenían mezclas de enantiómeros. Para inicios del siglo XXI más de 200 enzimas ya empiezan a ser aplicadas en la industria de alimentos, química, farmacéutica y medicina, siendo en la mayoría de los casos procesos que tienen menos de 30 años de utilizarse. Como ejemplos se puede mencionar la enzima α -amilasa, proveniente de *Bacillus subtilis* y/o *Bacillus licheniformis* y cuya aplicación es para la producción de glucosa, fermentación del alcohol y conversión del almidón. Otro ejemplo es la β -galactosidasa, cuya fuente es de *A. oryzae*, *A. niger* y/o *Saccharomyces lactis* y se utiliza principalmente para la eliminación de la lactosa en la leche. (Dordick, **1991**; Neidleman, **1991**).

Este incremento casi exponencial en el uso de enzimas encuentra una explicación en las grandes ventajas que esto implica: en algunos casos son más baratas en comparación con los catalizadores químicos convencionales, suelen ser fáciles de operar, son *amigables* con el ambiente al requerir condiciones suaves de pH y temperatura, participan en una gran cantidad de biotransformaciones y, una de las principales causas, presentan regio-, quimio- y estereoselectividad.

Antes de los años sesenta, las enzimas para aplicaciones industriales se obtenían principalmente de plantas y animales, y en menor proporción de fuentes microbianas. En ese entonces se consideraba que el volumen y la variedad de enzimas producidas por plantas y animales era mucho mayor que por microorganismos. Hoy en día, la mayor cantidad de enzimas se obtienen de bacterias, hongos y levaduras y pertenecen a un 80% de la producción industrial total. Además, las enzimas de plantas y animales ya se producen por microorganismos gracias a las alteraciones genéticas y de biología molecular que se han logrado. (Dordick, **1991**; Neidleman, **1991**).

La biocatálisis es una técnica que sigue en desarrollo y cada vez se crean nuevas tecnologías que incrementan la utilidad de enzimas en las industrias de alimentos, farmacéutica y química.

2.5.2 Enzimas en solventes orgánicos

Hasta ahora, la industria enzimática ha utilizado predominantemente medios acuosos para llevar a cabo las biotransformaciones debido principalmente a la creencia de que las enzimas en solventes orgánicos perdían una gran parte de su capacidad catalítica. Sin embargo existen ciertas razones como la baja solubilidad que presentan muchos compuestos orgánicos en agua (aceites, grasas, ácidos grasos y alcoholes, compuestos aromáticos, esteroides) y reacciones secundarias indeseables (hidrólisis, adiciones nucleofílicas de iones hidroxilos) que promueven el desarrollo de otros medios de reacción para llevar a cabo la catálisis.

Entre las opciones que se han desarrollado se incluye el uso de enzimas en soluciones acuosas conteniendo cosolventes orgánicos miscibles en agua, mezclas bifásicas de agua y solventes orgánicos, y solventes orgánicos anhídridos.

Con el paso del tiempo y el desarrollo de diversos experimentos se observó que algunas enzimas conservaban su actividad “normal” en solventes orgánicos y en algunas ocasiones, incluso la aumentaban. Paralelamente los avances en el campo de la bioquímica mostraron que muchas de las enzimas presentes en los seres vivos funcionan en medios hidrofóbicos o asociados a éstos, como lo son las membranas celulares (Zaks, **1991**; Deetz, **1991**)

Una gran variedad de reacciones de síntesis incluyendo oxidoreducciones, epoxidaciones, isomerizaciones y síntesis de enlaces éster y peptídicos se han llevado a cabo eficientemente en reacciones acuosas que contienen mezclas de solventes orgánicos. La adición de cosolventes a los medios de reacción por lo general incrementa la solubilidad de sustratos sin tener efecto en la especificidad de las enzimas.

Estos cambios en los medios de reacción también se pueden aplicar en caso de que una enzima multifuncional se quiera dirigir a una sola de sus reacciones de catálisis, por ejemplo, se ha reportado que existen variaciones en la actividad de esterasa y amidasa que presentan enzimas como la tripsina, papaína y subtilisina al añadir solventes orgánicos en el medio de reacción. En un medio con un 40 a 60% de DMF, DMSO o dioxano, estas enzimas no expresan actividad de amidasa, mientras que la actividad de esterasa permanece (Zaks, 1991; Deetz, 2001)

2.5.3 Hidrolasas:

Las hidrolasas, como todas las enzimas, se obtienen a partir del metabolismo de microorganismos o de diferentes tejidos animales y vegetales y en los últimos años han tenido una creciente aplicación en la biocatálisis. Alrededor del 75% de las enzimas empleadas a nivel industrial y en laboratorios de investigación es de tipo hidrolítica, lo cual se explica por la capacidad de este grupo de catalizar reacciones en las que se obtienen eficientemente intermediarios y productos enantioméricamente puros y confiere una gran importancia económica en las diferentes industrias, predominantemente en la farmacéutica. (Dixon, 1979; Fersht, 1997; Lehninger, 1997.)

Estos biocatalizadores rompen los enlaces químicos utilizando agua para sustituir los espacios necesarios. El esquema general de reacción es el siguiente:



En un medio acuoso, los factores que influyen en un proceso de hidrólisis son principalmente el pH, fuerza iónica y la temperatura, además de cambios de concentración y aditivos que pueden mejorar el proceso (Dixon, 1979; Fersht, 1997; Lehninger, 1997).

2.5.4 Ácido ferúlico esterasas

Estas enzimas, también conocidas como feruloilesterasas y cinamoil esterasas, son esterasas obtenidas de diferentes fuentes (hongos de las especies *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, entre otros), las cuales rompen preferentemente enlaces éster de cadenas hidrocarbonadas cortas y son capaces de llevar a cabo la hidrólisis de ácidos clorogénicos (Koseki, **2009**; Fazary **2008**; Faulds, **2009**).

En los últimos años el interés por estas enzimas ha incrementado de manera considerable, lo cual se demuestra con el aumento en su producción industrial ya que cuentan con funciones biotecnológicas que resultan muy útiles, así como el incremento dramático en las investigaciones y publicaciones que se han generado sobre desde 1990 sobre las mismas, siendo el número promedio de publicaciones de 242 durante el periodo de 1990 a 2000 y de 575 para el periodo de 2001 a 2008 (Fazary **2008**).

Entre las aplicaciones industriales de la AFE en la industria alimentaria, se puede mencionar su la completa degradación de los polímeros presentes en las paredes celulares, ya que los ácidos hidroxicinámicos enlazan la hemicelulosa con la lignina en los polisacáridos presentes en la pared celular, lo cual influye en propiedades como la extensibilidad, digestibilidad y en la capacidad de las enzimas que hidrolizan estos polisacáridos para llegar a los sustratos correspondientes. (Fazary, **2008**).

En el ciclo metabólico, estas enzimas son importantes para desesterificar la fibra dietética, estudios demostraron que una porción de ácidos hidroxicinámicos presentes en este alimento son liberados en el intestino como ácidos libres y absorbidos por el sistema circulatorio. Hasta la fecha se presume que, además de la AFE, los responsables de esta actividad que se presenta en el ciclo de la digestión pueden ser la hidrolasa de serina o bien alguna carboxilesterasa presente en la mucosa intestinal (Faulds, **2009**).

En la industria del papel permite un mayor acceso para enzimas oxidoreductasas, con lo que se remueven partículas finas y se mejora la solubilidad o el proceso de blanqueamiento que estos productos requieren durante su proceso.

Una de las aplicaciones que promete muchos beneficios es el uso de las enzimas como la AFE sobre los desperdicios que se obtienen de la agricultura para la obtención de compuestos con alto valor agregado. Otras aplicaciones potenciales incluyen la producción de compuestos medicinales, mejoramiento en la calidad en la producción de pan, la clarificación de jugos y bebidas, la producción de biocombustibles entre otros. (Koseki, Fushinobu, et al. **2009**)

Las AFE se clasifican en los tipos A, B, C y D, con base en la secuencia aminoacídica primaria y en la especificidad exhibida sobre cuatro sustratos modelos: cafeato de metilo, p-cumarato de metilo, ferulato de metilo y sinapato de metilo. Dentro de las enzimas estudiadas, las feruoilesterasas obtenidas a partir de *A. Níger*, *A. tubingensis* y *A. awamori* se clasifican como tipo A, tienen una secuencia similar a las lipasas obtenidas por hongos y muestran preferencia sobre sustratos con sustituyentes metoxilo, tales como ácido ferúlico y sinápico.

Las enzimas provenientes de *N. crassa* y *Penicillium funiculosum* se clasifican como de tipo B y actúan preferentemente en sustratos con una o dos sustituciones hidroxilo, tales como los ácidos p-cumárico y caféico. Las enzimas tipo C tienen secuencias similares a las tanasas obtenidas de hongos y exhiben una especificidad de sustratos más amplia, siendo activas hacia los ácidos ferúlicos, cumáricos, caféicos y sinápicos. Las enzimas de tipo D exhiben también una amplia actividad hacia diversos sustratos, además presentan actividad sobre sustratos que contienen residuos acetilados tales como 4-nitrofenilacetato. (Koseki, Fushinobu, et al. **2009**)

2.6 INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

2.6.1 Generalidades:

Los procesos catalizados por enzimas en la industria son cada día más numerosos, ya que presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores convencionales no biológicos:

- ✓ Presentan una gran actividad catalítica.
- ✓ Muestran una gran especificidad de sustrato.
- ✓ Son muy activos a temperatura ambiente y presión atmosférica.

A pesar de que existen estas ventajas, el empleo de enzimas no es una actividad generalizada en los procesos químicos industriales debido a que la mayoría de las enzimas no son estables en las condiciones de trabajo. Además, dado que son solubles en agua, no se logra una correcta y fácil separación de los sustratos y productos, por lo tanto se pierden y no se pueden reutilizar (Tu, **2006**)

La inmovilización de enzimas es un proceso que se puede definir como una restricción parcial de los grados de libertad de movimiento debido a una unión en diferentes puntos entre la enzima y un soporte.

Este proceso ofrece muchas ventajas que logran superar los inconvenientes en el uso de las enzimas a nivel industrial y permiten la obtención de un sistema biotecnológico que sea económicamente rentable.

Las principales ventajas del empleo de enzimas inmovilizadas son:

- ✓ Aumento de la estabilidad enzimática.
- ✓ Posible reutilización del derivado, lo que provoca una disminución en costos de proceso.
- ✓ Posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control, adaptado a la aplicación de la enzima inmovilizada.

Existen también algunas desventajas que se generan a partir de la inmovilización de una enzima, entre las que destacan:

- ✓ Una posible alteración de la conformación de la enzima respecto a su estado nativo.
- ✓ Pérdida de actividad enzimática durante la inmovilización (Arroyo, **1998**; Kennedy, **1985**).

Métodos de inmovilización:

En general, los métodos de inmovilización se pueden clasificar en dos grandes categorías:

- Retención física
- Unión química

Retención física:

1) Atrapamiento:

En este tipo de inmovilización, la enzima es retenida físicamente en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa, constituida generalmente por prepolímeros fotoentrecruzables o polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato o resinas de poliuretano.

Este tipo de proceso requiere poca cantidad de enzima para obtener derivados activos, además de que la enzima no sufre ninguna alteración en su estructura (Arroyo, **1998**; Kennedy, **1985**; Cao, **2005**).

2) Inclusión en membranas:

Este tipo de retención física está dividido en dos grupos:

- Microencapsulación: Las enzimas se rodean de membranas semipermeables que permitan el paso de moléculas de sustrato y producto, pero no de enzima. Las microcápsulas obtenidas son de forma esférica, con tamaños comprendidos entre 1 y 100 μm de diámetro.

Este método permite encapsular simultáneamente una gran variedad de enzimas, células o biomoléculas, permitiendo que se lleven a cabo determinadas reacciones que suceden en múltiples pasos.

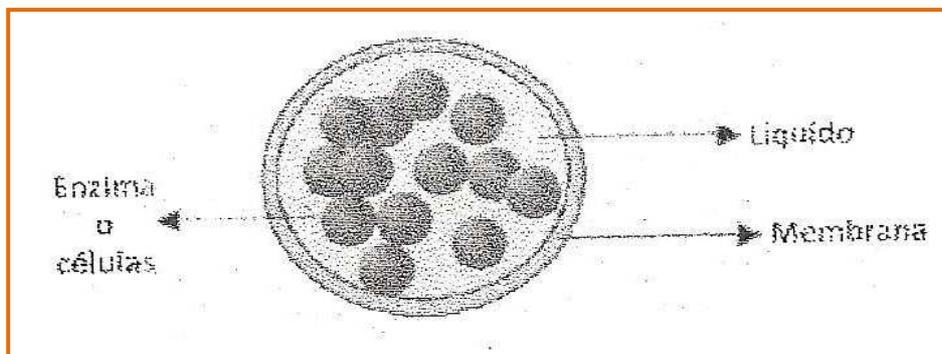


FIGURA 19. Inmovilización por microencapsulación. (Cao, 2005)

- Reactores de membrana: Emplean membranas permeables al producto final, permeables o no al sustrato inicial e impermeables a la enzima. Mediante una bomba se establece un flujo líquido de sustrato que atraviesa el reactor (Arroyo, **1998**; Kennedy, **1985**; Cao, **2005**).

Unión química:

1) Unión a soportes:

En este método se utiliza un soporte para unir a la enzima. La elección del soporte y del tipo de enlace resultan determinantes en el comportamiento posterior del biocatalizador. Además el soporte debe tener resistencia mecánica adecuada a las condiciones de operación del reactor y ser fácilmente separable del medio líquido para que pueda ser reutilizado.

El material con el que están hechos los soportes difieren en tamaño, densidad, porosidad y forma; algunos ejemplos son:

Piedra pómez, sílice, arcillas como la bentonita, óxidos de metales, vidrio de tamaño de poro controlado, vidrio no poroso, alúmina, cerámicas, celulosa, almidón, dextranos, agares, proteínas fibrosas como colágeno y queratina, poliolefinas, polímeros acrílicos, entre muchos otros.

Las enzimas se pueden unir a estos soportes mediante adsorción o por unión covalente (Arroyo, **1998**; Kennedy, **1985**; Cao, **2005**).

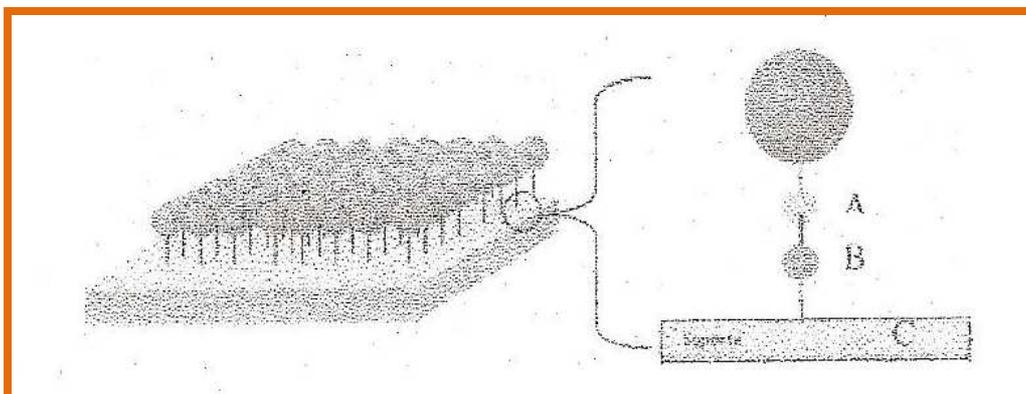


FIGURA 20. Inmovilización por enlace covalente. (A) Residuo activo de aminoácido; (B) Grupo funcional de unión al soporte; (C) soporte (Cao, 2005)

2) Reticulado:

También denominado entrecruzamiento o *cross-linking*, consiste en el uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de enzima. Como reactivos bifuncionales se pueden emplear: dialdehídos, diiminoésteres, diisocianatos, sales de bisdiazonio, entre otros. Con esto se obtienen enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura.

Existe el co-reticulado, el cual es un método que permite eliminar las pérdidas de actividad enzimática ocasionadas por efectos difusionales, mediante el entrecruzamiento de las enzimas con una proteína sin actividad enzimática y rica en residuos de lisina (Arroyo, **1998**; Kennedy, **1985**; Cao, **2005**).

Efectos de la inmovilización:

✓ Estabilidad: Generalmente se observa un incremento en la estabilidad de las enzimas después de su inmovilización. Esto se debe principalmente a:

- La existencia de uniones multipuntuales enzima-soporte provocan una estabilidad conformacional de la enzima, por lo que la estructura terciaria de la proteína adquiere una mayor rigidez y se hace más resistente a la desactivación térmica o química. Esto se obtiene únicamente en métodos en los que intervienen enlaces de tipo covalente.
- Protección frente a proteasas presentes en el medio: Se ha observado que las proteasas unidas a un soporte disminuyen su capacidad proteolítica.
- Se evita la agregación intermolecular.

✓ Actividad enzimática: Tras la inmovilización, la actividad enzimática puede disminuir e incluso perderse por diversas razones:

- La unión al soporte se produce de tal forma que el paso del sustrato al centro activo está impedido.
- Los grupos reactivos del soporte reaccionan con algún aminoácido que forme parte del centro activo o que sea esencial para la actividad catalítica de la enzima.

- La inmovilización puede originar un cambio conformacional que da lugar a una forma inactiva.
- Las condiciones experimentales del proceso causan la desnaturalización o desactivación de la enzima (Arroyo, **1998**; Cao, **2005**)

Aplicaciones de las enzimas inmovilizadas:

Las aplicaciones más importantes de las enzimas inmovilizadas se pueden clasificar en:

- 1) Aplicaciones analíticas: biosensores.
- 2) Aplicaciones médicas: tratamientos con enzimas inmovilizadas.
- 3) Aplicaciones industriales: en la industria química, farmacéutica, alimentaria y de tratamiento de residuos.

Ejemplos de aplicaciones en la industria alimentaria:

➤ Hidrólisis de proteínas:

Se obtienen hidrolizados de proteínas de trigo mediante el uso de pepsina y proteasa coinmovilizadas en quitosan. Otras proteasas inmovilizadas han sido empleadas en la disminución del contenido de lactoglobulina en leche, en la industria quesera y en la solubilización de concentrados protéicos de pescado.

➤ Hidrólisis de hidratos de carbono:

Se elimina la lactosa de la leche y productos lácteos, tratando la leche con β -galactosidasa de levaduras inmovilizadas en fibras de acetato de celulosa.

Se degrada almidón procedente de diversas fuentes vegetales como el maíz, mediante la utilización de amilasa, glucoamilasa y glucoisomerasa inmovilizadas. De esta manera se consigue un jarabe enriquecido con fructosa, que sirve de edulcorante en bebidas refrescantes y gaseosas.

La pectinasa se emplea para hidrolizar la pectina, componente estructural de frutas y verduras. Este procedimiento permite la obtención de un zumo menos viscoso y más concentrado. La pectinasa se emplea inmovilizada sobre diferentes soportes (PVC, poliéteres, poliacrilamidas, alúmina, entre otros) (Arroyo, **1998**).

2.6.2 Eupergit C

El producto comercial Eupergit C es una matriz hecha a base de partículas casi esféricas y microporosas, que contienen canales, poros y huecos y cuentan con un diámetro de aproximadamente 100 -250µm. Se obtienen por la copolimerización de metilacrilamida, N,N'-metilen-bis acrilamida y un monómero que contenga grupos oxirano.

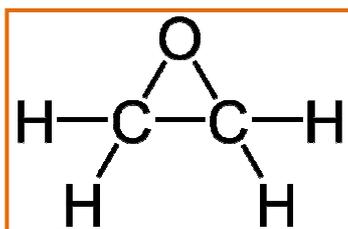


FIGURA 21. Grupo oxirano

Para llevar a cabo la inmovilización, tiene que ocurrir un enlace entre los grupos oxirano de la matriz y el grupo amino o tiol de las moléculas proteicas, lo que deriva en un enlace covalente como se muestra en la figura 24.

Se han propuesto para este proceso un mecanismo de unión que consta de 2 pasos:

En el primer paso, la enzima es adsorbida en el soporte mediante interacciones hidrofóbicas, lo que provoca que los grupos amino y tiol se expongan en la superficie de la enzima y permanezcan muy cerca de los grupos oxirano del soporte.

En el segundo paso, se lleva a cabo una reacción con los grupos oxirano mediante un ataque nucleofílico. De esta manera se forman uniones C-N y C-S muy estables. (Boller, Meier et al. **2002**)

En la superficie existe una gran densidad de grupos oxirano, lo que promueve un enlace en múltiples puntos que supone un incremento en la estabilidad conformacional de la enzima y permite una estabilidad operacional a largo plazo.

El Eupergit C ha sido empleado para la inmovilización de una gran variedad de enzimas. Como ejemplo se puede mencionar la inmovilización de la enzima β-glucosidasa (Zhang et al. **2006**), en donde como resultado de esta reacción hubo un aumento en la estabilidad de la enzima sobre la temperatura al compararse con la enzima libre, un aumento en la Km, y la capacidad de reciclar la enzima durante los procesos de hidrólisis.

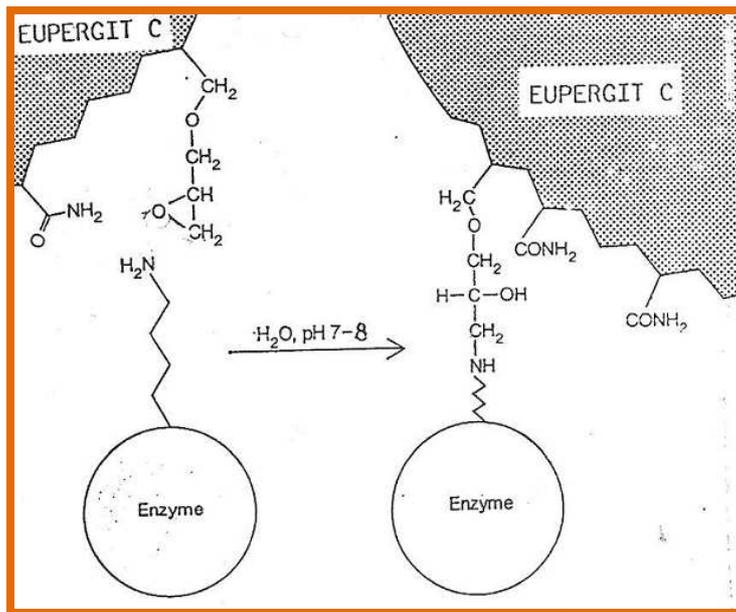


FIGURA 22. Inmovilización en Eupergit C

3. HIPÓTESIS

La Ácido Ferúlico Esterasa inmovilizada podrá ser recuperada y reutilizada después de una reacción catalítica y presentará estabilidad durante su almacenamiento, lo que generará un mayor aprovechamiento del biocatalizador con el cual se obtendrá Ácido Caféico mediante la hidrólisis de Ácidos Clorogénicos.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Inmovilizar la enzima Ácido Ferúlico Esterasa en Eupergit C y monitorear la estabilidad que presenta al ser reutilizada y almacenada con el fin de lograr un mayor aprovechamiento del biocatalizador en la obtención del Ácido Caféico mediante la hidrólisis de Ácidos Clorogénicos.

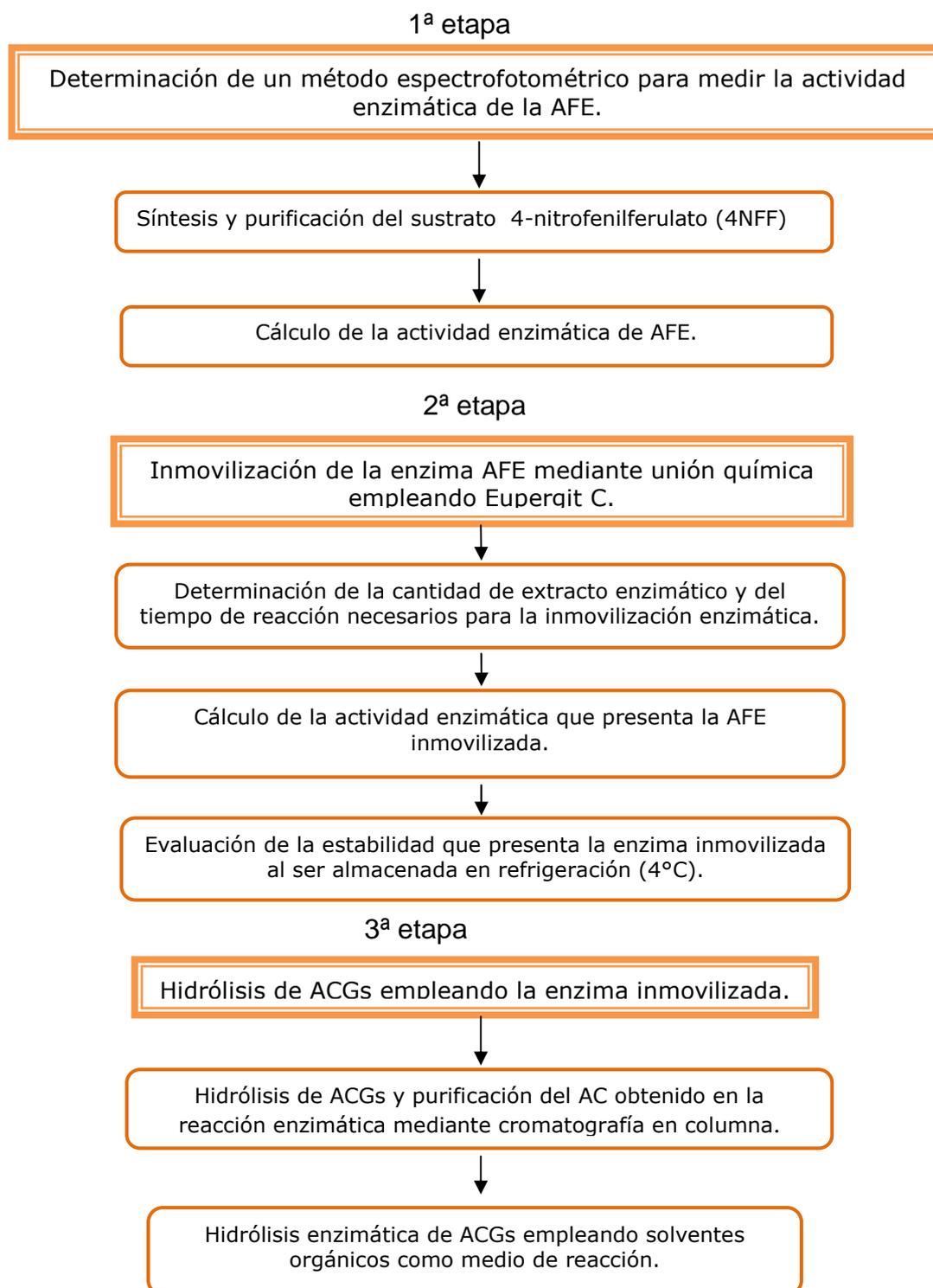
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Aplicar un método rápido y sencillo para determinar la actividad enzimática de AFE.
- ✓ Inmovilizar de manera eficiente la AFE.
- ✓ Evaluar la estabilidad que presenta la enzima inmovilizada durante su almacenamiento.
- ✓ Hidrolizar Ácidos Clorogénicos utilizando como catalizador la enzima inmovilizada.

5. METODOLOGÍA

5.1 DIAGRAMA GENERAL DE LA INVESTIGACIÓN

Este trabajo está dividido en tres etapas que se presentan en el siguiente diagrama:



5.2 MATERIALES Y METODOS

5.2.1 Reactivos y equipos:

5.2.1.1 Determinación de la actividad enzimática por medio de un espectrofotómetro:

El estándar de 4NFF fue sintetizado empleando ácido ferúlico y 4-nitrofenol de la marca SIGMA. Para esta reacción también se utilizó diciclohexilcarbodiimida (DCC), piridina y trietilamida de la marca SIGMA - ALDRICH, así como dioxano de la marca J.J BAKER. Durante la reacción fue necesaria una atmósfera de nitrógeno, cuya fuente fue a partir de un tanque con nitrógeno comprimido de la marca PRAXAIR. Durante la purificación del 4NFF se empleó sílica gel 60 de la marca MACHEREY-NAGEL, además de hexano, metanol, dicolorometano, acetona de las marcas REASOL Y DISTRIBUIDORA QUÍMICA ALVI.

Las determinaciones cromatográficas se hicieron con sulfato cérico de la marca SIGMA - ALDRICH y DPPH de la marca SIGMA - ALDRICH.

Se empleó una columna cromatográfica de la marca VI-LAB.

El rotavapor era de la marca BÜCHI y el modelo R-215.

5.2.1.2 Reacción enzimática:

Se emplearon dos extractos enzimáticos comerciales: Depol 740L y Depol 670L. De acuerdo a la información técnica de estos extractos, la Depol 740L es un líquido color café que presenta únicamente actividad de Ácido Ferúlico Esterasa, la fuente biológica de esta proteína es la bacteria *Humicola sp* y el rango de pH óptimo de reacción es de 4-6. El extracto Depol 670L es un líquido color café que presenta actividad de celulasa y pectinasa y en menor proporción presenta actividad de AFE, la fuente biológica es una mezcla patentada de enzimas de hongos y presenta un pH óptimo de reacción de 4-6. Para determinar la actividad enzimática de la AFE se empleó el sustrato sintetizado 4NFF. Para la actividad enzimática de las pectinasas y celulasas presentes en el extracto Depol 670L se emplearon ácido galacturónico, glucosa, CMC, pectina y DNS de la marca SIGMA - ALDRICH.

5.2.1.3 Inmovilización enzimática:

El soporte empleado para la inmovilización enzimática es Eupergit de la marca SIGMA-ALDRICH. En esta metodología se empleó glicina de la marca J.T.BAKER.

La inmovilización se realizó en un agitador orbital THERMO SCIENTIFIC MAXQ 4000, y el modelo SHKE4000-5.

5.2.1.4 Hidrólisis de Ácidos Clorogénicos:

El ACG empleado era un estándar de la marca SIGMA-ALDRICH.

Para llevar a cabo la reacción de hidrólisis se empleó el agitador orbital previamente mencionado.

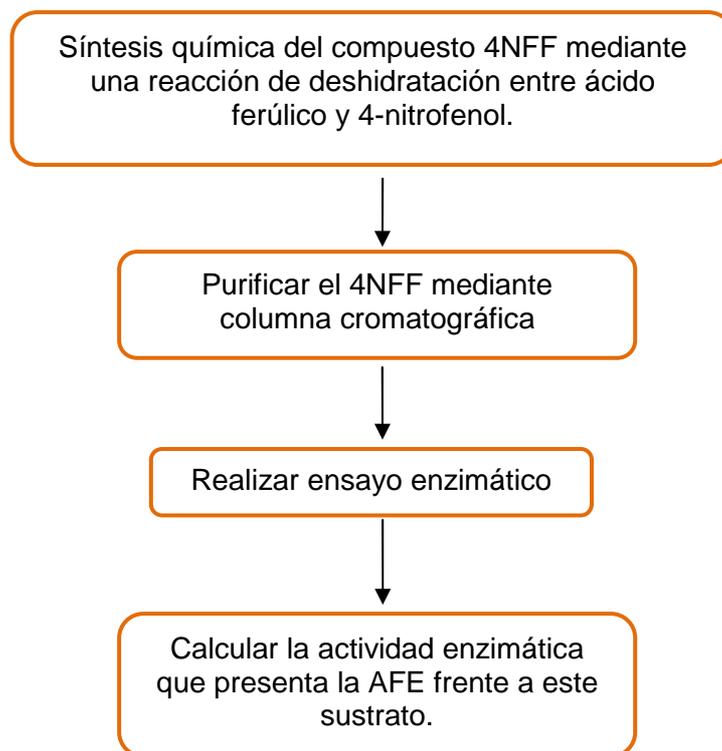
5.2.1.5 Purificación del Ácido Caféico:

El estándar del AC es de la marca SIGMA - ALDRICH. Para la purificación se empleó la sílica gel previamente citada. Se usaron los solventes etanol, diclorometano, metanol y acetona de la marca REASOL y DISTRIBUIDORA QUÍMICA ALVI.

5.3 DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

5.3.1 PRIMERA ETAPA: DETERMINACIÓN DE UN MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA MEDIR LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE AFE PRESENTE EN Depol 740L y Depol 670L.

Diagrama general:



5.3.1.1 Síntesis y purificación del 4NFF

Se aplicaron los procedimientos descritos por Mastihuba y cols., (2002) y Hegde y cols., (2009) para sintetizar el compuesto 4NFF mediante una reacción de deshidratación entre ácido ferúlico y 4NF.

En un matraz bola con una cantidad de 2.49g de ácido ferúlico disuelto en 28mL de dioxano seco se añadió gota por gota una solución de 1.81g de 4-nitrofenol disuelto en 28 mL de dioxano seco. La mezcla de reacción se convirtió en básica añadiéndole 2 mL de piridina y 2 mL de trietilamina. Se dejó agitar por 10 minutos y se le añadió 2.7g de DCC sólido en porciones de 200mg por intervalos de 3 minutos. Durante toda la metodología, la mezcla de reacción fue agitada en una atmósfera de nitrógeno a 25°C.

Se dejó agitar por 8 horas e inmediatamente se refrigeró por 30 minutos. La mezcla se filtró y el filtrado obtenido se concentró con presión reducida. Se realizó una cromatografía en placa fina para monitorear la presencia del 4NFF en el filtrado obtenido.

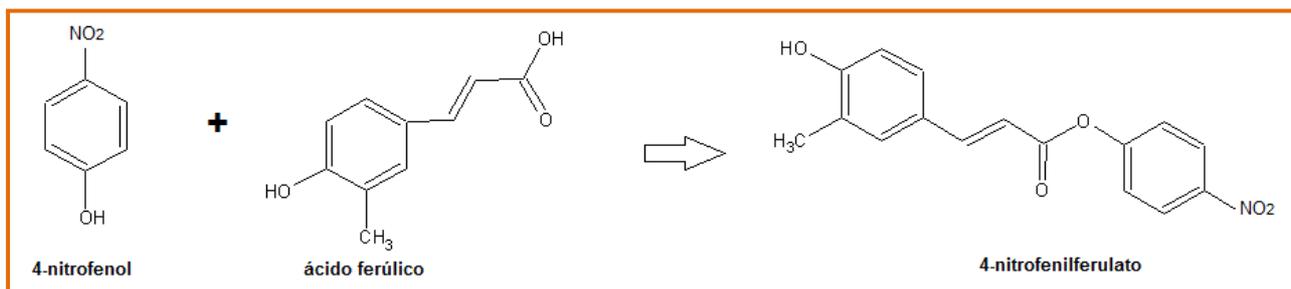


FIGURA 23. Obtención de 4NFF mediante la reacción entre 4NF y ácido ferúlico

La mezcla de reacción en estado sólido se purificó en una columna cromatográfica empleando las siguientes condiciones:

Fase estacionaria: sílica gel para capa fina.

Fase móvil: diclorometano-hexano (8:2).

Diámetro de la columna: 6cm

Se coleccionaron fracciones de 40mL y cada una de éstas se monitoreó en cromatografía en capa fina. Las condiciones que se emplearon fueron las siguientes:

Fase estacionaria: sílica gel para capa fina.

Fase móvil: diclorometano-hexano (8:2).

Revelador: sulfato cérico.

Las fracciones con el contenido de 4NFF puro se juntaron y se concentraron a presión reducida. La muestra final se pesó y se determinó el rendimiento.

Al 4NFF sintetizado se le determinó el punto de ebullición y se envió a RMN para garantizar su pureza y autenticidad.

5.3.1.2 Actividad enzimática de AFE presente es D740L y D670L

Se determinó la proteína total presente en Depol 740L y Depol 670L empleando la metodología de Bradford con un estándar de albúmina de suero bovino (ASB).

Este método se basa en la unión específica del colorante azul de Coomassie brillante G250 a los residuos de Arg, Trp, Tyr, His y Phe de las proteínas produciendo una absorbancia máxima a 595nm, mientras que el colorante libre tiene una absorbancia máxima a 470nm.

En un tubo de ensaye se agregaron 0.4mL de una muestra de extracto enzimático con una dilución 1:4000 y 0.1mL del reactivo de Bradford y se agitó con vortex. La mezcla de reacción se dejó en reposo por 5 minutos y se realizó una lectura en espectrofotómetro a 595nm. Las determinaciones se hicieron por duplicado.

Para realizar el ensayo enzimático, se siguió el procedimiento descrito por Mastihuba y cols. (2002), en donde se indica que la solución con el sustrato se prepara mezclando 9 volúmenes de una solución de fosfato de potasio 0.1M y pH 6 con un volumen de una solución 11mM del compuesto 4NFF seguido de un vortex inmediato. La mezcla de reacción se prepara de un volumen del extracto enzimático con 10 volúmenes de la solución con sustrato.

En este caso, se preparó una solución que contenía 0.9mL de fosfato de potasio 0.05M y pH 6 con 0.1mL de una solución 11mM del compuesto 4NFF en DMSO conteniendo 2.5% de Triton X-100. Para el ensayo enzimático se le agregó 0.1mL de extracto enzimático con una dilución 1:5.

El medio de reacción con el extracto enzimático formaba un volumen total de 1.1mL con una concentración de sustrato de 1mM.

La reacción enzimática se llevó a cabo a 40°C y 50°C, así como en un tiempo de reacción de 10, 20, 40 y 60 minutos para determinar dentro de estas condiciones cuáles serían más óptimas para obtener mayor actividad enzimática en el menor tiempo posible. Se agitó a 900 rpm y las determinaciones se realizaron por triplicado. Para detener la reacción enzimática, las muestras se colocaban dentro de agua hirviendo inmediatamente después de cumplido el tiempo de reacción.

La actividad enzimática se determinó en un espectrofotómetro a 410nm y la concentración de 4NF se calculó mediante una curva patrón.

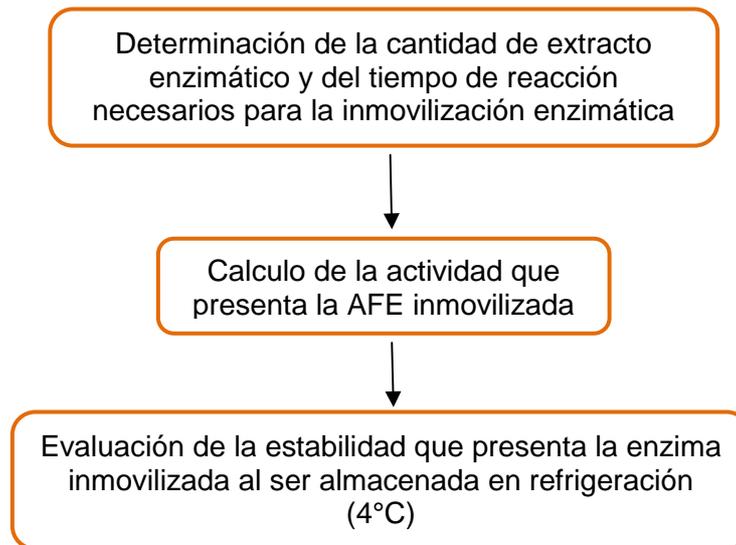
5.3.1.3 Actividad enzimática de celulasa y pectinasa presente en D670L

Celulasas: Se preparó una solución de CMC al 1% en agua destilada. Se mezcló una cantidad de 0.5mL de la solución de CMC preparada con 0.4mL de buffer de acetato sódico 0.1M y pH 5. La mezcla de reacción se incubó por 5 minutos a 50°C y se le agregó 100µL del extracto enzimático. Se incubó por 90 min a la misma temperatura y después de cumplido el tiempo se le agregó 1mL de solución de DNS. La mezcla final se deja en un baño de agua hirviendo por 5 minutos e inmediatamente después se colocan en hielo para detener la reacción. Se determinó la lectura que presenta la mezcla en un espectrofotómetro a 540nm y la actividad enzimática se calcula empleando una curva patrón de glucosa.

Pectinasas: Se preparó una solución de pectina al 1% en agua destilada. Se mezclaron 0.5mL de la solución de pectina preparada con 0.4mL de buffer de acetato sódico 0.1M y pH 5. La mezcla de reacción se incubó por 5 minutos a 45°C y se le agregó 100µL del extracto enzimático. Toda la mezcla se incubó por 20 minutos a 45°C y después del tiempo requerido se le agregó 1mL de solución de DNS. La mezcla final se deja en un baño de agua hirviendo por 5 minutos e inmediatamente después se colocan en hielo para detener la reacción. Las pectinas precipitaron, por lo que la mezcla de reacción se centrifugó por 10 minutos a 500rpm. Para determinar la actividad enzimática de las pectinasas se determinó la lectura que presenta la mezcla en un espectrofotómetro a 540nm y se calculó empleando una curva patrón de ácido galacturónico.

5.3.2 SEGUNDA ETAPA: INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA DE LA AFE MEDIANTE UNIÓN QUÍMICA EMPLEANDO EUPERGIT C COMO SOPORTE.

Diagrama general:



5.3.2.1 *Determinación de la cantidad de proteína y tiempo de reacción para la reacción de inmovilización*

La inmovilización enzimática se realizó en Eupergit C de acuerdo al procedimiento estándar presentado en las hojas técnicas del producto. (Röhm-Pharma, Industrial Products Division).

Para determinar los parámetros de inmovilización más eficientes, se evaluó el rendimiento que presentaron las soluciones de la tabla 1. La reacción se dejó por un tiempo de 24 y 48 horas para cada caso.

TABLA 1. Parámetros evaluados durante inmovilización de AFE			
Extracto enzimático (µL)	Proteína (mg)	Amortiguador de fosfatos (1M; pH 7.5) (µL)	H2O destilada (µL)
62.5	1.85	500	437.5
125	3.71	500	375
250	7.42	500	250
500	14.81	500	0

Cada reacción tenía un volumen total de 1mL. La solución enzimática se añadió uniformemente a 125mg del soporte y la mezcla se hizo en un recipiente suficientemente amplio para que se pudiera llevar a cabo el contacto entre la enzima y el Eupergit C.

Se agitó a 150rpm y a temperatura de refrigeración (4°C) por el tiempo seleccionado para cada una de las determinaciones y finalmente la mezcla de reacción se lavó 5 veces con buffer de fosfatos 0.05M y pH 6.

Para remover el exceso de grupos oxiranos, el soporte se agitó a 150 rpm por 16 horas a una temperatura de refrigeración con una solución de glicina 1M en amortiguador de fosfatos 0.5M y pH 7.5.

Cada una de las determinaciones se realizó por triplicado y la enzima inmovilizada se almacenó con amortiguador de fosfatos 0.05M y pH 6 a temperatura de refrigeración (4°C).

5.3.2.2 Cálculo de la actividad que presenta la AFE inmovilizada

Para la enzima inmovilizada, así como la almacenada, la determinación de la actividad enzimática se realizó de acuerdo a los trabajos previamente mencionados de Mastihuba y cols., (2002); Hegde y cols., (2009) empleando como sustrato el 4NFF.

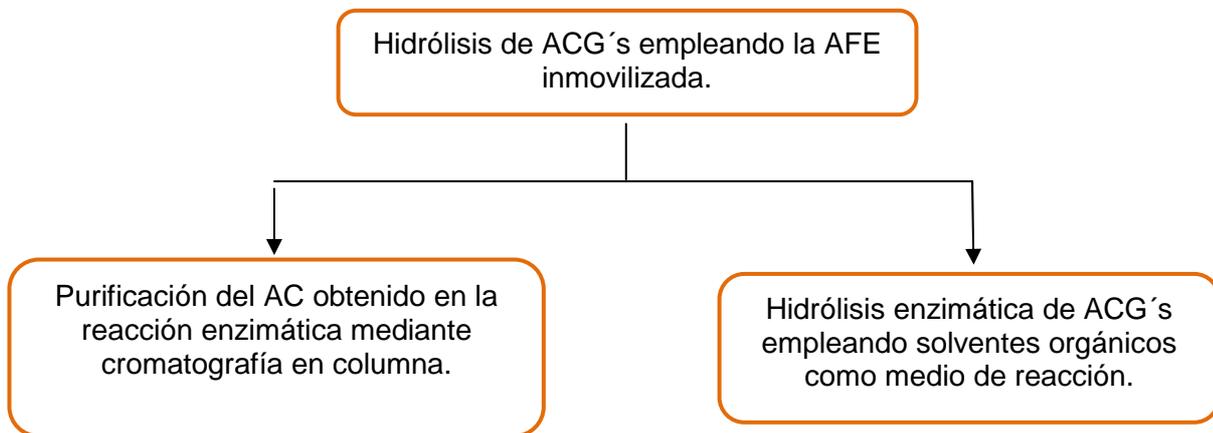
Para determinar la actividad que presentaba el sobrenadante de la reacción así como la enzima inmovilizada, se emplearon los procedimientos descritos previamente, empleando una cantidad de 0.1mL de sobrenadante en un volumen total de 1.1mL y una cantidad de 10mg de enzima inmovilizada en un volumen total de 1mL.

5.3.2.3 Evaluación de la estabilidad que presenta la enzima inmovilizada al ser almacenada en refrigeración (4°C).

Se evaluó la actividad de la enzima inmovilizada almacenada 30 y 60 días sin haber sido utilizada para reacciones enzimáticas y se evaluó la actividad de la enzima inmovilizada almacenada 30 y 60 días utilizada y recuperada de reacciones enzimáticas.

5.3.3 TERCERA ETAPA: HIDRÓLISIS DE ACGs Y PURIFICACIÓN DE AC.

Diagrama general:



5.3.3.1 *Hidrólisis de ACG's empleando la AFE inmovilizada*

Se llevó a cabo la hidrólisis de un estándar de ACGs utilizando como biocatalizador el soporte de la enzima FAE inmovilizada.

Para obtener el tiempo que se requiere en esta reacción enzimática, se realizó una determinación a pequeña escala en la cual se evaluó cada 20 minutos la presencia del AC en el medio de reacción mediante CCF.

Condiciones:

Fase estacionaria: Cromatoplasmas de sílica gel para capa fina

Fase móvil: diclorometano – etanol – a. acético (9:6:0.5)

Revelador: DPPH al 0.2% en metanol.

En un tubo de ensaye se agregó 1mg de ACGs en 1mL de buffer de fosfatos 0.05M y pH 6. La mezcla se agitó hasta la completa disolución del sustrato.

La solución preparada se agregó a un tubo de ensaye con 10mg de soporte con enzima inmovilizada y se agitó a 250rpm y 50°C.

Una vez que se determinó el tiempo, se realizó la reacción enzimática a mayor escala utilizando las mismas condiciones.

5.3.3.2 *Purificación del ácido caféico obtenido mediante cromatografía en columna*

La mezcla de reacción obtenida se filtró para separar el soporte inmovilizado y el papel filtro se lavó para recuperar el ácido cafeico que pudo haberse absorbido en éste.

El filtrado se concentró a presión reducida.

La purificación se realizó en una columna cromatográfica que tenía las siguientes condiciones:

Fase estacionaria: sílica gel para capa fina

Fase móvil: diclorometano – etanol (9:6)

Diámetro de la columna: 2cm

Durante la purificación, se coleccionaron fracciones de 15mL y se monitorearon en CCF para determinar en cuales fracciones estaba presente el ácido cafeico.

Las condiciones del sistema fueron las siguientes:

Fase estacionaria:

Sílica gel para capa fina

Fase móvil:

Diclorometano –etanol –ac. acético (9:6: 0.5)

Revelador:

Radical – DPPH al 0.2% en metanol

Las fracciones que contenían el ácido cafeico en su forma más pura se juntaron y se concentraron a presión reducida.

Finalmente se determinó el rendimiento de la metodología y se caracterizó el ácido cafeico por cromatografía en capa fina comparándolo con un estándar, así como comparando el punto de ebullición entre ambos.

La enzima inmovilizada que se separó de la mezcla de reacción se lavó con buffer de fosfatos y se almacenó a temperatura de refrigeración.

5.3.3.3 *Hidrólisis enzimática de ACG empleando dioxano, isopropanol y acetona como medio de reacción.*

Se determinó la capacidad de la enzima inmovilizada de llevar a cabo la reacción de hidrólisis de ácidos clorogénicos en solventes orgánicos.

Las reacciones enzimáticas se hicieron bajo las siguientes condiciones:

TABLA 2. Parámetros de reacción de ACGs empleando solventes orgánicos	
Solvente orgánico	Condiciones de reacción
Dioxano (10% agua)	ACG (1mg/mL); 50°C; 250rpm; 6; 12; 18; 24 hrs, 10mg de enzima inmovilizada.
Isopropanol (10% agua)	
Acetona (10% agua)	

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 PRIMERA ETAPA

6.1.1 *Determinación de un método espectrofotométrico para medir la actividad enzimática de AFE presente en Depol 740L y Depol 670L*

En este trabajo experimental se aplicó un método espectrofotométrico para determinar la actividad de AFE basado en los trabajos de Mastihuba y cols., (2002) y Hegde y cols., (2009) en donde se utiliza como sustrato 4NFF.

El 4NFF es un compuesto poco estable, por lo que no se obtiene de manera comercial. Por esta razón, fue necesario sintetizarlo mediante la reacción de deshidratación entre ácido ferúlico y 4-nitrofenol en un medio básico y una atmósfera de nitrógeno. (Figura 23)

La reacción se dejó durante 8 horas, periodo en el cual se forma el 4NFF y como compuesto residual una sal llamada diciclohexilurea. Dado que esta sal no es soluble y el compuesto de interés está disuelto en la solución, la mezcla de reacción se refrigeró por 30 minutos para garantizar la completa precipitación de la sal y se filtró para eliminarla. El filtrado obtenido se concentró en un rotavapor mediante presión reducida y se purificó en una columna cromatográfica.

Condiciones:

Fase estacionaria:

Sílica gel para capa fina.

Fase móvil:

Diclorometano – hexano (8:2)

Diámetro de columna: 6cm.

Se utilizaron 1250mL de fase móvil y se coleccionaron 23 fracciones de aproximadamente 40mL, cada una fue monitoreada con cromatografía en capa fina (CCF) para reconocer aquellas en donde estaba presente el compuesto 4NFF en su forma más pura.

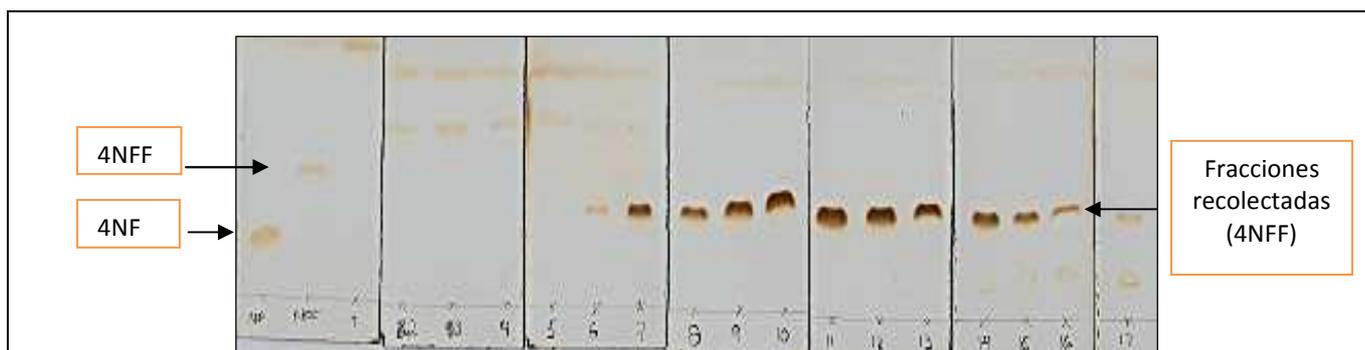


Figura 24. Cromatoplaqa para identificar fracciones que contienen 4NFF.

Condiciones:

Fase estacionaria: sílica gel para capa fina; *Fase móvil:* diclorometano – hexano (8:2); *Revelador:* sulfato cérico.

Muestras: NF: Nitrofenol (Rf: 0.26); 4NFF: Nitrofenilferulato (Rf: 0.47); 1-17: Fracciones recolectadas durante la purificación en columna. 7-15 Fracciones recolectadas con el 4NFF puro (Rf: 0.47).

La figura 24 muestra la cromatoplaqa empleada para identificar las fracciones que contienen el 4NFF en su forma más pura. Se puede observar que las fracciones correspondientes a los números 7 - 15 contienen este compuesto, ya que las marcas coinciden con el Rf del estándar, por lo que se juntaron y se concentraron con presión reducida.

Se obtuvo un total de 0.96g de 4NFF, lo que representa un rendimiento de 53% (ANEXO I). Este rendimiento es aceptable si se considera el rendimiento obtenido en los trabajos previamente mencionados, los cuales reportan un 50%.

El producto final presentó un punto de ebullición de 176 – 178°C, lo que coincide con el dato presente en los resultados de Hegde y cols., (2009).

Finalmente, el compuesto obtenido fue caracterizado con resonancia magnética nuclear (^1H y ^{13}C) empleando acetona deuterada (ANEXO Ia).

El ^1H para 4NFF mostró señales en 3.94, 6.45, 6.95, 7.07, 7.15 y 7.82, pertenecientes al ácido ferúlico y señales en 7.35 y 8.28 del 4-nitrofenol. La ausencia de una señal en el espectro en 9.57, la cual representa el grupo funcional –COOH, confirma la esterificación de los compuestos.

En el caso de ^{13}C , se identificó una señal a 164.30 correspondiente a la porción esterificada, a 55.71 del grupo metoxilado en el ácido ferúlico y las señales pertenecientes a los grupos aromáticos del 4-nitrofenol y ácido ferúlico. Además, la ausencia de la señal

a 168.13 perteneciente al grupo carboxilo del ácido ferúlico, confirma la unión de estos compuestos.

6.1.2 Actividad enzimática de Acido Ferúlico Esterasa

Se determinó la cantidad de proteína presente en los extractos Depol 740L y Depol 670L mediante el método de Bradford. Se utilizó una curva estándar de albúmina de suero bovino ($R^2=1$) y las muestras se realizaron por duplicado (ANEXO II).

De acuerdo a la ficha técnica de D670L, este extracto contiene, además de la AFE, pectinasa y celulasa, mientras que D740L reporta únicamente actividad de AFE.

TABLA 3. Cantidad de proteína presente en extractos enzimáticos comerciales.	
Extracto enzimático	Cantidad de proteína (mg/mL)
Depol 670L	42.81
Depol 740L	29.70

Se realizó un ensayo enzimático para determinar la actividad específica que presenta la AFE en el extracto Depol 740L y la actividad de AFE, celulasa y pectinasa que presenta el extracto Depol 670L empleando como sustratos el 4NFF sintetizado para AFE, CMC para celulasa y pectina para pectinasa.

Se evaluó la actividad de AFE a dos diferentes temperaturas (40°C y 50°C) y a 10, 20, 40 y 60 minutos de reacción para determinar los parámetros de tiempo y temperatura de reacción que permitieran calcular la actividad enzimática de manera rápida y confiable durante el proceso de inmovilización.

La metodología empleada para calcular la actividad de la AFE presente en los extractos enzimáticos se basó en los trabajos de Mastihuba y cols. (2002)

El sustrato 4NFF no es soluble en soluciones acuosas, por lo que es necesario utilizar un cosolvente para poder realizar el ensayo enzimático. Se preparó una mezcla de 0.9mL de buffer de fosfato de potasio 0.05M y pH 6, conteniendo 2.5% de Triton X-100 con un volumen de 0.1mL de una solución 11mM de 4NFF en DMSO seguido de agitación inmediata.

La mezcla de reacción estaba compuesta de 1mL de solución con el sustrato y 0.1mL de extracto enzimático con una dilución 1:5.

En total se utilizó un volumen de reacción de 1.1mL en donde la concentración del sustrato 4NFF era de 1mM y la cantidad de proteína de 0.594mg al utilizar el extracto D 740L y de 0.850mg al utilizar el extracto D 670L. Las reacciones se hicieron por triplicado.

La hidrólisis enzimática del 4NFF provoca la separación del 4NF y el ácido ferúlico; el primer compuesto otorga al medio una coloración amarilliza que incrementa directamente proporcional a su concentración, por lo que al haber mayor actividad enzimática, habrá una mayor coloración en la solución que es medida espectrofotométricamente.

Una vez terminado el tiempo de incubación y agitación para cada caso, las muestras se metieron por 5 minutos en agua hirviendo para detener la actividad enzimática y las lecturas se hicieron a 410nm.

En las curvas de absorbancia vs tiempo de reacción (ANEXO IIa), se observa que la reacción llevada a cabo a una temperatura de 50°C presenta una absorbancia hasta diez veces mayor que la reacción hecha a 40°C para cada uno de los casos. Además, la absorbancia que presenta el extracto enzimático D740L es mayor que la absorbancia que presenta D670L bajo las mismas condiciones de reacción.

En la curva de absorbancia vs tiempo de reacción de las determinaciones hechas a 50°C (ANEXO IIa) se puede observar que la velocidad inicial de la reacción, en donde la enzima transforma el sustrato en producto siguiendo un comportamiento lineal, se manifiesta aproximadamente en los primeros 20 minutos de reacción.

De acuerdo a estos resultados, se determinó que la actividad de la enzima sería monitoreada utilizando los parámetros de 50°C y 10 minutos de reacción.

La actividad específica de AFE se calculó empleando una curva patrón de 4-nitrofenol ($R^2=0.999$) (ANEXO IIa)

TABLA 4. Actividad específica de AFE, celulasas y pectinasas presentes en Depol 740L y Depol 670L		
	Extracto Depol 740L (U/mg de proteína)	Extracto Depol 670L (U/ mg de proteína)
Ácido ferúlico esterasa	0.06	0.009
Celulasa	N/A	97.51
Pectinasa	N/A	137.27

El extracto enzimático D670L muestra baja actividad de AFE comparado con D740L bajo las mismas condiciones de reacción, lo que indica que por cada mg de proteína, el extracto D740L presenta mayor actividad de AFE que en el caso de D670L. Además, para realizar la inmovilización enzimática de la AFE presente en el extracto D670L, sería necesario purificar la enzima para eliminar a las celulasas y pectinasas, lo que implicaría pérdidas de la enzima durante el proceso y por ende, se obtendrían bajos rendimientos.

Se determinó realizar la inmovilización enzimática empleando como sustrato el extracto D740L.

6.2 SEGUNDA ETAPA

6.2.1 Inmovilización enzimática de AFE mediante unión química empleando Eupergit C como soporte.

Para la inmovilización enzimática se utilizó como soporte Eupergit C y la metodología se basó en el procedimiento estándar presentado en las hojas técnicas del mismo (Röhm-Pharma, Industrial Products Division).

En un principio esta actividad se realizó a pequeña escala para determinar la cantidad de enzima y el tiempo de contacto entre la enzima y el soporte con el que se obtiene un alto rendimiento. La actividad se realizó con 62.5µL de extracto enzimático (equivalente a 1.85mg de proteína), 125µL (equivalente a 3.71mg de proteína), 250µL (equivalente a 7.42mg de proteína) y 500µL (equivalente a 14.81mg de proteína) utilizando una cantidad específica de Eupergit C de 125mg en cada caso.

Además, se evaluó la eficiencia que presentó el tiempo de contacto en la reacción entre la enzima y el soporte de 24 y 48 horas. Las muestras se dejaron agitar a 4°C y al pasar el tiempo respectivo para cada una, se lavaron con buffer de fosfatos (0.05M).

Dado que el soporte está compuesto por grupos oxirano, es necesario remover el exceso de éstos para evitar que aquellos que no reaccionaron con la AFE, lo hagan con los grupos funcionales de las mismas enzimas ligadas modificando su estructura terciaria, o bien, con algún otro compuesto presente en el medio. Para llevar a cabo esto, el soporte se hizo reaccionar por 16 horas con una solución de glicina 1M. Finalmente, las muestras se lavaron con buffer de fosfatos y se almacenaron a temperatura de refrigeración hasta su utilización (ANEXO IV).

Se calculó la actividad que presentaba el sobrenadante en los diferentes medios de reacción, así como la actividad de la enzima inmovilizada a las 24 y 48 horas de reacción. Se siguieron las metodologías de Mastihuba y cols., (2002) y Hegde y cols., (2009) utilizadas previamente. (ANEXO V).

Actividad enzimática en sobrenadante:

TABLA 5. Actividad enzimática presente en Sobrenadante.			
Proteína inicial utilizada en la reacción (mg)	Actividad inicial (U)	Sobrenadante 24 horas	Sobrenadante 48 horas
		Actividad enzimática (U)	Actividad enzimática (U)
1.85	0.11	0.004	0.003
3.71	0.22	0.005	0.003
7.42	0.44	0.008	0.007
14.81	0.89	0.009	0.014

De acuerdo a los resultados se observa que en todos los casos, el sobrenadante presenta actividad, lo que indica que cierta cantidad de extracto crudo no reaccionó con el soporte para ser inmovilizado y permaneció en el medio de reacción.

La actividad enzimática que se presenta en los sobrenadantes obtenidos es proporcional a la cantidad de proteína inicial utilizada para cada una de las reacciones, es decir, entre mayor cantidad de extracto enzimático se haya utilizado, mayor es la actividad enzimática en los sobrenadantes.

Actividad de la enzima inmovilizada (ANEXO V):

TABLA 6. Actividad enzima inmovilizada		
	24 horas	48 horas
Proteína inicial utilizada en la reacción (mg)	Actividad enzimática (U)	Actividad enzimática (U)
1.85	0.015	0.020
3.71	0.024	0.026
7.42	0.034	0.041
14.81	0.037	0.048

La actividad enzimática incrementa conforme aumenta la cantidad de proteína empleada para la inmovilización, es decir, el soporte inmovilizado en el que se empleó 14.81mg de proteína presenta mayor actividad y ésta va decreciendo conforme disminuye la cantidad de proteína empleada.

Las determinaciones hechas en un tiempo de 48 horas presentan mayor actividad enzimática que las determinaciones a 24 horas para cada caso. Esto indica que al dejar la

reacción por más de 24 horas se incrementa el número de uniones entre la enzima y el soporte, logrando obtener más enzima inmovilizada y que permanece funcional.

Sin embargo, la diferencia entre la actividad enzimática que se presenta a las 24 horas y a las 48 horas no es equivalente al tiempo extra que se deja la reacción, lo que demuestra que la reacción entre la enzima y el soporte se presenta en mucho mayor proporción dentro de las primeras 24 horas.

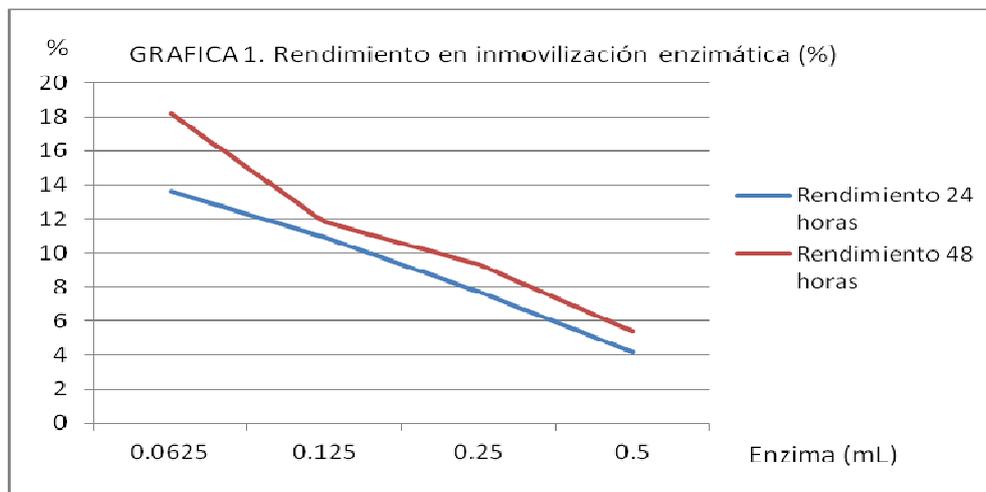
6.2.2 Cálculo del rendimiento en la inmovilización.

Se calculó el porcentaje del rendimiento en la inmovilización enzimática, es decir, bajo los parámetros de reacción establecidos, el total de extracto comercial que reaccionó con los grupos oxiranos del soporte Eupergit C y permaneció funcional.

Se obtuvieron los siguientes resultados (ANEXO VI):

TABLA 7. Rendimiento presentado en la inmovilización a las 24 horas			
Proteína inicial utilizada en la reacción (mg)	U total extracto crudo	U total de inmovilizado	% Rendimiento
1.85	0.11	0.015	13.64
3.71	0.22	0.024	10.91
7.42	0.44	0.034	7.73
14.81	0.89	0.037	4.16

TABLA 8. Rendimiento presentado en la inmovilización a las 48 horas			
Proteína inicial utilizada en la reacción (mg)	U total extracto crudo	U total de inmovilizado	% Rendimiento
1.85	0.11	0.020	18.18
3.71	0.22	0.026	11.82
7.42	0.44	0.041	9.32
14.81	0.89	0.048	5.39



El mayor rendimiento se presenta cuando se emplea una menor cantidad de proteína para la reacción de inmovilización (1.85mg) tanto a las 24 como a las 48 horas. El rendimiento va decreciendo conforme aumenta la cantidad de proteína utilizada. Una de las principales razones por las que se presenta este comportamiento es que al haber menor extracto enzimático en el medio de reacción, una mayor cantidad de proteína presente en el medio se liga al soporte y es aprovechada para la inmovilización. Al haber una mayor cantidad de proteína en el medio de reacción, la libertad de movimiento es menor y el encuentro entre los sitios activos del soporte y de la enzima disminuye.

Además, cuando se tiene un exceso de enzima para ser inmovilizada, el soporte puede representar el reactivo limitante y el aprovechamiento de la enzima es mucho menor, es decir, existe una gran cantidad de enzima desperdiciada en el medio que no reacciona con el soporte, o bien, que sufre desnaturalización.

Los resultados nos indican que al agregar una alta cantidad de extracto crudo para inmovilizar, el soporte con la enzima inmovilizada presentara mayor actividad enzimática debido a que habrá mayor cantidad de uniones enzima-soporte, sin embargo, también habrá un mayor desperdicio de extracto crudo que permanecerá en el medio de reacción. Al agregar una baja cantidad de extracto crudo para inmovilizar, el soporte presentará menor actividad enzimática debido a que habrá menor cantidad de uniones enzima-soporte, sin embargo, el remanente de extracto enzimático que permanezca en el medio de reacción sin unirse al soporte es mínimo.

La diferencia entre el rendimiento de la reacción de inmovilización a las 24 y 48 horas no es significativa para cada uno de los casos (aproximadamente 30%).

Un estudio de inmovilización en Eupergit C realizado por Tu Maobing, Zhang Xiao, et al. (2006) , demostró que durante este proceso existe una disminución de la cantidad de enzima en el medio de reacción muy acelerada durante las primeras 3 horas, mientras que en las siguientes 34 horas, la cantidad de proteína se reduce en el medio de reacción muy lentamente, lo que indica que la mayor cantidad de enzima se une al soporte en las primeras horas de la reacción. Sin embargo, tampoco es conveniente llevar a cabo la inmovilización en un tiempo menor a 16 horas, ya que el mantener la incubación por un tiempo prolongado, aumenta y mejora la unión múltiple de la enzima con el soporte, lo que mejora su estabilidad conformacional.

6.2.3 *Actividad de AFE inmovilizada a los 30 y 60 días de almacenamiento a 4°C.*

Una vez realizada la inmovilización, se evaluó la actividad enzimática que presentaba el soporte a los 30 y 60 días de almacenamiento a una temperatura de 4°C.

Para determinar si la reutilización de la enzima inmovilizada es un factor que disminuye su estabilidad, se evaluaron las siguientes variables:

- 1) Enzima almacenada sin ser utilizada (**Tabla 9**).
- 2) Enzima almacenada, utilizada para reacción enzimática una vez a la semana y recuperada mediante lavado con buffer de fosfatos 0.05M (**Tabla 10**).

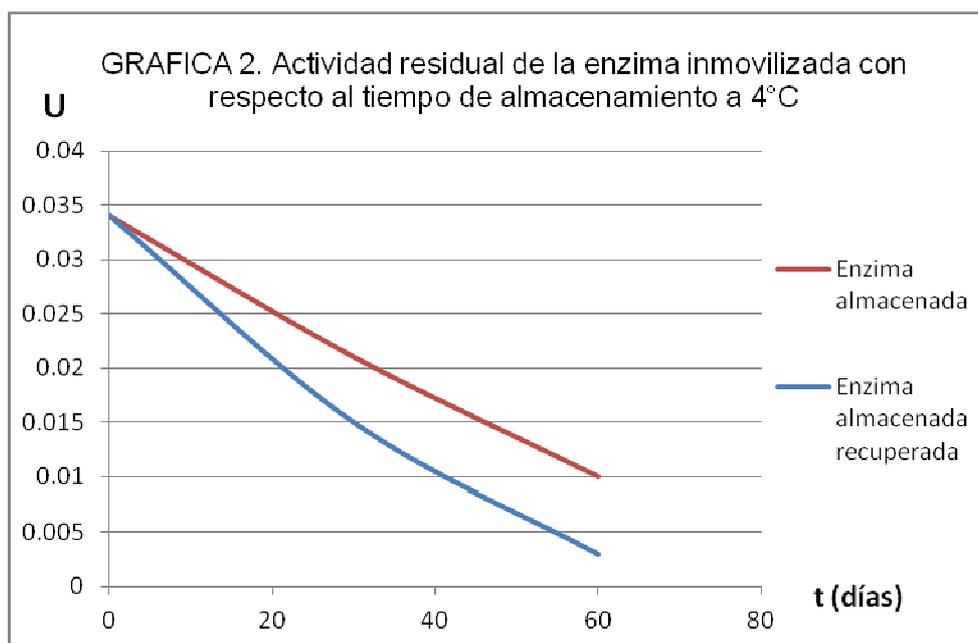
Se obtuvieron los siguientes resultados:

Actividad enzimática:

Sustrato: 4NFF

TABLA 9. Actividad residual de la enzima inmovilizada	
Tiempo (días)	Actividad enzimática (U)
0	0.034
30	0.021
60	0.010

TABLA 10. Actividad residual de la enzima inmovilizada recuperada	
Tiempo (días)	Actividad enzimática (U)
0	0.034
30	0.015
60	0.003



Conforme pasa el tiempo de almacenamiento se observa que la actividad enzimática residual disminuye de manera considerable, perdiendo más del 50% en los primeros 60 días. Dado que con la inmovilización enzimática suele aumentar la estabilidad de la enzima debido a la restricción parcial que presenta la proteína por las uniones de ésta con el soporte, se esperaba que la AFE permaneciera con la misma o similar actividad enzimática después de algunos meses, con el fin de reutilizar el derivado y disminuir costos del proceso en la reacción enzimática. Sin embargo, estos resultados demuestran que la inmovilización de la AFE en el soporte Eupergit C no estabiliza la proteína de una manera que permita conservar su actividad inicial a lo largo de cierto tiempo de almacenamiento a temperatura de 4°C debido principalmente a que, aún inmovilizada en el soporte, ésta puede sufrir efectos de desnaturalización o reacciones intermoleculares que provocan cambios conformacionales en la proteína.

La actividad residual que presenta la enzima almacenada con respecto al tiempo es mayor a la actividad residual que presenta la enzima almacenada y recuperada (GRAFICA 2) lo que indica que al someterse a ciclos de reacción, incrementa la pérdida de la estabilidad que tiene la enzima inmovilizada

6.3 TERCERA ETAPA

6.3.1 Hidrólisis de ACG y purificación del AC

En trabajos anteriores, se determinó la capacidad de los extractos enzimáticos comerciales de hidrolizar los ACG's y obtener AC. Los parámetros utilizados para este fin fueron: buffer MOPS 0.05M, tiempo de 24 horas y 40°C.

De acuerdo a los resultados obtenidos durante el proceso de inmovilización, se sabe que la enzima presenta mayor actividad a 50°C, sin embargo, no tenemos el tiempo necesario para realizar esta hidrólisis.

Para determinar el tiempo de reacción que requiere esta determinación, se monitoreó cualitativamente la producción de AC derivado de la reacción de hidrólisis cada 20 minutos empleando CCF.

De acuerdo a los resultados la producción de AC empieza a ser visible en los primeros 40 minutos y a partir de 12 horas de reacción, la aparición de AC no presenta ya un cambio visible (Figura 25).

Finalmente, las condiciones para la reacción de hidrólisis fueron:

T= 50°C; t= 12hrs; 250rpm, Buffer de fosfatos 0.05M a pH 6.

Utilizando estos resultados, se hidrolizó una mayor cantidad de ACG's para poder obtener suficiente AC y realizar la purificación del mismo.

	Condiciones:
	Fase estacionaria: <i>Sílica gel</i>
	Fase móvil: <i>Diclorometano –etanol –ac. acético (9:6:0.5)</i>
	Revelador: Radical – DPPH al 0.2% en metanol
	Muestras:
	AC = Std de AC (R.f: 0.8)
	ACG= Std de ACG (R.f: 0.25)
	B= Blanco de reacción
	M = Hidrólisis de ACG
	FIGURA 25. Cromatoplaqa de reacción de hidrólisis de ACGs

6.3.2 Purificación y cálculo del rendimiento del AC obtenido en la reacción enzimática

La mezcla de reacción obtenida después de las 12 horas se filtró para separar la enzima inmovilizada y se concentró con presión reducida.

El compuesto obtenido se purificó en una columna cromatográfica con las siguientes características:

Fase estacionaria: sílica gel para capa fina

Fase móvil: diclorometano – etanol (9:6)

Diámetro de la columna: 2cm

Se utilizaron 1000mL de fase móvil y se coleccionaron 60 fracciones de aproximadamente 15 mL, las cuales se monitorearon en cromatografía en capa fina para determinar en cuáles estaba presente el AC en condiciones puras.

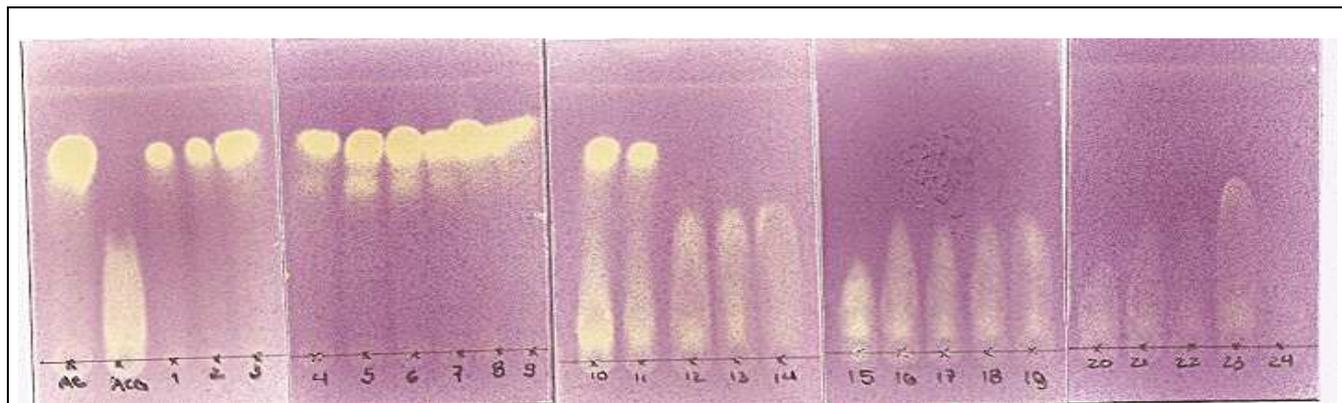


FIGURA 26. Cromatoplaca para identificar AC obtenido en la reacción

Condiciones:

Fase estacionaria: Sílica gel para capa fina

Fase móvil: Diclorometano –etanol –ac. acético (9:6: 0.5)

Revelador: Radical – DPPH al 0.2% en metanol

Muestras:

AC= Std de Acido Caféico (R.f: 08)

ACG = Std de Ácido Clorogenico (R.f: 0.25)

1-24= Fracciones recolectadas

En la imagen se pueden observar las fracciones obtenidas de la purificación del AC, las fracciones 1-9 presentan el compuesto en el estado más puro por lo que se juntaron y se concentraron a presión reducida.

Se obtuvo un total de 100.4mg de ácido cafeico, lo que representa un rendimiento de 50.2%.

El compuesto obtenido se caracterizó con resonancia magnética nuclear (^1H y ^{13}C), se comparó en CCF con un estándar y se determinó el punto de ebullición frente al mismo, obteniendo como resultado las mismas características de Ácido Caféico.

Dado que la AFE empleada si fue capaz de hidrolizar los ACGs, de acuerdo a su clasificación se puede determinar que se trata de la tipo B que actúa preferentemente sobre sustratos que contienen uno o dos sustituciones hidroxilo, o bien la tipo C y D que exhiben una amplia actividad sobre diferentes sustratos incluyendo los ACGs. (Koseki, 2009).

Castillo (2007) realizó la hidrólisis enzimática de ACGs empleando como sustrato un extracto enriquecido de ACGs obtenido de café y como catalizador el extracto enzimático comercial Depol 740L. La reacción se dejó por 24 horas.

La cantidad de AC obtenido en esta determinación fue mayor que la cantidad de ACGs hidrolizados, siendo mayor al 100%. La enzima es capaz de actuar sobre otros ésteres de AC presentes en el café verde tal como los ácidos dicafeoilquínicos, ácidos feruilcafeoilquínicos entre otros.

Asther et al. (2004), evaluaron la capacidad de una enzima purificada extraída a partir de *Aspergillus niger* BRFM 131 para hidrolizar ACGs obtenidos de fuentes naturales como la pulpa de café y manzana. La enzima logró hidrolizar 86-100% de los ACGs presentes en ambos sustratos. Además, en este caso la cantidad de AC liberado de la pulpa de café también fue mayor que la cantidad de ACG hidrolizado, es decir, se presentó el mismo comportamiento que en el caso de Castillo (2007).

Estos resultados indican que el uso de extractos agroindustriales no purificados como fuente para obtener AC resultan una opción para obtener una alta cantidad de AC, ya que cuentan con compuestos como ácidos dicafeoilquínicos y tricafeoilquínicos, los cuales contienen hasta tres veces AC en una sola molécula.

En cuanto al uso de soluciones químicas como medios de reacción, Wang Jun, Lu Dingqiang et al. (2009) realizaron un estudio para determinar las condiciones óptimas de hidrólisis de ACGs empleando soluciones alcalinas.

En las condiciones óptimas y sin llevar a cabo la purificación del AC se reporta un índice de conversión de ACG a AC de 43.46%.

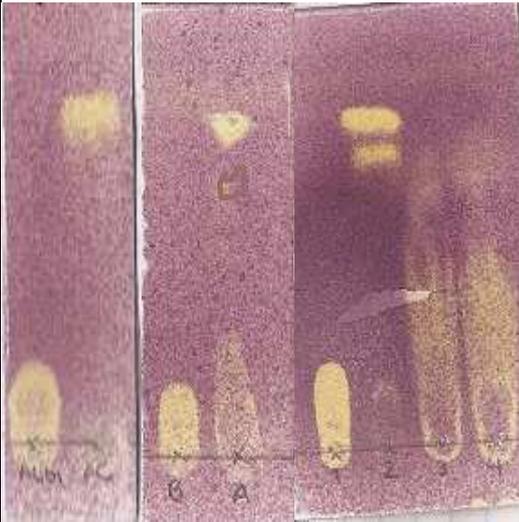
Con estos datos se puede concluir que el uso de enzimas como catalizadores resulta mucho más efectivo para obtener una cantidad alta de AC ya que en el proceso en donde se utilizó la enzima inmovilizada como fuente de catálisis, se obtuvo un 50.2% de producto final.

6.3.3 Evaluación de la hidrólisis enzimática de ACGs empleando dioxano, isopropanol y acetona como medio de reacción

Dada las ventajas que implica trabajar sustituyendo las fases acuosas con solventes orgánicos, se realizaron reacciones enzimáticas para hidrolizar los ACGs en donde se empleaba como medio de reacción: isopropanol, dioxano y acetona, cada una con 10% de agua, 50°C y 250 rpm. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

Las reacciones se fueron monitoreando cada 6 horas, y se determinó que requieren de 24 horas para que se puedan distinguir cualitativamente los productos de la reacción:

Después de 24 horas de reacción se obtuvieron las siguientes placas cromatográficas:

	Condiciones:
	Fase estacionaria: Sílica gel
	Fase móvil: Diclorometano –etanol –ac. acético (9:6:0.5)
	Revelador: Radical – DPPH al 0.2% en metanol
	Muestras:
	ACG= Std de ácido clorogénico (R.f: 0.25)
	AC = Std de ácido cafeico (R.f: 0.8)
	B = Control de reacción en acetona + 10% agua (R.f: 0.24)
	A = Reacción en acetona + 10% agua (R.f: 0.8).
	1 = Control reacción en medio isopropanol + 10% agua (R.f: 0.25).
2 = Reacción en medio isopropanol + 10% agua (R.f: 0.73 y 0.8).	
3 = Control reacción en medio dioxano + 10% agua	
4 = Reacción en medio dioxano + 10% agua	
FIGURA 27. Cromatoplaca de reacción con solventes orgánicos	

Se puede observar que en el medio con acetona + 10% agua y con isopropanol + 10% agua, la reacción ocurre de manera óptima.

En el caso de la reacción en medio isopropanol + 10% agua, se puede observar la formación de un segundo compuesto que puede ser una esterificación entre el alcohol y el ácido caféico.

Con estos resultados se comprueba que el uso de sustancias orgánicas como medio de reacción es factible, ya que con acetona e isopropanol se lleva a cabo la hidrólisis de los ACGs y se obtiene AC.

La desventaja que presenta este método es que requiere de mayor tiempo de reacción. Esto puede deberse a que utilizando solventes orgánicos, algunas condiciones no son las más óptimas para la reacción, como el hecho de que el solvente orgánico afecte la distribución del agua entre la enzima y el sustrato en el medio de reacción, o una posible interacción directa del solvente con la enzima, afectando su conformación y llegando a inactivarla.

7. CONCLUSIONES

- El método espectrofotométrico empleado para determinar la actividad enzimática de la AFE comercial utilizando 4NFF como sustrato es confiable, sencillo y reproducible.
- El cambio aplicado en la fase móvil de la técnica de purificación para la obtención de 4NFF puro resultó más apropiado, ya que se obtuvo un rendimiento mayor que el reportado en el procedimiento del que se basó la metodología.
- La AFE presente en el extracto comercial Depol 740L puede ser inmovilizada por medio de enlaces covalentes utilizando como soporte Eupergit C. El rendimiento máximo encontrado en los parámetros analizados fue de 18.18% con respecto a la actividad que presenta el extracto enzimático crudo.
- La enzima inmovilizada y almacenada a 4°C presenta una disminución del 38% de actividad en los primeros 30 días, y del 70% en los siguientes 60 días, lo que indica que la enzima inmovilizada en Eupergit C es inestable bajo estos parámetros de almacenamiento.
- El procedimiento analizado en este trabajo experimental para obtener un mayor aprovechamiento de la AFE, en donde se buscaba reutilizar la enzima evitando desecharla, no resultó funcional, ya que el rendimiento en la inmovilización es bajo y la actividad enzimática residual disminuye en un 70% durante los primeros dos meses.
- La AFE inmovilizada lleva a cabo la hidrólisis de ACG y produce AC. El rendimiento en la purificación y obtención de AC con el método propuesto es de 50.2%
- Como parte de implementar nuevas técnicas de reacciones catalíticas para obtener AC, la hidrólisis de ACGs con la enzima inmovilizada se puede llevar a cabo en acetona con 10% de agua e isopropanol con 10% de agua, sin embargo, la reacción requiere de mayor tiempo.

8. ANEXOS

Anexo I. Cálculo del porcentaje de 4NFF obtenido.

Para hacer el cálculo se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ 4NFF} = (M_{4\text{NFF}} \times 100) / M_{4\text{NF}}$$

En donde,

$\%4\text{NFF}$ = Porcentaje de 4NFF obtenido.

$M_{4\text{NFF}}$ = Masa total del 4NFF obtenido.

$M_{4\text{NF}}$ = Masa total del compuesto 4NF utilizado para la reacción.

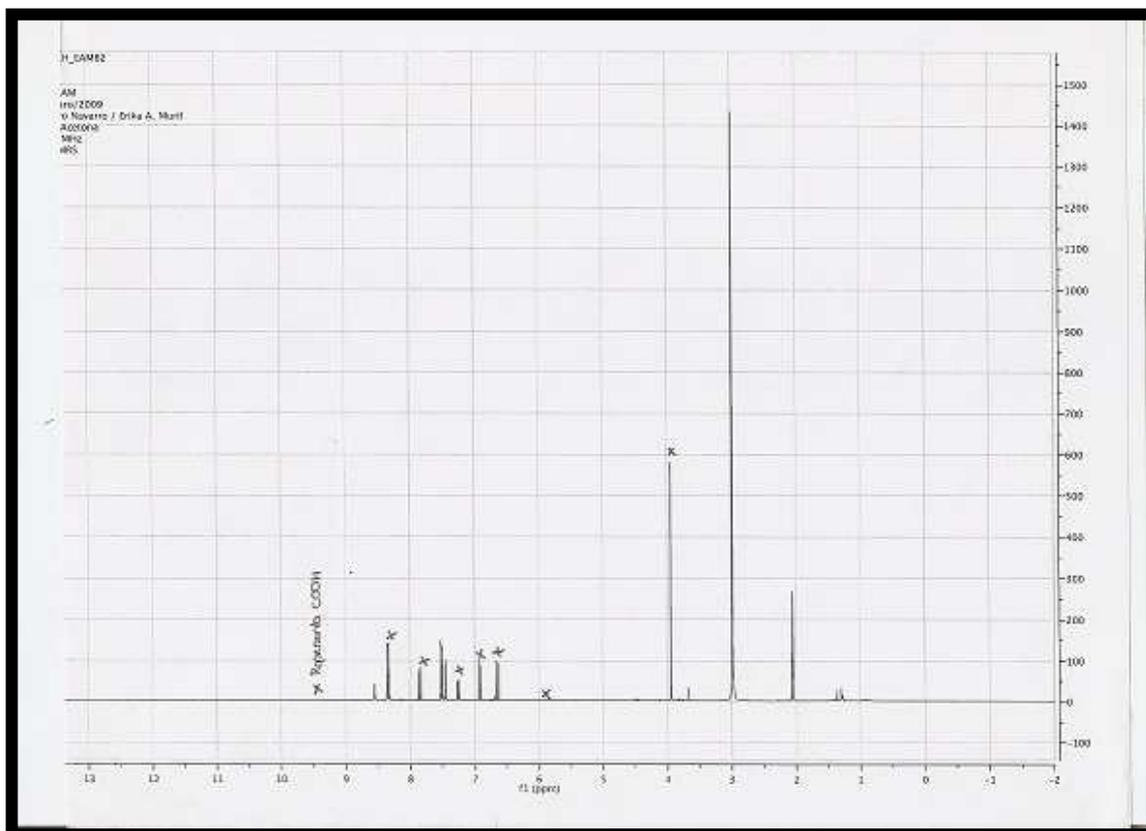
Por lo que:

$$\% \text{ 4NFF} = (0.96 \times 100) / 1.81$$

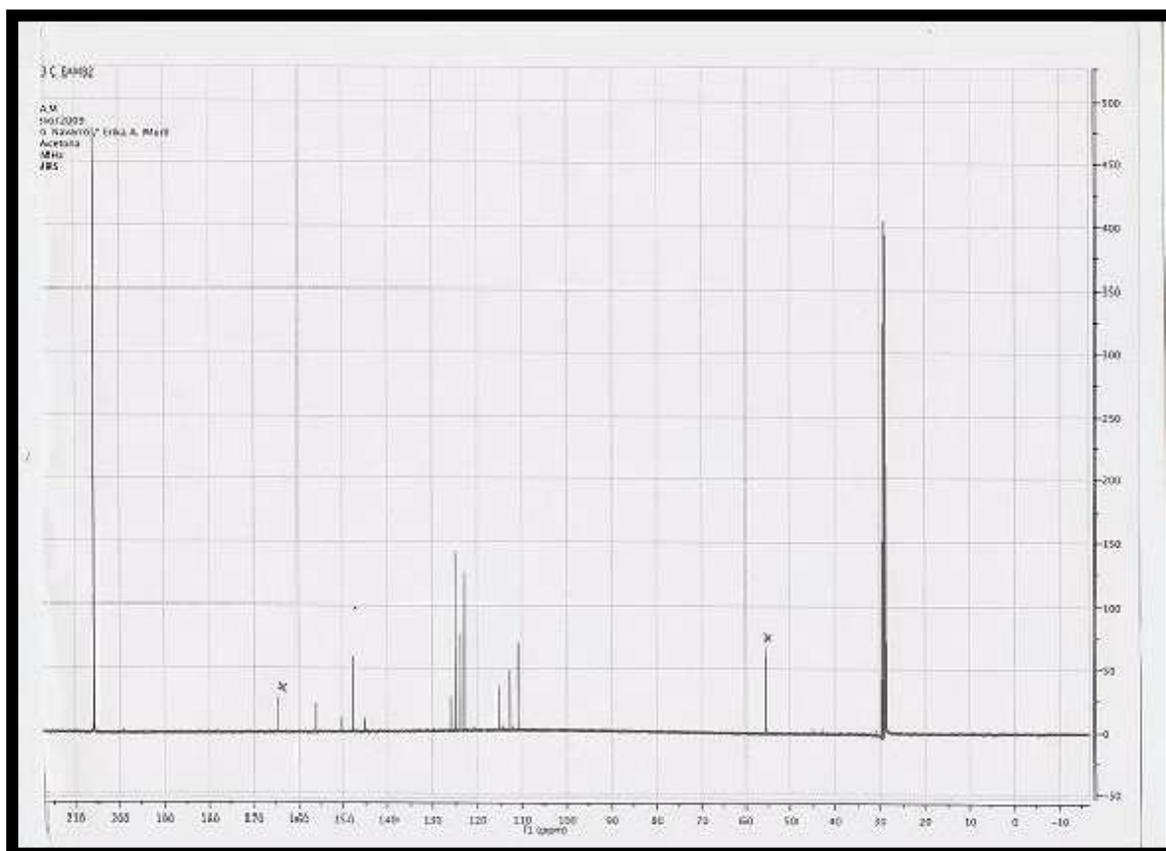
$$\%4\text{NFF} = 53.03$$

Anexo Ia. Caracterización del 4NFF en RMN

Para ^1H :



Para ^{13}C :

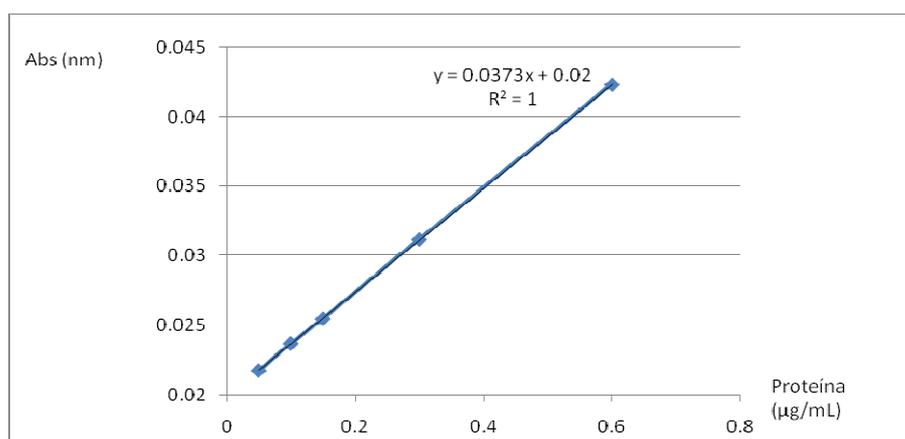


Anexo II Determinación de la cantidad de proteína presente en los extractos Depol 740L y Depol 670L

Calculo de la cantidad de proteína presente en cada uno de los extractos.

Curva estándar (ASB):

TABLA 11. Parámetros de curva estándar	
C. de prot. ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Abs (595nm)
0.05	0.0218
0.1	0.0237
0.15	0.0255
0.30	0.0311
0.6	0.0423



Utilizando los datos de esta curva estándar, el cálculo de la cantidad de proteína se realizó con la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido de proteína } (\mu\text{g/mL}) = (\text{Abs}_{595\text{nm}} - 0.02) / 0.0373$$

Extracto Depol 670L:

Repeticiones	Abs (595nm)
1	0.4187
2	0.4201

Se obtuvieron los siguientes resultados:

1) **Contenido de proteína ($\mu\text{g/mL}$) = 10.68**

2) **Contenido de proteína ($\mu\text{g/mL}$) = 10.72**

Dado que se hizo una dilución de 1:4000, se realizó el siguiente cálculo para determinar la cantidad de proteína:

1) $10.6890 \mu\text{g/mL} \times (1\text{mg}/1000 \mu\text{g}) \times (1\text{mL}/0.00025) = 42.72\text{mg/mL}$

2) $10.7265 \mu\text{g/mL} \times (1\text{mg}/1000 \mu\text{g}) \times (1\text{mL}/0.00025) = 42.90\text{mg/mL}$

PROMEDIO = 42.81 mg/mL

Extracto Depol 740L:

Repeticiones	Abs (595nm)
1	0.3045
2	0.2897

1) **Contenido de proteína ($\mu\text{g/mL}$) = 7.6273**

2) **Contenido de proteína ($\mu\text{g/mL}$) = 7.2305**

Dado que se hizo una dilución de 1:4000, se realizó el siguiente cálculo para determinar la cantidad de proteína:

$$1) 7.6273 \mu\text{g/mL} \times (1\text{mg}/1000 \mu\text{g}) \times (1/0.00025) = 30.50\text{mg/mL}$$

$$2) 7.2305 \mu\text{g/mL} \times (1\text{mg}/1000 \mu\text{g}) \times (1/0.00025) = 28.91\text{mg/mL}$$

PROMEDIO = 29.70 mg/mL

Anexo IIa. Actividad enzimática de la AFE en D670L y D740L

TABLA 12. Lecturas de absorbancia obtenidas de la reacción enzimática con Depol 740L a 40°C.	
Tiempo (min)	Abs (λ)
10	0.0439
20	0.0642
40	0.0924
60	0.1325

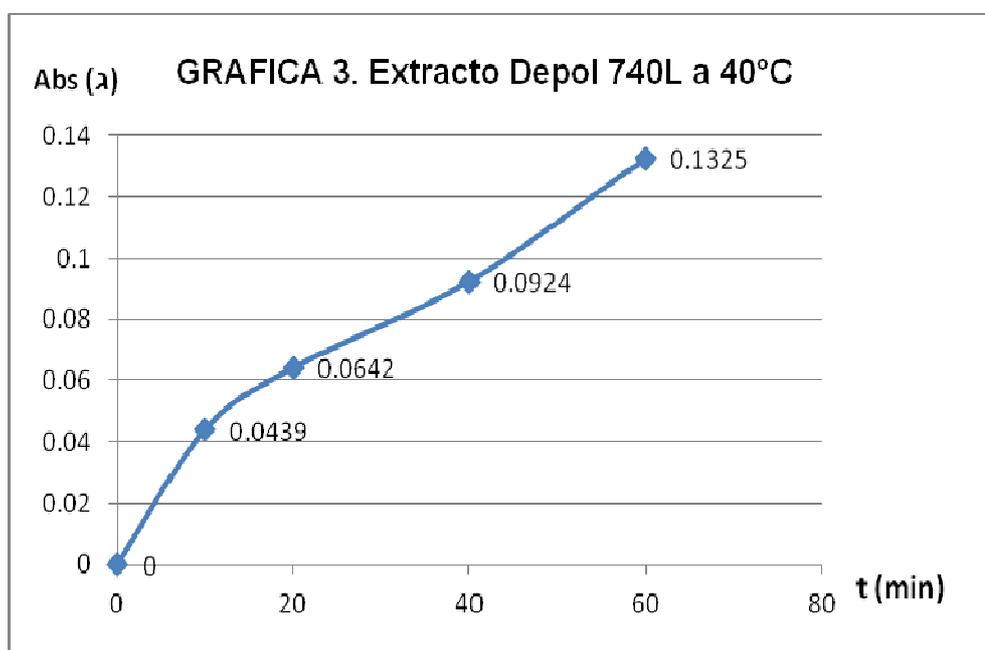


TABLA 13. Lecturas de absorbancia obtenidas de la reacción enzimática con Depol 740L a 50°C.

Tiempo (min)	Abs (λ)
10	0.3903
20	0.7884
40	0.9437
60	0.9626

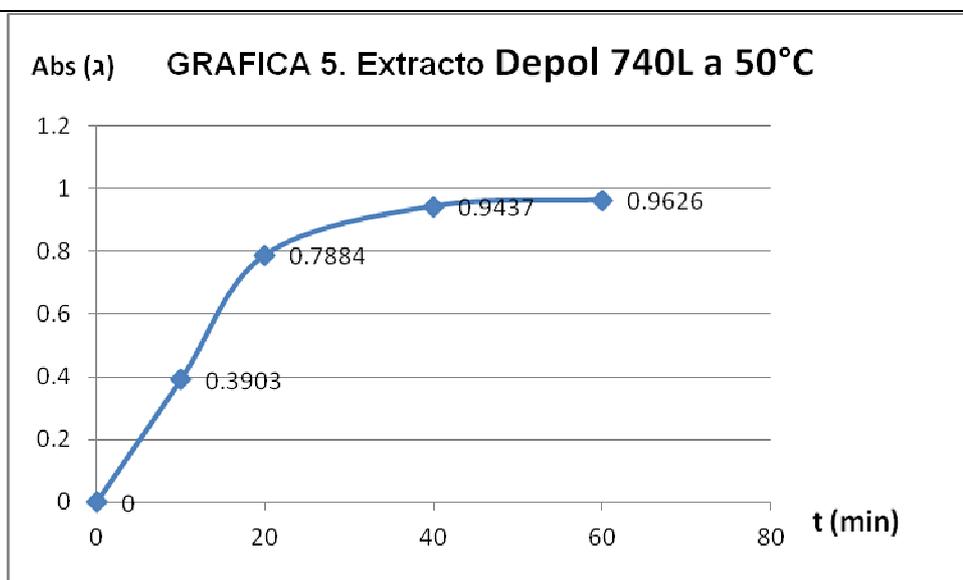


TABLA 14. Lecturas de absorbancia obtenidas de la reacción enzimática con Depol 670L a 40°C.

Tiempo (min)	Abs (λ)
10	0.0075
20	0.0198
40	0.0324
60	0.0525

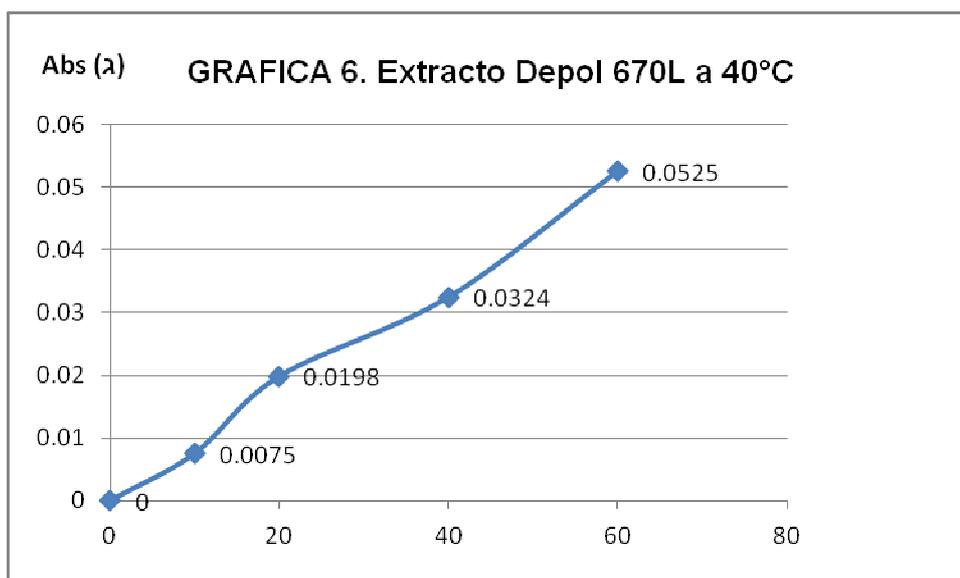
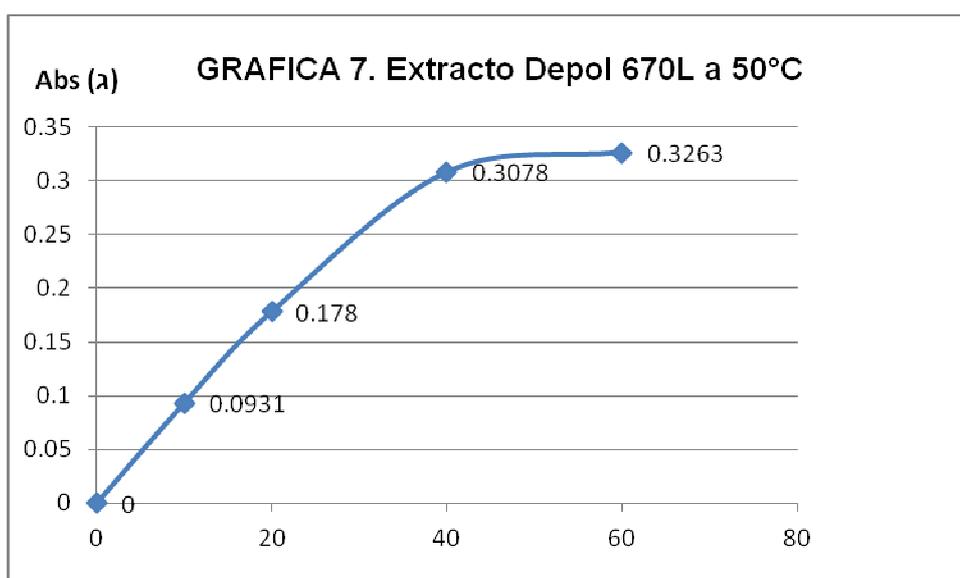


TABLA 15. Lecturas de absorbancia obtenidas de la reacción enzimática con Depol 670L a 50°C.

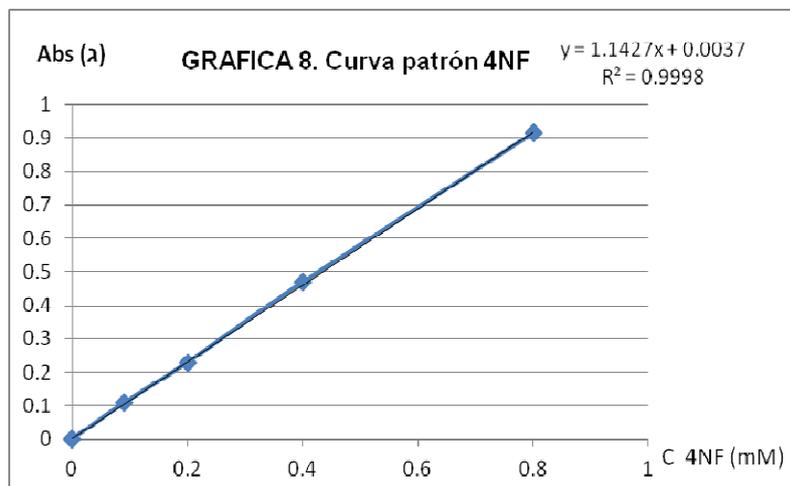
Tiempo (min)	Abs (λ)
10	0.0931
20	0.178
40	0.3078
60	0.3263



Curva patrón de 4NF:

Para realizar los cálculos de la actividad enzimática de la AFE, se utilizó la siguiente curva patrón:

TABLA 16. Parámetros curva patrón 4NF	
C de 4NF (mM)	Abs (λ)
0.00	0
0.09	0.1086
0.20	0.2295
0.40	0.4684
0.80	0.9144



Para determinar la actividad enzimática de la AFE, se utilizó la siguiente fórmula, proveniente de la curva patrón:

$$C(\text{mM}) = (\text{Abs} - 0.0037) / 1.1427$$

En donde,

C(mM)= Concentración del 4NF presente en la solución.

Abs= Lectura obtenida del espectrofotómetro.

Depol 740L → Volumen total de reacción: 1.1mL; T=50°C; t= 10 min; Abs= 0.3903;
Concentración de proteína= 29.70mg/mL

$$C(\text{mM}) = (0.3903 - 0.0037) / 1.1427$$

$$C(\text{mM}) = 0.338$$

$$1.1\text{mL} \times (0.338\text{mmoles}/1000\text{mL}) \times (1000\mu\text{moles}/1\text{mmol}) = 0.371 \mu\text{moles}$$

Para obtener la actividad enzimática (U), se realizaron los siguientes cálculos:

$$0.371 \mu\text{moles}/10\text{min} = 0.037\text{U}$$

Para calcular la actividad específica (U/mg de proteína) se realizaron los siguientes cálculos:

Dilución de extracto enzimático 1:5

$$0.1\text{mL} \times (1/5) = 0.02\text{mL}$$

Actividad específica de la enzima:

$$(0.037\text{U}/0.02\text{mL}) \times (1\text{mL}/29.70\text{mg}) = 0.06 \text{ U/mg de proteína}$$

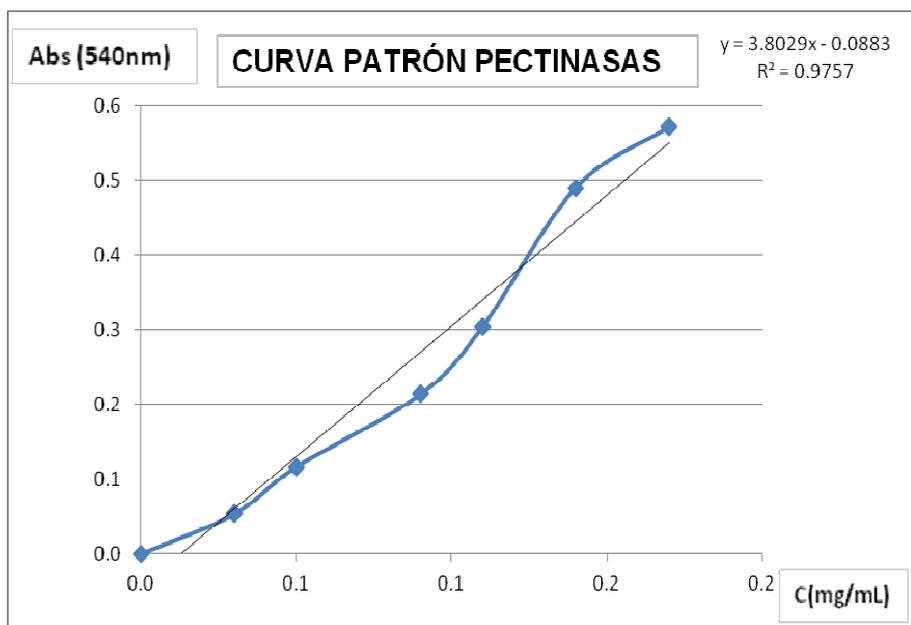
Los cálculos para obtener la actividad específica de la AFE presente en el extracto Depol 670L se realizaron de la misma manera, agregando los datos correspondientes.

Anexo III. Actividad específica (U/mg de proteína) que presentan las pectinasas y celulasas en el extracto Depol 670L.

Pectinasas:

Para determinar la actividad específica que presentan las pectinasas fue necesario hacer una curva patrón en donde se empleó ácido galacturónico en buffer de acetato de sodio 0.1M y pH = 5.

TABLA 17. Parámetros curva patrón pectinasas	
C(mg/mL)	Abs (λ)
0.0	0.0
0.03	0.0537
0.05	0.1163
0.09	0.2136
0.11	0.3038
0.14	0.4895
0.17	0.5710



Lecturas obtenidas a partir de las determinaciones de actividad enzimática:

TABLA 18. Lecturas de Abs (540nm)	
Repeticiones	Abs (540nm)
1	0.466
2	0.4821
3	0.4898

Para obtener la actividad específica que presentan las pectinasas en el extracto Depol 670L, se realizaron los siguientes cálculos:

La ecuación obtenida de la curva patrón es la siguiente:

$$C(\text{mg/mL}) = (\text{Abs} + 0.0883) / 3.8029$$

En donde,

C(mg/mL) = Concentración de ácido galacturónico en el medio.

Abs = Absorbancia obtenida de las lecturas espectrofotométricas.

Ejemplo:

Depol 670L → Volumen total de reacción: 1.0mL; T=45°C; t= 20 min; Abs= 0.4660;
Concentración de proteína= 42.81mg/mL

Cálculos:

$$C(\text{mg/mL}) = (0.4660 + 0.0883) / 3.8029$$

$$C(\text{mg/mL}) = 0.1457$$

La actividad enzimática (U) se obtiene calculando lo siguiente:

$$1\text{mL} \times (0.1457\text{mg/mL}) \times (1\text{g}/1000\text{mg}) \times (1\text{mol}/194\text{g}) = 7.51 \times 10^{-7} \text{ moles de a. galac.}$$

$$7.51 \times 10^{-7} \text{ moles} \times (1000\text{mmoles}/1\text{mol}) \times (1000\mu\text{moles}/1\text{mmoles}) = 0.751 \mu\text{moles.}$$

$$U = 0.751 \mu\text{moles}/20\text{min} = 0.03 \mu\text{moles}/\text{min}$$

Para obtener la actividad específica, se requieren los siguientes cálculos:

Se realizó una dilución del extracto enzimático 1:1000 y después 1:100:

$$0.1\text{mL} \times (1/1000) \times (1/100) = 1 \times 10^{-6}\text{mL}$$

$$\text{U/mg proteína} = (0.03 \text{ U} / 1 \times 10^{-6}\text{mL}) \times (1\text{mL} / 42.81\text{mg de proteína}) = 117.60$$

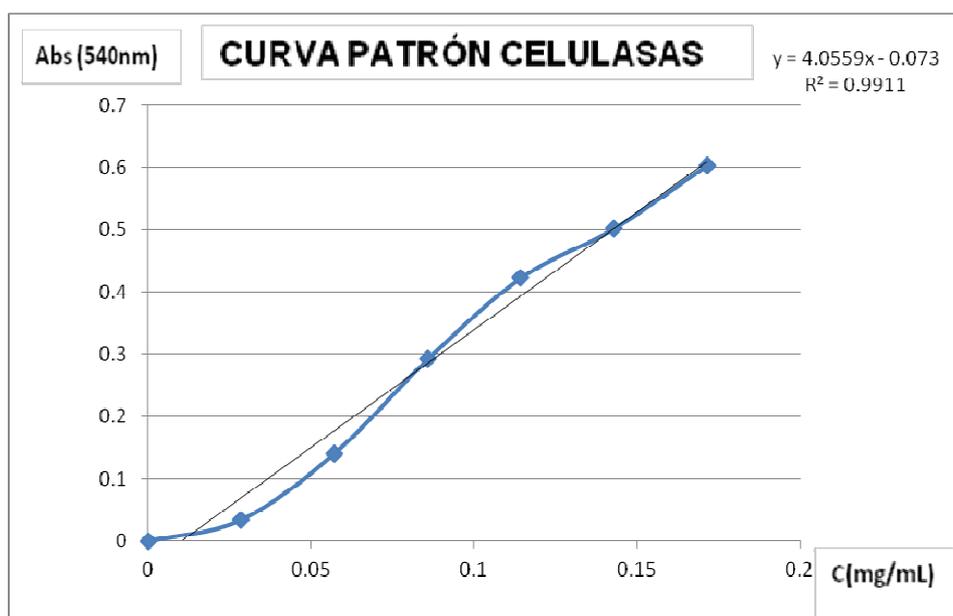
Aplicando el mismo cálculo para las demás lecturas obtenidas del espectrofotómetro en la determinación de la actividad específica de pectinasas, se obtienen los siguientes resultados:

Tabla 19. Act. específica (Pectinasa)	
Repeticiones	Actividad específica (U/mg de proteína)
1	117.60
2	142.13
3	153.32

Celulasas:

Para determinar la actividad específica que presentan las celulasas fue necesario hacer una curva patrón en donde se empleó glucosa en buffer de acetato de sodio 0.1M y pH = 5.

TABLA 20. Parámetros curva patrón celulasas	
C(mg/mL)	Abs
0.0	0.0
0.03	0.0343
0.0571	0.1408
0.09	0.292
0.11	0.4224
0.14	0.5015
0.17	0.6035



Lecturas obtenidas a partir de las determinaciones de actividad enzimática:

TABLA 21. Lecturas Abs	
Repeticiones	Abs (540nm)
1	0.4823
2	0.4701
3	0.4786

Para obtener la actividad específica que presentan las celulasas en el extracto Depol 670L, se realizaron los siguientes cálculos:

La ecuación obtenida de la curva patrón es la siguiente:

$$C(\text{mg/mL}) = (\text{Abs} + 0.073) / 4.0559$$

En donde,

C(mg/mL) = Concentración de glucosa en el medio.

Abs = Absorbancia obtenida mediante las lecturas espectrofotométricas.

Ejemplo:

Depol 670L → Volumen total de reacción: 1.0mL; T=50°C; t= 90 min; Abs= 0.4823;

Concentración de proteína= 42.81mg/mL

$$C(\text{mg/mL}) = (0.4823 + 0.073) / 4.0559$$

$$C(\text{mg/mL}) = 0.1369$$

La actividad enzimática (U) se obtiene calculando lo siguiente:

$$1\text{mL} \times (0.1369\text{mg/mL}) \times (1\text{g}/1000\text{mg}) \times (1\text{mol}/180\text{g}) = 7.60 \times 10^{-7} \text{ moles de glucosa}$$

$$7.60 \times 10^{-7} \text{ moles} \times (1000\text{mmoles}/1\text{mol}) \times (1000\mu\text{moles}/1\text{mmoles}) = 0.760\mu\text{moles.}$$

$$U = 0.760 \mu\text{moles}/90\text{min} = 0.0084 \mu\text{moles}/\text{min}$$

Para obtener la actividad específica, se requieren los siguientes cálculos:

Se realizó una dilución del extracto enzimático 1:1000 y después 1:50:

$$0.1\text{mL} \times (1/1000) \times (1/50) = 2 \times 10^{-6}\text{mL}$$

$$\text{U/mg proteína} = (0.0084 \text{ U} / 2 \times 10^{-6} \text{ mL}) \times (1 \text{ mL} / 42.81 \text{ mg de proteína}) = 98.01$$

Aplicando el mismo cálculo para las lecturas obtenidas en la determinación de la actividad específica de celulasas, se obtienen los siguientes resultados:

TABLA 22. Act. específica (Celulasa)	
Repeticiones	Actividad específica (U/mg de proteína)
1	98.01
2	96.54
3	97.81

Anexo IV. Inmovilización enzimática de la AFE con Eupergit C.

Preparación de medios de reacción para la inmovilización enzimática:

TABLA. 23 Preparación de medios de reacción para inmovilización enzimática				
Cantidad de extracto inicial (μL)	Equivalente a cantidad de proteína (mg)	Buffer PO_4^{4-} , 1M, pH= 7.5 (μL)	H_2O (μL)	Total (μL)
62.5	1.85	500	437.5	1000
125	3.71	500	375	1000
250	7.42	500	250	1000
500	14.81	500	0	1000

Solución de glicina:

P.M de glicina: 75.07g

$$25 \text{ mL} \times (1 \text{ mol} / 1000 \text{ mL}) \times (75.07 \text{ g} / 1 \text{ mol}) = 1.87 \text{ g de glicina en buffer de fosfatos } 0.05 \text{ M}$$

Anexo V. Cálculos de actividad de la enzima inmovilizada.

Se calculó la actividad que presentó el sobrenadante obtenido de la reacción de inmovilización a las 24 y 48 horas de reacción.

SOBRENADANTE:

TABLA 24. Cálculos de actividad en sobrenadante

Cantidad de proteína inicial utilizada en la reacción (mg)	Tiempo de reacción (min)	Cantidad de sobrenadante (mL)	Abs (410nm) 24 horas de reacción	Abs (410nm) 48 horas de reacción
1.85	10	0.1	0.053	0.040
3.71	10	0.1	0.064	0.042
7.42	10	0.1	0.089	0.079
14.81	10	0.1	0.107	0.150

Para hacer el cálculo se utilizó la ecuación obtenida de la curva patrón del 4NF presente en el Anexo IIa.

Ejemplo:

Actividad enzimática que presenta el sobrenadante resultante de la reacción de inmovilización en donde se utilizó 62.5 μ L de extracto enzimático y un tiempo de 24 horas.

Sobrenadante \rightarrow Volumen total de la reacción: 1.1 mL; T= 50°C ; t= 10 min; Abs= 0.053

$$C(\text{mM}) = (0.053 - 0.0037) / 1.1427$$

$$C(\text{mM}) = 0.043$$

$$1.1 \text{ mL} \times (0.043 \text{ mmoles} / 1000 \text{ mL}) \times (1000 \mu\text{moles} / 1 \text{ mmol}) = 0.0473 \mu\text{moles}$$

Para obtener la actividad enzimática (U), se realizaron los siguientes cálculos:

$$0.0473 \mu\text{moles} / 10 \text{ min} = 0.00473 \text{ U}$$

Los cálculos para obtener la actividad que presentaban los sobrenadantes obtenidos en cada una de las reacciones se realizaron de la misma manera, agregando los datos que correspondían en cada caso.

ENZIMA INMOVILIZADA:

TABLA 25. Cálculos de actividad de enzima inmovilizada

Proteína inicial en reacción de inmovilización (mg)	Tiempo de reacción (min)	Cantidad de soporte inmovilizado (mg)	Abs (410nm) 24 horas de reacción	Abs (410nm) 48 horas de reacción
1.85	10	10	0.171	0.231
3.71	10	10	0.274	0.302
7.42	10	10	0.391	0.473
14.81	10	10	0.429	0.548

Cálculo para obtener la actividad enzimática del inmovilizado en donde se utilizó 1.85mg de proteína y un tiempo de 24 horas.

Ejemplo:

Enzima inmovilizada → Volumen total de reacción 1mL; T=50°C; t= 10 min; Abs= 0.171; Soporte= 10mg.

$$C(\text{mM}) = (0.171 - 0.0037) / 1.1427$$

$$C(\text{mM}) = 0.146$$

Para obtener la actividad enzimática (U), se realizaron los siguientes cálculos:

$$1\text{mL} \times (0.146\text{mmoles}/1000\text{mL}) \times (1000\mu\text{moles}/1\text{mmol}) = 0.146\mu\text{moles}$$

$$0.146 \mu\text{moles}/10\text{min} = 0.015\text{U}$$

Los cálculos para obtener la actividad que presentaban las enzimas inmovilizadas en cada caso se realizaron de la misma manera, agregando los datos que correspondían en cada caso.

Anexo VI. Cálculo en porcentaje del rendimiento en la actividad enzimática que presenta la enzima inmovilizada.

Para realizar los cálculos del rendimiento en la inmovilización, se hizo una comparación entre la actividad que presentaba el extracto comercial y la actividad que presentaba la enzima inmovilizada bajo las mismas condiciones de reacción en cada una de las determinaciones.

Resultados:

TABLA 26. Rendimiento en la inmovilización enzimática			
24 hrs			
Proteína (mg)	U total de extracto crudo	U total de inmovilizado	% Rendimiento
1.85	0.11	0.015	13.64
3.71	0.22	0.024	10.91
7.42	0.44	0.034	7.73
14.81	0.89	0.037	4.16

TABLA 27. Rendimiento en la inmovilización enzimática			
48 hrs			
Proteína (mg)	U total de extracto crudo	U total de inmovilizado	% Rendimiento
1.85	0.11	0.02	18.18
3.71	0.22	0.026	11.82
7.42	0.44	0.041	9.32
14.85	0.89	0.048	5.39

Cálculo para el rendimiento en la reacción de inmovilización.

Actividad específica de extracto enzimático: 0.06 U/mg de proteína, t=24 horas.

U total con 1.85mg de proteína:

$$0.06 \text{ U/mg proteína} \times 1.85 \text{ mg de proteína} = 0.11 \text{ U}$$

Cálculo del rendimiento:

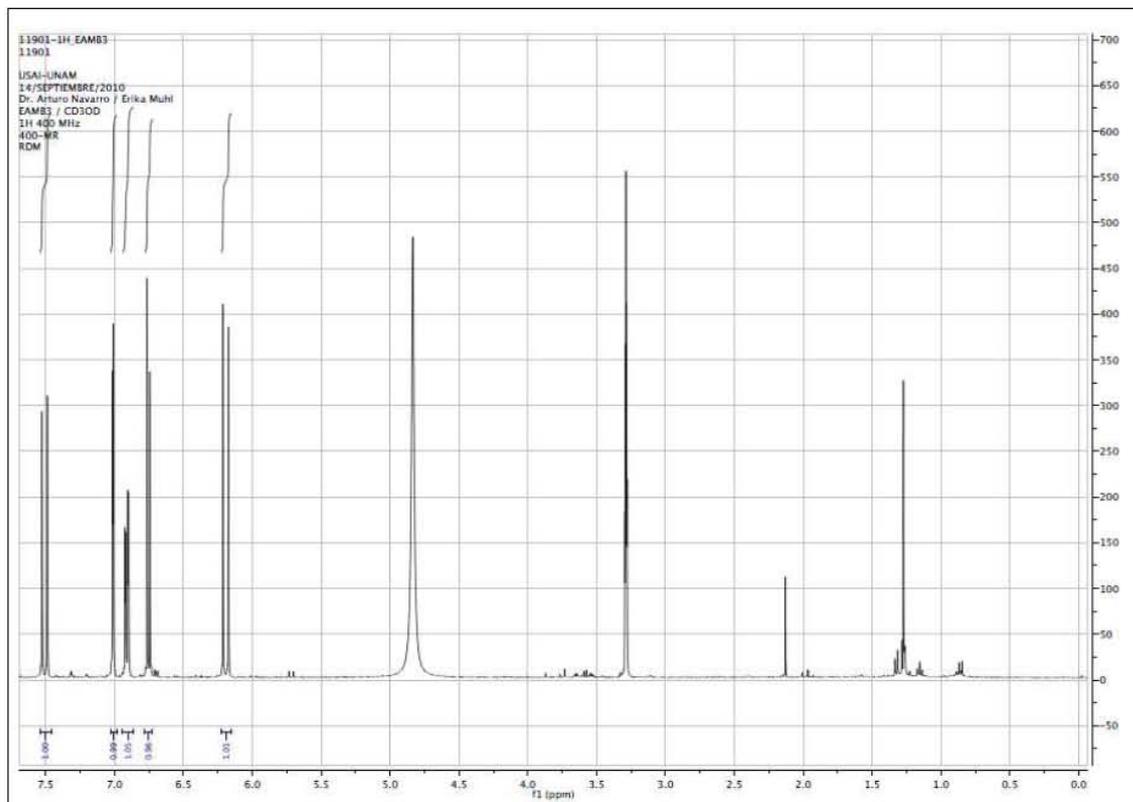
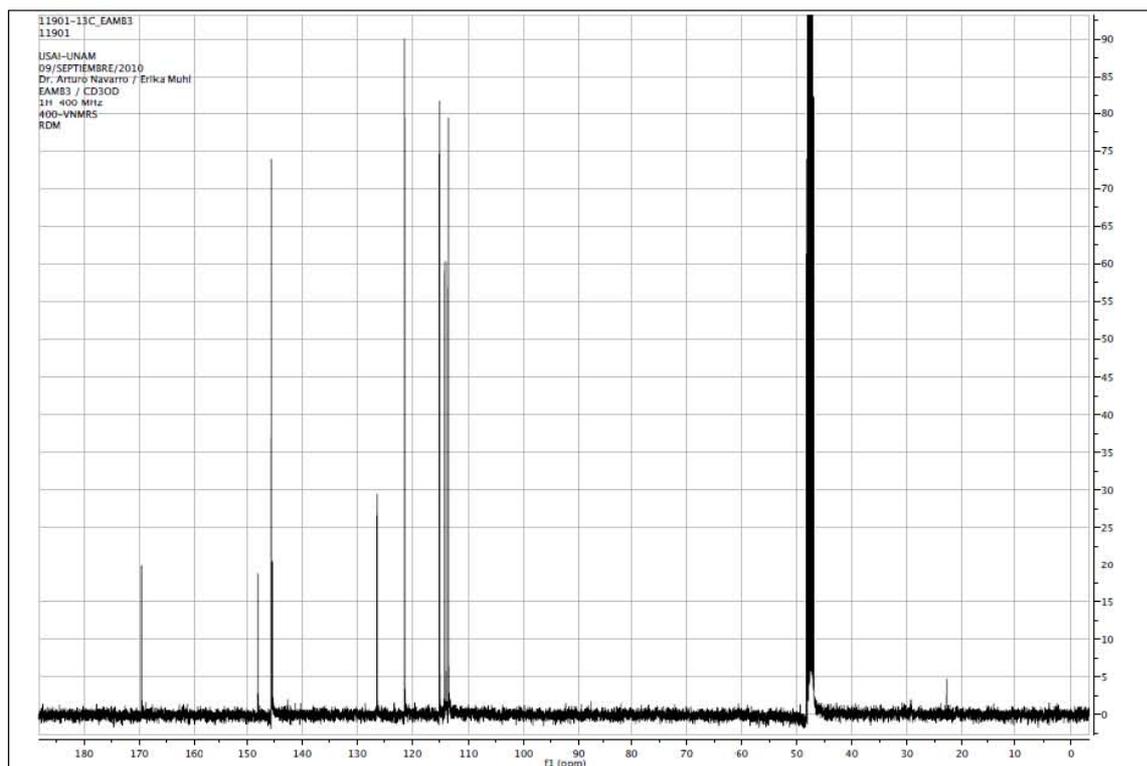
$$0.11 \text{ U} \text{ ---- } 100\%$$

$$0.015 \text{ U} \text{ ---- } X$$

$$X = 13.64\%$$

El cálculo del rendimiento se realizó de la misma manera para cada uno de los casos.

Anexo VII. Caracterización del AC en RMN

Para ^1H :Para ^{13}C :

CAPITULO 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Adachi Osao, Ano Yoshitaka, Akakabe Yoshihiko. *Coffee pulp Koji of Aspergillus sojae as stable immobilized catalyst of chlorogenate hydrolase*. Applied Microbiology and Biotechnology, 81, 143-151, **2008**.
2. Arroyo Miguel. *Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones*. Ars Pharmaceutica, 39:2, 23-39, **1998**.
3. Asther Michele, Estrada Maria Isabel, Haon Mireille. *Purification and characterization of a chlorogenic acid hydrolase from Aspergillus niger catalysing the hydrolysis of chlorogenic acid*. Journal of Biotechnology, 115, 47-56, **2005**.
4. Boller Thomas, Meier Christian, Menzler Stefan. *EUPERGIT Oxirane Acrylic Beads: How to Make Enzymes Fit for Biocatalysis*. Organic Process Research and Development, 6, 509-519, **2002**.
5. Bornscheuer Uwe T. *Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis*. FEMS Microbiology Reviews, 26, 73-81, **2002**.
6. Castillo, Jose Miguel. *Obtención enzimática de ácido caféico a partir de ácido clorogénico recuperado de café verde*. Tesis de licenciatura (Químico en alimentos). Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 12-14, **2007**.
7. Cao Linqiu. *Immobilised enzymes: science or art?*. Bioorganic chemistry / Biocatalysis and biotransformation, 9, 217 – 226, **2005**.
8. Chen Miao-Fen, Keng Peter. *Caffeic acid phenethyl ester decreases acute pneumonitis after irradiation in vitro and in vivo*. BioMed Central Ltd, 5, 1-9, **2005**.
9. Clifford, M. N. *Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism*. J.Sci. Food Agric. 80, 1033-1040, **2000**.
10. Cuvelier, M., Bondety, V., Berset, C. *Behaviour of Phenolic Antioxidants in a Partitioned Medium: Structure Activity Relationship*. J Am Oil Chem Soc, 77, 819-823, **2000**.
11. De Vries R.P., Michelsen B., Poulsen C.H., Kroon P.A., *The faeA Genes from Aspergillus niger and Aspergillus tubingensis Encode ferulic Acid Esterases Involved in Degradation of Complex Cell Wall Polysaccharides*. Applied and Environmental Microbiology, 63, 4638-4644, **1997**.

12. Deetz Jeffrey, Rozzell David. *Catalysis by Alcohol Dehydrogenases in Organic Solvents*. Biocatalysis for Industry, Plenum Press, New York, **1991**.
13. Dixon Malcolm, Webb Edwin C. *Enzymes*. 3a edición, Editorial Longman Group, Inglaterra, pp. 300-316, **1979**.
14. Dordick Jonathan. *An Introduction to Industrial Biocatalysis*. Biocatalysis for Industry, Plenum Press, New York, **1991**.
15. Faulds Craig B., Williamson Gary. *Purification and characterization of ferulic acid esterase (FAE-III) from Aspergillus niger: specificity for the phenolic moiety and binding to microcrystalline cellulose*. Microbiology, 140, 779-787, **1994**.
16. Faulds Craig B. *What can feruloyl esterases do for us?*. Phytochemistry Reviews, 9, 121-132, **2009**.
17. Faulds Craig B., Zanichelli Dario, Crepin Valerie F. *Specificity of feruloyl esterases for water-extractable and water-unextractable feruloylated polysaccharides: influence of xylanase*. Journal of cereal science, 28, 281-288, **2003**.
18. Fazary Ahmed, Ju Yi-Hsu. *The large scale use of feruloyl esterases in industry*. Biotechnology and Molecular Biology Reviews, 3, 95-110, **2008**.
19. Fersht Alan. *Enzyme Structure and Mechanism*. 2da edición, Editorial W.H. Freeman and Company, EUA, pp. 17-23, **1997**.
20. Fiuza S.M., Gomes C., Teixeira L.J. *Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties-a structure- activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids*. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 12, 3581-3589, **2004**.
21. Gris E.F., Ferreira E.A., Falcao L.D., Bordignon-Luiz M.T., *Caffeic acid copigmentation of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grape extracts in model system*. Food Chemistry Journal, 100, 1289-1296, **2007**.
22. Gris E.F., Ferreira E.A. *Caffeic acid copigmentation of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grape extracts in model system*. Food Chemistry, 100, 1289-1296, **2007**.
23. Guglielmetti Simone, De Noni Ivano, Caracciolo Federica. *Bacterial Cinnamoyl Esterase Activity Screening for the Production of a Novel Functional Food Product*. Applied and Environmental Microbiology, 74, 1284-1288, **2008**.

-
24. Hall Clifford. *Origen de los antioxidantes naturales: aceites de semillas, frutos secos, cereales, legumbres, productos de origen animal y de origen microbiano*. Antioxidantes de los alimentos, aplicaciones prácticas, 1ª edición, editorial Acribia S.A., España, **2001**.
25. Hegde Shyamala, Srinivas Pullabhatla, Muralikrishna Gudipati. *Single-step synthesis of 4-nitrophenyl ferulate for spectrophotometric assay of feruloyl esterases*. Analytical Biochemistry, 387, 128-129, **2009**.
26. Hong Chen Jiang, Ho Chi-Tang. *Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds*. J.Agric. Food Chemistry, 45, 2374-2378, **1997**.
27. Jaikang Churdsak, Chaiyasut Chaiyavat. *Caffeic acid and its derivatives as heme oxygenase 1 inducer in Hep G2 cell line*. Journal of Medicinal Plants Research, 4, 940-946, **2010**.
28. Janicsak Gabor, Mathe Imre, Miklossy-Vari Vilmos, Blunden Gerald. *Comparative studies of the rosmarinic and caffeic acid contents of Lamiaceae species*. Biochemical Systematics and Ecology, 27, 733-738, **1999**.
29. Kennedy J.F. *Principios de la inmovilización de enzimas*. Manual de biotecnología de las enzimas, 2ª edición, Editorial Acribia S.A., España, **1985**.
30. Koseki Takuya, Fushinobu Shinya, Ardiansyah, Shirakawa Hitoshi, Komai Michio. *Occurrence, properties and applications of feruloyl esterases*. Applied Microbiology and Biotechnology, 84, 803-810, **2009**.
31. Koseki Takuya, Hori Akane, Seki Shouji. *Characterization of two distinct feruloyl esterases AoFaeB and AoFaeC, from Aspergillus oryzae*. Applied Microbiology and Biotechnology, 83, 689-696, **2009**.
32. Kurata Atsushi, Kitamura Yuki, Irie Shiori. *Enzymatic synthesis of caffeic acid phenethyl ester analogues in ionic liquid*. Journal of Biotechnology, 148, 133-138, **2010**.
33. Laranjinha. *Caffeic acid and related antioxidant Compounds: Biochemical and Cellular Effects*. Handbook of antioxidants, 2ª edición, Editorial Marcel Dekker, Inc., EUA, **2001**.
34. Lehninger A., Nelson DL, Cox M. *Principles of Biochemistry*, Worth Publishers, 2ª edición, **1997**.

35. Lu Yinrong, Foo Yeap L. *Polyphenolics of Salvia, a review*. *Phytochemistry, the International Journal of Plant Chemistry, Plant Biochemistry and Molecular Biology*, 59, 117-140, **2002**.
36. Madhava M., Sulochanamma G., Sampathu S.R. *Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee*. *Food Chemistry*, 107, 377-384, **2008**.
37. Martínez S., González J., et al. *Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes*. *Nutrición Hospitalaria*, 6, 271-278, **2002**.
38. Mastihuba V., et al. *A spectrophotometric assay for feruloyl esterases*. *Analytical Biochemistry*, 309, 96-101, **2002**.
39. Neidleman S.L. *Historical Perspective on the Industrial Uses of Biocatalysis*. *Biocatalysis for Industry*, Plenum Press, New York, **1991**.
40. Nelson David L., Cox Michael M. *Principles of Biochemistry (Lehninger)*. 4a edición, Editorial W. H. Freeman and Company, EUA, pp. 190-223, **2005**.
41. O'Connell J.E. y Fox P.F. *The two-stage coagulation of milk proteins in the minimum of the heat coagulation time-pH profile of milk: effect of casein micelle size*. *Journal of Dairy Science*, 83, 378-386, **2000**.
42. Petersen Maïke, Simmonds Monique. *Rosmarinic acid*. *Phytochemistry Journal*, 62, 121-125, **2003**.
43. Ralet Marie-Christine, Faulds Craig B. Williamson Gary. *Degradation of feruloylated oligosaccharides from sugar-beet pulp and wheat bran by ferulic acid esterases from Aspergillus niger*. *Carbohydrate Research*, 263, 257-269, **1994**.
44. Rumbold Karl, Biely Peter, Mastihubova Maria Gudelj Marinka. *Purification and Properties of a Feruloyl Esterase Involved in Lignocellulose Degradation by Aureobasidium pullulans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 5622-5626, **2003**.
45. Sarker S.D., Shaheen E.M., Eynon E., Nahar L., *Caffeic acid Decyl Ester: an antioxidant*. *Chemistry of Natural Compounds*, 41, 293-296, **2005**.
46. Shin Kyung-Min, Kim In-Tae, Park Young-Mi. *Anti-inflammatory effect of caffeic acid methyl ester and its mode of action through the inhibition of prostaglandin E₂ nitric oxide and tumor necrosis factor- α production*. *Biochemical Pharmacology*, 68, 2327-2336, **2004**.
47. Tazaki Hiroyuki, Kawabata Jun, Fujita Takashi. *Novel Oxidative Dimer from Caffeic Acid*, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry Journal*, 67, 1185-1187, **2003**.

-
48. The Merck Index: An encyclopedia of chemicals, drugs and biological. 13th edition. Editorial staff. Publisher by Merck research laboratories division of Merck Fco., Inc. New Jersey. pp. 274; 298; 1443, **2001**.
49. Tu Maobing, Zhang Xiao, Kurabi Arwa. *Immobilization of β -glucosidase on Eupergit C for lignocelluloses hydrolysis*. Biotechnology Letters, 28, 151-156, **2006**.
50. Vafiadi Christina, Topakas Evangelos, Christakopoulos Paul. *Preparation of multipurpose cross-linked enzyme aggregates and their application to production of alkyl ferulates*. Journal of Molecular Catalysis, 54, 35-41, **2008**.
51. Virgil F., Scaccini C., et al. *Enfermedades cardiovasculares y sustancias fenólicas nutricionales*. Antioxidantes de los alimentos, aplicaciones prácticas, 1^a edición, Editorial Acribia S.A., España, **2001**.
52. Wang Jun, Lu Dingqiang, Zhao Hui. *Application of response surface methodology optimization for the production of caffeic acid from tobacco waste*. African Journal of Biotechnology, 8, 1416-1424, **2009**.
53. Yanishlieva V., Heinonen, M. *Origen de los antioxidantes naturales: verduras, frutas, hierbas, especias y té*. Antioxidantes de los alimentos, aplicaciones prácticas, 1^a edición, Editorial Acribia S.A., España, **2001**.
54. Yoshimoto Makoto, Kurata-Azuma Rie, Fujii Makoto, Hou De-Xing. *Enzymatic Production of Caffeic Acid by Koji from Plant Resources Containing Caffeoylquinic Acid Derivatives*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry Journal, 69, 1777-1781, **2005**.
55. Zaks Aleksey. *Enzymes in Organic Solvents*. Biocatalysis for Industry, Plenum press, New York, **1991**.
56. Zamora S. Juan Diego. *Antioxidantes: Micronutrientes en lucha por la salud*. Revista Chilena de Nutrición, 34, **2007**.