

UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA-UPTC
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE POSGRADOS
MAESTRÍA EN QUÍMICA



EXTRACCIÓN DE SOLASODINA DE LA ESPECIE *Solanum marginatum* USANDO B-
GLUCOSIDASA INMOVILIZADA SOBRE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE
 CoFe_2O_4

J. MAURICIO GARCÍA COLMENARES

Tunja, 2017

UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA-UPTC
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE POSGRADOS
MAESTRÍA EN QUÍMICA



EXTRACCIÓN DE SOLASODINA DE LA ESPECIE *Solanum marginatum* USANDO B-
GLUCOSIDASA INMOVILIZADA SOBRE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE
 CoFe_2O_4

Trabajo de Investigación como requisito parcial para optar al grado de Magister en
Química

J. MAURICIO GARCÍA COLMENARES

Autor

JULIA C. REYES CUELLAR

Tutor

Tunja, 2017

ACTA

UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE POSGRADOS
MAESTRÍA EN QUÍMICA
COMITÉ DE CURRÍCULO

El día ____ de _____ de _____, el(la) señor(a) _____ realizó la sustentación pública de su trabajo de grado titulado _____. Los jurados designados según el Artículo 36 del Acuerdo 052 de 2012, acordaron asignar una nota final del trabajo de grado igual a _____, correspondiente a la escala cualitativa de _____ (Artículo 40 del Acuerdo 052 de 2012).

Para constancia de lo anterior, firman:

Director de Posgrados Facultad de Ciencias

Coordinador Programa de Maestría
en Química

Jurado 1

Jurado 2

Director del Trabajo de Grado

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación, el cual abrió diversas puertas donde encontré las oportunidades que me han permitido fortalecer mis conocimientos y crecer como persona, está dedicado principalmente a mi familia:

A mis padres: Georgina Colmenares Gayón y José A. García Sandoval, a mis hermanos: Alexander, Wilson, Jorge y Andrés, por su apoyo, el cual me ha permitido alcanzar las metas propuestas.

En Ellos encontré la motivación y sentido de superación. Comprendí que cuando quieres algo, lo puedes conseguir, más aún entendí, que no debería permitir que mis sueños se redujeran al tamaño de mis ingresos, mis ingresos crecerán al tamaño de mis sueños, siempre teniendo presente que no importa cuántos ingresos puedas generar, lo importante es en la persona que te vas a convertir.

A Dios por estar siempre junto a mí, y colocar en mi camino a personas gratas que me han acompañado en toda mi formación integral.

Mauricio

AGRADECIMIENTOS

Dentro de mi formación como persona y profesional, se me presentó una oportunidad académica para adelantar estudios en Maestría en Química, al lograrlo, quiero expresar mis sinceras muestras de agradecimiento a las personas e instituciones que hicieron posible la llegada.

A la docente Julia C. Reyes, directora del proyecto, por todo el apoyo, confianza y estar siempre ahí dispuesta a colaborar, incentivar a seguir adelante y lograr los objetivos propuestos.

Al Grupo de Investigación de Química Ambiental GIQUA, de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia: Leidy, Estefanía, Natalia, Angie, Jhonatan, Yovanny, Claudia, Guissell, J. David.... porque el grupo fue mi segundo hogar, allí compartí momentos inolvidables que me permitieron afianzar más mis conocimientos, me hicieron crecer como persona, y profesional.

A COLCIENCIAS y a la gobernación de Boyacá, por el otorgamiento de una beca para cursar estudios de maestría en Química. Beca correspondiente a la convocatoria No. 733 de 2015 formación de capital humano de alto nivel para el departamento de Boyacá.

RESUMEN

A nivel industrial, el uso de enzimas inmovilizadas simplifica el proceso y disminuye el costo económico de la producción. Se investigó el reuso de la enzima β -glucosidasa inmovilizada sobre nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto CoFe_2O_4 activadas con glutaraldehído, para aplicarla en la hidrólisis de extractos de solasonina, provenientes de frutos semimaduros de la especie *Solanum marginatum*. El trabajo se dividió en cinco capítulos. En el capítulo I, se aborda el soporte teórico del trabajo de investigación. En el capítulo II, se presenta la síntesis y caracterización de las nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto (CoFe_2O_4). Se sintetizaron tres relaciones molares de nanopartículas. Se evaluó el rendimiento de síntesis y la atracción magnética, obteniendo mejores resultados con la relación $\text{Co}_{40}\text{Fe}_{60}$. Con estas nanopartículas, en el capítulo II, se realizó el proceso de inmovilización usando como modelo la enzima bromelina. La inmovilización se efectuó covalentemente mediante puentes de glutaraldehído y nanopartículas recubiertas con quitosano. Los resultados de este capítulo se condensan en un artículo titulado: Cinética de bromelina inmovilizada sobre nanopartículas magnéticas de cobalto-hierro (CoFe_2O_4), enviado a la revista South African Journal of Science, el cual se encuentra en evaluación. En el capítulo III, se realizó la aplicación del sistema de inmovilización y caracterización de la enzima β -glucosidasa sobre nanopartículas magnéticas de CoFe_2O_4 activadas con glutaraldehído. Se evaluaron cuatro tipos de inmovilización. La β -glucosidasa tipo A presentó la mayor eficiencia de inmovilización con $84,6 \pm 2,1\%$. La actividad catalítica de la enzima libre e inmovilizada fue determinada en $93 \pm 2,6$ y $82 \pm 2,8\%$ respectivamente. La inmovilización tipo D presentó el porcentaje de inmovilización más bajos con $25 \pm 2,4\%$. El sistema fue optimizado bajo las siguientes condiciones: 200 mg de NPM, glutaraldehído 1M, β -glucosidasa $5,7\text{E}-5\text{M}$, tiempo de inmovilización 16 horas a 60°C . La β -glucosidasa inmovilizada puede ser reutilizada durante diez ciclos manteniendo el $52 \pm 2,5\%$ de su actividad. La caracterización de las nanopartículas CoFe_2O_4 ($\text{Co}_{40}\text{Fe}_{60}$) y de la β -glucosidasa se evaluó por: microscopía electrónica de transmisión (TEM-STEM), difracción de rayos X (DRX) espectroscopias FT-IR y UV-vis, voltimetría cíclica (VC), voltimetría de onda cuadrada (VOC) y magnetometría de muestra vibrante (VSM). En el capítulo IV, se presenta la aplicación de la β -glucosidasa inmovilizada, en la hidrólisis de solasonina para obtención de solasodina a partir de frutos semimaduros de *Solanum marginatum*, logrando obtener un rendimiento de 1,8-2,5% y pureza de 89,2-91,3%. Siendo mayor cuando se realiza la extracción vía hidrólisis ácida. Sin embargo, esta diferencia es superada por la β -glucosidasa inmovilizada al lograr ser reutilizada durante diez ciclos y es amigable con el entorno natural. Como aporte, se realizó la caracterización por técnicas voltamperométricas aún no reportadas en la literatura, de las NPM- CoFe_2O_4 y de la β -glucosidasa inmovilizada. Se modificó el proceso de extracción de solasonina, fundamentado en la formación de sales de acetato de solasodina, haciéndolo amigable con el medio ambiente.

ABSTRACT

Industrial use of immobilized enzyme simplifies the process and improves the economics and process efficiencies. The reuse of immobilized β -glucosidase enzyme on glutaraldehyde-activated cobalt ferrite magnetic nanoparticles was investigated for the hydrolysis of solasonin extracts from semi-mature fruits of *Solanum marginatum*. The work was divided into five chapters. In Chapter I, the theoretical support of the research work is addressed. In Chapter II, the synthesis and characterization of the cobalt ferrite magnetic nanoparticles (CoFe_2O_4) is presented. Three molar ratios of nanoparticles were synthesized. The performance of synthesis and magnetic attraction were evaluated, obtaining better results with the relation $\text{Co}_{40}\text{Fe}_{60}$. With these nanoparticles, in chapter II, the immobilization process was performed using the enzyme bromelain as a model. The immobilization was performed covalently by glutaraldehyde bridges and chitosan-coat. The results of this chapter are condensed in an article titled: Kinetics of immobilized bromelain on magnetic nanoparticles of cobalt-iron (CoFe_2O_4), sent to the South African Journal of Science, which is being evaluated. In Chapter III, the immobilization and characterization of β -glucosidase enzyme was applied to glutaraldehyde activated CoFe_2O_4 magnetic nanoparticles. Four types of immobilization were evaluated. Type A β -glucosidase presented the highest immobilization efficiency with $84.6 \pm 2.1\%$. The catalytic activity of the free and immobilized enzyme was determined in 93 ± 2.6 and $82 \pm 2.8\%$ respectively. Type D immobilization showed the lowest immobilization percentage with $25 \pm 2.4\%$. The system was optimized under the following conditions: 200 mg of MNP, 1M glutaraldehyde, 5E-5M β -glucosidase, immobilization time 16 hours at 60°C . Immobilized β -glucosidase can be reused for ten cycles while maintaining $52 \pm 2.5\%$ of its activity. The characterization of the nanoparticles CoFe_2O_4 ($\text{Co}_{40}\text{Fe}_{60}$) and β -glucosidase was evaluated by: transmission electron microscopy (TEM-STEM), X-ray diffraction (XRD) FT-IR and UV-vis spectroscopies, cyclic voltammetry (CV), square wave voltammetry (SWV) and vibration sample magnetometry (VSM). In Chapter IV, the application of the immobilized β -glucosidase, in the hydrolysis of solasonin to obtain solasodine from semi-mature fruits of *Solanum marginatum*, is presented, obtaining a yield of 1.8-2.5% and purity of 89.2-91.3%. Being greater when the extraction is carried out via acid hydrolysis. However, this difference is overcome by the immobilized β -glucosidase to be reused for ten cycles and is friendly to the natural environment. As a contribution, characterization was performed by voltamperometric techniques not yet reported in the literature, of NPM- CoFe_2O_4 and immobilized β -glucosidase. The extraction process of solasonin, based on the formation of salts of acetate of solasodine, was modified, making it friendly with the environment.

INDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	15
2. CAPITULO I	20
OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE CoFe_2O_4	20
2.1. Introducción	20
2.2. EXPERIMENTAL	20
2.2.1. METODOLOGÍA - PROCEDIMIENTO	20
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
2.3.1. Síntesis y caracterización preliminar de NPM- CoFe_2O_4	22
2.3.2. Caracterización de nanopartículas magnéticas NPM- CoFe_2O_4 ($\text{Co}_{40}\text{Fe}_{60}$)....	22
2.4. CONCLUSIONES	28
3. CAPITULO II	30
ENZIMA BROMELINA USADA COMO MODELO PARA LA INMOVILIZACIÓN SOBRE NANOPARTICULAS MAGNETICAS DE COBALTO-HIERRO (CoFe_2O_4).....	30
3.1. Introducción	30
3.2. CINETICA DE BROMELINA IMMBILIZADA SOBRE NANOPARTICULAS MAGNETICAS DE COBALTO-HIERRO (CoFe_2O_4)	30
3.2.1. Resumen.....	30
3.2.2. Abstract	31
3.2.3. Introducción	32
3.3.4. MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
3.3.6. CONCLUSIONES	45
3. CAPITULO III	46
APLICACIÓN DEL SISTEMA DE INMOVILIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA β - GLUCOSIDASA SOBRE NPM DE CoFe_2O_4	46
4.1. Introducción	46
4.2. EXPERIMENTAL	46
4.2.1. METODOLOGÍA - PROCEDIMIENTO	46
4.3. RESULTADOS	49
4.3.1. Inmovilización de la enzima β -glucosidasa sobre NPM-G de CoFe_2O_4 (NPM- G-BGL)49	

4.3.2.	Optimización de condiciones de inmovilización	51
4.3.3.	Caracterización de la enzima β -glucosidasa inmovilizada sobre NPM-G (Co ₄₀ Fe ₆₀).....	53
4.3.4.	Determinación de la actividad enzimática y parámetros cinéticos de β -glucosidasa.....	57
4.3.5.	Evaluación de la estabilidad térmica y del pH de la β -glucosidasa libre e inmovilizada.....	59
4.3.6.	Reutilización de la β -glucosidasa inmovilizada.....	63
4.4.	CONCLUSIONES	65
5.	CAPITULO IV	66
	APLICACIÓN DE LA β -GLUCOSIDASA INMOVILIZADA SOBRE NPM-G, EN LA HIDRÓLISIS DE SOLASONINA PARA OBTENCIÓN DE SOLASODINA	66
5.1.	Introducción	66
5.2.	EXPERIMENTAL	66
5.2.1.	METODOLOGÍA - PROCEDIMIENTO	66
5.3.	RESULTADOS Y ANALISIS.....	69
5.3.1.	Obtención del extracto crudo de saponinas a partir de la especie " <i>Solanum marginatum</i> ".....	69
5.3.2.	Caracterización de solasodina.....	77
6.	CONCLUSIONES GENERALES	81
	REFERENCIAS	83
	ANEXOS.....	88

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Inmovilización de la β -glucosidasa sobre NPM-CoFe ₂ O ₄ , usando glutaraldehido como activador. TGA: glutaraldehído, β -Glu y R: β -glucosidasa.	19
Figura 2.1. Curva de magnetización de ferrita de cobalto CoFe ₂ O ₄ en relación Co ₄₀ Fe ₆₀ , determinada por magnetización de muestra vibrante (MMV) a temperatura ambiente.	23
Figura 2.2. Determinación de tamaño de NPM-CoFe ₂ O ₄ por microscopía electrónica de transmisión (TEM).	24
Figura 2.3. Difractograma de NPM de CoFe ₂ O ₄ Co ₅₀ Fe ₅₀ (NPM-1) y Co ₄₀ Fe ₆₀ (NPM) ...	25
Figura 2.4. Espectro FT-IR de NPM-CoFe ₂ O ₄ sintetizada y lavada con glutaraldehído....	26
Figura 2.5. Voltgrámas de Co ²⁺ , Fe ₂₊ y CoFe ₂ O ₄ por VOC (a) y por VC (b).	27
Figura 2.6. Estructura cristalina de CoFe ₂ O ₄ (fuente, el autor)	28
Figura 3.1. Reacción de inmovilización de la bromelina sobre NPM, usando quitosano como soporte y glutaraldehido como activador. Q-quitosano, glu-glutaraldehido, R-bromelina.	33
Figura 3.2. Curvas de magnetización a temperatura ambiente de NMM-CoFe ₂ O ₄ y la bromelina inmovilizada.	37
Figura 3.3. Micrografías electrónicas de Transmisión (TEM): CoFe ₂ O ₄ (izquierda) y CoFe ₂ O ₄ -Q-G-bromelina (derecha).	38
Figura 3.4. Espectro FT-IR. Sistema inmovilizado: CoFe ₂ O ₄ -glutaraldehido-Bromelina	39
Figura 3.5. Difractogramas de rayos X de NPM-CoFe ₂ O ₄	39
Figura 3.6. Polarógramas de estándares de hierro-cobalto y NPM-CoFe ₂ O ₄	40
Figura 3.7. Polarógramas de VOC y VC de la actividad electroactiva de las NPM-CoFe ₂ O ₄ y la bromelina inmovilizada sobre NPM-CoFe ₂ O ₄	41
Figura 3.8. Seguimiento proceso de inmovilización de la bromelina sobre NPM-CoFe ₂ O ₄	41
Figura 3.9. Diagrama de Michlaelis-Menten: Cinética de bromelina libre e inmovilizada	43
Figura 3.10. <i>Actividad enzimática de bromelina inmovilizada sobre NPM-Q-G</i>	44
Figura 4.1. Polarógramas de VOC y VC de la actividad electroactiva de las NPM-CoFe ₂ O ₄ y la β -glucosidasa inmovilizada sobre NPM-CoFe ₂ O ₄ (NPM-G-BGL).	50
Figura 4.2. Seguimiento proceso de inmovilizacion de β -glucosidasa sobre NPM-G de CoFe ₂ O ₄ . Seguimiento por VOC (izquierda) y seguimiento po UV-Vis (derecha).	51
Figura 4.3. Curva de calibración de Albúmina Sérica Bovina	51
Figura 4.4. Curvas de magnetización a temperatura ambiente de NPM-CoFe ₂ O ₄ y β -glucosidasa inmovilizada sobre NPM-G.	53
Figura 4.5. Micrografías electrónicas de Transmisión (TEM): NPM-CoFe ₂ O ₄ (izquierda) y NPM-G-BGL (derecha).	54
Figura 4.6. Espectro FT-IR. Sistema inmovilizado: β -glucosidasa inmovilizada sobre NPM-CoFe ₂ O ₄ (Co ₄₀ Fe ₆₀) NPM-G-BGL.	56
Figura 4.7. Difractograma de β -glucosidasa inmovilizada sobre NPM-G (Co ₄₀ Fe ₆₀).....	57

Figura 4.8. Curva de calibración de DNS para determinación de glucosa (izquierda), y velocidad máxima de reacción de la β -glucosidasa libre e inmovilizada (derecha).	58
Figura 4.9. Determinación de parámetros cinéticos de β -glucosidasa libre e inmovilizada. Diagrama de Michaelis-Menten (izquierda) y diagrama de Lineweaver-Burk (derecha). .	59
Figura 4.10. Evaluación del efecto de la concentración del sustrato celobiosa en la actividad catalítica de la de β -glucosidasa libre como inmovilizada.	59
Figura 4.11. Efectos principales T°C-pH para β -glucosidasa libre.	61
Figura 4.12. Efectos principales T°C-pH para β -glucosidasa inmovilizada.	62
Figura 4.13. Interacción de efectos principales T°C-pH para β -glucosidasa.	62
Figura 4.14. Interacción de efectos principales T°C-pH para β -glucosidasa inmovilizada	63
Figura 4.15. Reutilización y actividad enzimática de la β -glucosidasa inmovilizada sobre NPM-G. Izquierda reutilización y derecha pérdida de actividad en cada ciclo.	64
Figura 5.1. Acción catalítica de la enzima β -glucosidasa.	68
Figura 5.2. Variación de pH de frutos de <i>Solanum marginatum</i> en el proceso de autólisis.	70
Figura 5.3. Extracción de saponinas en base húmeda.	76
Figura 5.4. Modificación de proceso de extracción de alcaloides, base húmeda.	77
Figura 5.5. Espectro FT-IR correspondiente a la solasodina extraída por hidrólisis con β -glucosidasa inmovilizada sobre NPM-G.	78
Figura 5.6. Espectro FT-IR correspondiente a la solasodina extraída por hidrólisis ácida	78
Figura 5.7. Cromatograma GC-MSD de solasodina extraída de <i>Solanum marginatum</i> via hidrólisis con β -glucosidasa inmovilizada sobre NPM-G.	79
Figura 5.8. Cromatograma GC-MSD de solasodina extraída de <i>Solanum marginatum</i> via hidrólisis ácida.	80

INDICE DE TABLA

Tabla 2.1. Caracterización preliminar de NPM-CoFe ₂ O ₄ sintetizadas por el método poliol	22
Tabla 2.2. Resultados de cuantificación de NPM-CoFe ₂ O ₄ (Co ₄₀ Fe ₅₀), realizado por TEM-EDX.	24
Tabla 3.1. Caracterización preliminar de NPM-CoFe ₂ O ₄ sintetizadas	36
Tabla 3.2. Evaluación de condiciones de recubrimiento de NPM-Q-G con bromelina.....	42
Tabla 4.1. Evaluación de condiciones de recubrimiento de NPM-G con β-glucosidasa.....	52
Tabla 4.2. Resultados de cuantificación de NPM-G-BGL (Co ₄₀ Fe ₆₀), realizado por TEM-EDX	55
Tabla 4.3. Diseño experimental factorial balanceado 5 ² , para la evaluación de la estabilidad térmica y del pH de la enzima libre e inmovilizada.....	60
Tabla 5.1. Composición de frutos semimaduros de Solanum marginatum y rendimiento de solasodina determinada en base seca.	74
Tabla 5.2. Constantes físicas de la solasodina extraída de frutos de la especie Solanum marginatum.	77

INDICE DE IMÁGENES

Imagen 5.1. Frutos de <i>Solanum marginatum</i> y proceso de autólisis.....	70
Imagen 5.2. Proceso de autólisis de frutos de <i>Solanum marginatum</i>	71
Imagen 5.3. Torta obtenida de proceso de hidrólisis enzimática (izquierda) y extracción etanol-ácido acético (derecha).	71
Imagen 5.4. Precipitación de la solasodina.	72
Imagen 5.5. Seguimiento por cromatografía de capa fina del proceso de purificación de solasodina.....	73
Imagen 5.6. Seguimiento por CCF del proceso de cristalización de solasodina (izquierda) y solasodina pura obtenida (derecha).....	74

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Espectro FT-IR de solución estándar de glutaraldehído	88
Anexo 2. Espectro FT-IR. Estándar de la enzima β -glucosidasa	88
Anexo 3. Espectro FT-IR. Sistema inmovilizado: CoFe_2O_4 -glutaraldehído- β -glucosidasa	89
Anexo 4. Método de extracción tradicional para alcaloides, en base seca	89

1. INTRODUCCIÓN

La industria farmacéutica y cosmética son sectores industriales que generan altos beneficios económicos a nivel mundial. Se estima que cada año en el mundo se invierten alrededor de US \$60 billones en productos naturales, no maderables. El mercado de los extractos vegetales medicinales se calcula en US \$16,5 billones, y se estima que la venta de estos productos crece aproximadamente un 25% anual desde 2001 a 2021 [1]. La producción de fármacos esteroidales emplea saponinas, las cuales son compuestos químicos naturales usados como precursores en la síntesis de corticoides, hormonas sexuales y anabólicos. Una de las saponinas más usadas e importantes en la síntesis de fármacos esteroides fue la diosgenina, aislada por Marker en 1943, de una especie *Dioscorea* conocida como “cabeza de negro” en México. Pero su abastecimiento empezó a escasear hasta que fue reemplazada por la hecogenina; sin embargo la demanda sigue superando la oferta de este precursor.

Se ha identificado un mercado global insatisfecho en el sector farmacéutico de 5000 ton/año, y Colombia participa con el 0,2 % en importaciones de este producto según Intercontinental Medical Statistics, 2006 [2]. Esto motivó al auge de la búsqueda de nuevas fuentes naturales de saponinas que sirvan como precursores de fármacos esteroidales principalmente corticoides, hormonas sexuales, anticonceptivos y anabólicos, que se han extraído de las familias Liliaceae y Solanaceae. Hasta la fecha se ha reportado la extracción y aislamiento de saponinas y glicoalcaloides de más de 300 especies. Algunos de estos extractos son de interés farmacéutico. Según la literatura científica se reportan algunas especies vegetales promisorias, identificadas como de interés farmacéutico, entre ellas: *Solanum khasianum* [3], *Solanum americanum* [3], *Solanum mammosum* [4], y *Solanum marginatum* [5].

El género *Solanum* pertenece a la familia de las Solanaceae, que incluye más de 1000 especies y se usan para obtener solasodina, con rendimiento de 65% de acetato de pregnadienolona un intermediario en la síntesis de fármacos esteroides, el cual puede substituir a la diosgenina [6].

La solasodina es un alcaloide esteroídico, que ha sido aislada de más de 300 especies vegetales de la familia de las Liliaceae y Solanaceae, especialmente del género *solanum* y *Licopersicon*, y generalmente se encuentran en forma de glucósidos [7] [6]. Se obtiene por hidrólisis de la solasonina, la cual es un glicósido de solasodina, y es producido en las plantas de la familia Solanaceae; sirve de materia prima para la síntesis de diferentes tipos de hormonas y compuestos esteroidales, como: la progesterona, la testosterona, la

hidrocortisona, la cortisona, los andrógenos y estrógenos, la prednisona y la prednisolona [8].

La especie *Solanum marginatum* pertenece al género solanum, es un arbusto originario de Etiopia, introducida al nuevo continente hace unos 140 años. El arbusto se denomina “lulo de perro”, “jaboncillo” o “bola de oro”, crece en la región boyacense y se considera maleza; desaprovechando el alto contenido de solasodina entre 0,7 a 2,3% en peso seco en frutos y entre 0,1 a 0,5% en la hojas [9].

Las diferentes rutas químicas usadas para extraer saponinas y alcaloides de matrices vegetales se basan en la naturaleza polar de estos compuestos, se realizan en base seca o base húmeda, incluye: proceso de extracción en caliente o en frío, con agua o alcoholes de bajo peso molecular, como metanol, etanol, butanol o mezclas acuosas de estos alcoholes en diversas proporciones [10]; también involucra una hidrólisis ácida para generar la ruptura del enlace glicosídico de la solasonina, liberando la solasodina y finalmente se requieren procesos adicionales de purificación. El proceso tradicional de hidrólisis de solasonina emplea ácidos inorgánicos (HCl, H₂SO₄) en altas concentraciones 4-10 N, requiere tiempos largos de reacción 4-8 horas y se generan residuos peligrosos para el entorno natural.

Llevar a cabo la reacción de hidrólisis con el uso de enzimas evitaría las dificultades de empleo de alta concentración de reactivos y generación de residuos tóxicos al entorno natural, pero su viabilidad se limita por su alto costo.

Los rendimientos de extracción de solasodina varían de 0,7-2,4% en base seca, dependiendo del método de extracción empleado y según algunos autores el estado de madurez del fruto de “jaboncillo” afecta significativamente el rendimiento de solasodina [5].

Para evitar la generación de residuos peligrosos al medio ambiente, y superar el inconveniente del alto costo de la obtención de solasodina vía hidrólisis enzimática homogénea. Por lo tanto, se ha planteado como alternativa, la hidrólisis enzimática heterogénea que permite la reutilización de la enzima β -glucosidasa inmovilizada sobre un soporte apropiado, a bajo costo.

Como sistema modelo se usó la enzima bromelina, la cual se inmovilizó sobre nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto (NPM-CoFe₂O₄). La inmovilización se realizó usando quitosano como soporte y glutaraldehído como agente activador. La actividad de la enzima inmovilizada fue evaluada en la hidrólisis de caseína. El sistema optimizado de inmovilización se aplicó a la inmovilización de la enzima β -glucosidasa.

Son pocos los estudios que reportan el uso de la β -glucosidasa inmovilizada en la hidrólisis de biomasa. Sin embargo ha sido utilizada para promover la degradación de biomasa de celobiosa [11] y celulosa [12] [13]. En la mayoría de los casos, después del primer uso no es posible recuperarla y reutilizarla, por cual este proceso resulta muy costoso.

La inmovilización de la enzima β -glucosidasa se ha llevado sobre diferentes soportes sólidos [14]. Recientemente, los nuevos nanomateriales tienen áreas superficiales elevadas y son atractivas para aumentar el área de contacto de las enzima en comparación con soportes voluminosos convencionales [13]. Se han inmovilizado enzimas para la producción de bioenergía sobre diversos tipos de nanomateriales [15]. Entre los métodos de unión, la inmovilización covalente es la unión más estable entre grupos amino de enzima y grupos carbonilo de los soportes de nanomateriales activados con glutaraldehído con formación de una base de Schiff, esta unión enzima-nanopartícula es fuerte [15], de modo que permite trabajar adecuadamente a la enzima en las condiciones de reacción que se establecen: temperatura de 40-60°C, pH de 4-6 y agitación de 50-250 rpm.

El quitosano es un soporte común, económico e ideal para la inmovilización de enzimas, debido a la presencia de grupos amino libres, los cuales pueden formar bases de Schiff en presencia de glutaraldehído. Entre sus ventajas características se destaca su notable afinidad por las proteínas, la capacidad para la formación de geles, resistencia a la degradación química y propiedades anti-bacteriales [16].

Las nanoestructuras metálicas son una alternativa para la inmovilización de enzimas. El gran área superficial de las nanopartículas magnéticas favorecen la alta capacidad vinculante y la alta especificidad catalítica de la enzima conjugada [17] [18]. Adicionalmente, la susceptibilidad del campo magnético revela un mecanismo eficiente para la recuperación del complejo enzima de este modo se previene la contaminación del producto final por presencia de la enzima [19].

Las nanopartículas más estudiadas hasta el momento son las de magnetita (Fe_3O_4); este tipo de nanopartículas destaca por su bajo coste, bajo campo coercitivo, facilidad de modificación superficial y niveles de magnetización aceptables [20], [21].

Dentro de las técnicas de caracterización de nanoestructuras magnéticas se destaca la Microscopía electrónica de barrido y transmisión (SEM y TEM), difracción de rayos X (DRX), magnetometría de muestra vibrante (VSM), espectroscopia infra-roja con transformada de Fourier (FT-IR), Espectroscopía Fotoelectrónica de rayos X (XPS) (AFM). Sin embargo, a través de técnicas Voltamétricas y Polarográficas es posible caracterizar nanoestructuras magnéticas. La nanopartícula objeto de este estudio es CoFe_2O_4 , el

contenido de hierro y cobalto en la estructura, es posible determinarla y caracterizarla por técnicas electroanalíticas.

La determinación de cobalto por voltametría sobre electrodos de mercurio estacionarios y polarografía con electrodos de gota de mercurio suspendida ha sido reportada por muchos autores. Para solucionar los problemas asociados con la irreversibilidad y la baja sensibilidad de los métodos de redisolución debido a la baja solubilidad del cobalto en mercurio, se han empleado agentes complejantes y monitoreado la señal de adsorción del complejo de cobalto formado [22]. Urbanska, (1985) [23], logro la determinación de cobalto en concentraciones de 5,8 ppm en presencia de interferencias de níquel, el estudio fue realizado a pH 5,5-7,5 usando oxalato como agente complejante.

Teniendo como referente los estudios realizados para la determinación de hierro y cobalto, como aporte en este trabajo se presenta una alternativa de análisis aun no descrito y reportado por la bibliografía para la caracterización de nanopartículas metálicas, se trata de la técnica de Voltametría de Onda Cuadrada (VOC) y Voltametría Cíclica (VC). Entre sus ventajas se destaca que es un análisis rápido, económico, no genera residuos peligrosos al entorno natural, presenta alta sensibilidad ideal para determinaciones a nivel de trazas (ppt, ppb y ppb). El objeto de este capítulo es sintetizar y caracterizar nanoestructuras magnéticas de CoFe_2O_4

El presente trabajo describe en el capítulo I, la síntesis de nanoestructuras magnéticas de CoFe_2O_4 (NPM- CoFe_2O_4), realizado por el método del poliol y describe su respectiva caracterización. En el capítulo II, se realiza la optimización de la inmovilización usando como enzima modelo la bromelina extraída de la piña, sobre nanopartículas magnéticas de CoFe_2O_4 (NPM-Q-G). Para esta fase se trabajó con bromelina debido a su fácil acceso y economía, con los datos de la optimización del proceso, se aplicó en la inmovilización de la enzima β -glucosidasa. El proceso de inmovilización se realizó con quitosano y glutaraldehído. Los resultados de este capítulo se condensan en un artículo titulado: Cinética de bromelina inmovilizada sobre nanopartículas magnéticas de cobalto-hierro (CoFe_2O_4), enviado a la revista South African Journal of Science, el cual se encuentra en evaluación. En el capítulo III, se presenta el proceso de inmovilización de la enzima β -glucosidasa, sobre nanopartículas magnética de CoFe_2O_4 (NPM-G-BGL), usando glutaraldehído como agente activador, de acuerdo con la reacción de la figura 1.1. La β -glucosidasa inmovilizada covalentemente sobre las nanopartículas magnéticas de CoFe_2O_4 (NPM-G), forma una base de Schiff unida a grupos aldehídos del glutaraldehído y los grupos amino terminal de la β -glucosidasa. La actividad de la enzima inmovilizada fue evaluada en la hidrolisis de celobiosa. En el capítulo IV, se realiza la aplicación de la β -glucosidasa inmovilizada sobre las NPM-G-BGL, la aplicación fue realizada en la hidrolisis de extractos de solasonina provenientes de frutos semimaduros de la especie *Solanum marginatum*, con el fin de obtener

solasodina, la cual se caracterizó y evaluó su rendimiento, en contraste se realizó la extracción de solasodina vía hidrolisis acida empleando H_2SO_4 4 N.

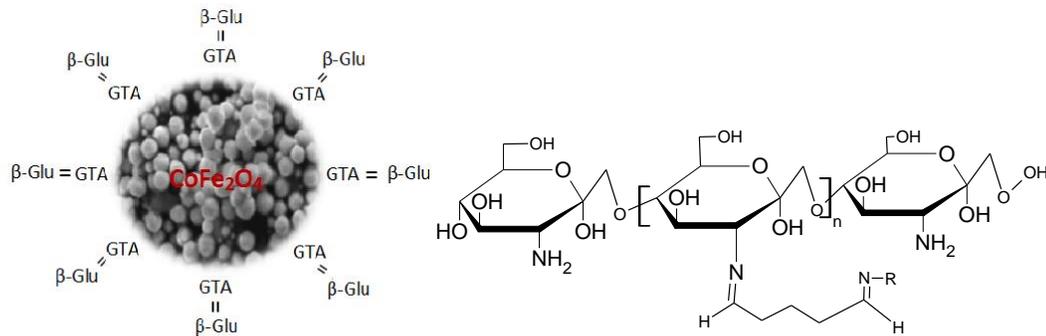


Figura 1.1. Inmovilización de la β -glucosidasa sobre NPM- CoFe_2O_4 , usando glutaraldehído como activador. TGA: glutaraldehído, β -Glu y R: β -glucosidasa.

El glutaraldehído recubre las NPM por interacción física y la enzima β -glucosidasa se une mediante enlace covalente a los grupos aldehídos del glutaraldehído formando bases de Schiff.

2. CAPITULO I

OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE CoFe_2O_4

2.1. Introducción

Este capítulo describe la síntesis de nanoestructuras magnéticas de CoFe_2O_4 (NPM- CoFe_2O_4), realizado por el método del polirol y describe su respectiva caracterización. Las NPM fueron sintetizadas usando etilenglicol como solvente, en el cual las sales de sulfato de hierro y cobalto son disueltas. Se sintetizaron tres relaciones molares de NPM, eligiendo la que presentó mejor rendimiento en la síntesis y mayor atracción magnética.

2.2. EXPERIMENTAL

2.2.1. METODOLOGÍA - PROCEDIMIENTO

La investigación planteada es experimental: se analizó el comportamiento de la variable respuesta (rendimiento de síntesis y atracción magnética de NPM- CoFe_2O_4) bajo condiciones controladas de laboratorio.

La revisión bibliográfica de fuentes primarias y secundarias especializadas, se hizo de manera transversal a lo largo de todo el trabajo, por lo que no se plantea como una fase de investigación.

2.2.1.1. Reactivos Químicos

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico. Sulfato de hierro pentahidratado 99,5%, sulfato de cobalto pentahidratado 99,5%, hidróxido de sodio 98%, ácido acético 99,5%, y glutaraldehído 25% se compraron a Panreac; citrato de sodio 98%, cloruro de amonio 99% y dimetilglioxima 98% fueron adquiridos de Merck. Todas las soluciones se prepararon con agua tipo I obtenida de un Q-millipore de conductividad 0,05 μs .

2.2.1.2. Fase1. Obtención de nanopartículas magnéticas de CoFe_2O_4

Síntesis y caracterización de nanopartículas magnéticas (NPM) de CoFe_2O_4 : Se siguió el procedimiento descrito por Chiriac y Moga, (2008) [24]. Una mezcla estequiométrica de sulfatos de Co y Fe a concentración total de 0,7 M de sulfatos, se disolvieron en 50 mL de etilenglicol 99%, a pH 11 ajustado con NaOH 3M y se sometió a reflujo con calentamiento controlado en el rango de 185-195°C, para obtener NPM $\text{Co}_{50}\text{Fe}_{50}$. Transcurridas cuatro horas de reacción, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente, y se filtró, el precipitado se secó a 120 °C durante 2h y luego se calcino a 650°C durante 4h. También se sintetizaron

NPM $\text{Co}_{20}\text{Fe}_{80}$ y $\text{Co}_{40}\text{Fe}_{60}$, en relación 1:4, 1:3, siguiendo el método descrito, pero cambiando el rango de temperatura de hidrólisis de 190-195°C.

Se estableció el porcentaje de rendimiento de la síntesis de las NPM y se evaluó la atracción magnética, que consistió en acercar un metal previamente pesado a las NPM y después tomar nuevamente el peso, la mayor cantidad de NPM que se adhieran al metal, se les atribuyó la mayor atracción magnética.

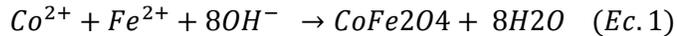
La morfología y el tamaño de distribución de las NPM seleccionadas se determinó por microscopía electrónica de transmisión (TEM-STEM) en un microscopio Tecnai G2 F20 de FEI, que a la vez permitió determinar su composición por microanálisis por dispersión de energías de rayos-X (TEM-EDX). La estructura cristalina de las NPM se evaluó por difracción de rayos X (DRX) en un difractor de rayos-X PW1700 de Philips, equipado con un generador PW1825 y con monocromador de grafito con un ángulo de 26°, utilizando radiación de Cu. Los grupos funcionales se determinaron usando la técnica ATR, en un espectrofotómetro Shimadzu IR-Prestige-21. El comportamiento electroquímico se determinó mediante voltametría cíclica (VC) y voltametría de onda cuadrada (VOC) en un polarógrafo CV-50W, equipado con un analizador voltamperométrico, y estación electroquímica CGME analizador, en una celda de tres electrodos, conformada de un electrodo de trabajo de mercurio, un electrodo de referencia Ag/AgCl BASI MF-2052 y un electrodo auxiliar de platino BASI MW-1032, las lecturas se realizaron en atmósfera inerte de nitrógeno y como patrón se utilizó una mezcla de estándares de hierro-cobalto. El comportamiento magnético de las NPM- CoFe_2O_4 y de la bromelina inmovilizada se midió en un Magnetómetro VERSALAB, de la Quantum Design, basado en la técnica de muestra vibrante (VSM).

A través de métodos polarográficos es posible caracterizar nanoestructuras metálicas; en este trabajo se presenta un análisis aun no descrito y reportado por la bibliografía, se trata de la técnica voltametría de onda cuadrada (VOC) y la voltametría cíclica (VC). El método sugerido por Bobrowski 1989 [25] y Schmidt 1988 [26], se tomaron como base experimental para la caracterización de las nanopartículas de CoFe_2O_4 , debido a la sensibilidad y especificidad que ofrece el uso de la dimetilglioxima como agente complejante del cobalto. Según estudios experimentales el hierro puede ser determinado con el mismo agente complejante. El estudio fue realizado por VOC y VC, mezclando 4,5 mL de citrato de sodio 0,1M, 0,5 mL de cloruro de amonio 0,1M y 1,5 mL de dimetilglioxima 2E-3M y ajustando la mezcla a pH 7,5. La mezcla se transfirió a la celda electroquímica, se desoxigenó con nitrógeno durante 60 segundos y se procedió a la medida polarográfica en las siguientes condiciones: potencial inicial: -1200 mV, potencial final -600 mV, sensibilidad 10 $\mu\text{A/V}$, tiempo de quietud 5seg, amplitud de onda 20 mV y frecuencia de onda 15 Hz.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Síntesis y caracterización preliminar de NPM-CoFe₂O₄

Los porcentajes de rendimiento de las NPM fueron calculados de acuerdo a la ecuación estequiométrica 1.



Se sintetizaron NPM-CoFe₂O₄ en proporciones Co₂₀Fe₈₀, Co₄₀Fe₆₀ y Co₅₀Fe₅₀. Evaluando el porcentaje de rendimiento de las NPM en la síntesis y la atracción magnética, que consistió en acercar un metal previamente pesado a las NPM y después tomar nuevamente el peso, la mayor cantidad de NPM que se adhirieran al metal, se les atribuyó la mayor atracción magnética. En la tabla 1 se presentan los resultados, se observa que las NPM en relación Co₄₀Fe₆₀, presentó los mejores criterios evaluados. El rendimiento en la síntesis de estas NPM fue del $13 \pm 0,9 \%$ y la atracción magnética fue alta. Se conoce que la magnetización de la NPM de cobalto-hierro depende de la concentración de hierro en la nanopartícula [27]. Los porcentajes son bajos debido a que el mayor porcentaje de peso atómico de las sales de sulfato empleadas, corresponden al peso atómico de los iones SO₄⁻.

Tabla 2.1. Caracterización preliminar de NPM-CoFe₂O₄ sintetizadas por el método poliol

NPM- CoFe ₂ O ₄	Parámetro evaluado		
	Rendimiento (%)	NPM atraída por un metal (mg)	Atracción magnética
Co ₂₀ Fe ₈₀	$9,8 \pm 0,25$	$12,3 \pm 2,1$	6
Co ₅₀ Fe ₅₀	$10,5 \pm 0,28$	$14,5 \pm 2,5$	7
Co ₄₀ Fe ₆₀	$13,2 \pm 0,32$	$17,2 \pm 3,2$	9

El parámetro de atracción magnética se les asignó una escala de medida numérica de 1-10, siendo 10 el número de más alto valor.

2.3.2. Caracterización de nanopartículas magnéticas NPM-CoFe₂O₄ (Co₄₀Fe₆₀)

Se evaluó las propiedades magnéticas de las NPM-CoFe₂O₄ en relación Co₄₀Fe₆₀, usando la técnica VSM. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente. La figura 2.1 presenta la saturación de magnetización de la NPM, que ocurre a 33,7 emu/g. La curva de histéresis obtenida revelan que las NPM-CoFe₂O₄ tienen comportamiento ferromagnético [28]. Esta NPM mantiene alto valor de saturación de magnetización, lo cual facilita su recuperación de soluciones por medio de un campo magnético externo. Los valores de magnetización para NPM de cobalto-hierro varían entre 20-140 emu/g [29].

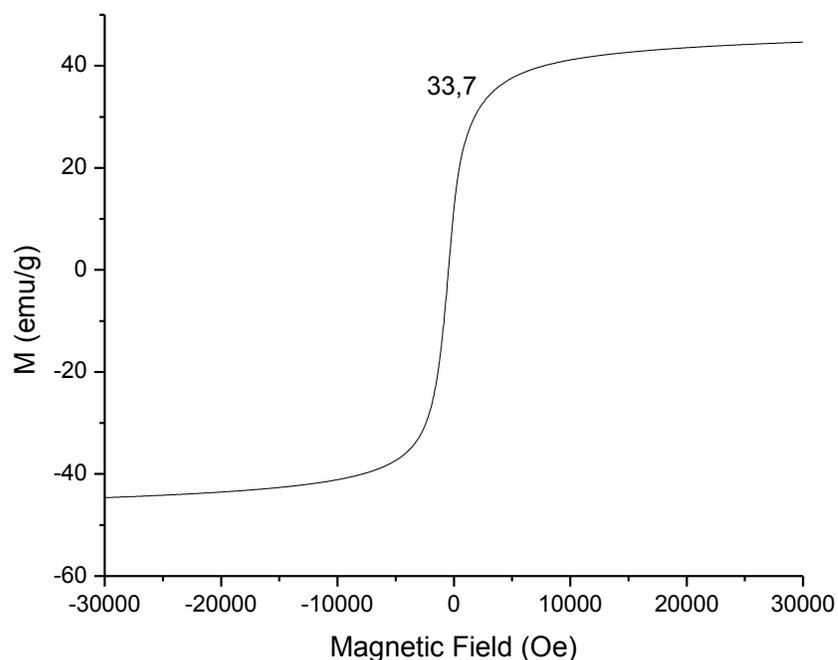


Figura 2.1. Curva de magnetización de ferrita de cobalto CoFe_2O_4 en relación $\text{Co}_{40}\text{Fe}_{60}$, determinada por magnetización de muestra vibrante (MMV) a temperatura ambiente.

La micrografía de transmisión típica de las nanopartículas de CoFe_2O_4 ($\text{Co}_{40}\text{Fe}_{60}$), se presentan en la figura 2.2. Como indica la figura, las NPM sintetizadas presentan distribución uniforme, se distingue una morfología ovalada con un diámetro promedio de $17,37 \pm 2,02$ nm. Esto confirma que el método del poliol empleado, es posible obtener estructuras a nivel nanométrico. Otros autores empleando este método cambiando el solvente etilenglicol por di-etilenglicol y usando sales de nitrato, han logrado sintetizar NPM de CoFe_2O_4 de tamaños nanométrico de 3-10 nm [30], Chiriac y Moga, (2008) empleado el mismo método de este trabajo, pero sin realizar calcinación, sintetizaron NPM de CoFe_2O_4 con diámetro comprendido de 80-500 nm [24]. Al contrastar la síntesis de estos tres trabajos se puede concluir que el proceso de calcinación contribuye a sintetizar materiales de tamaño nanométrico inferior a 20 nm.

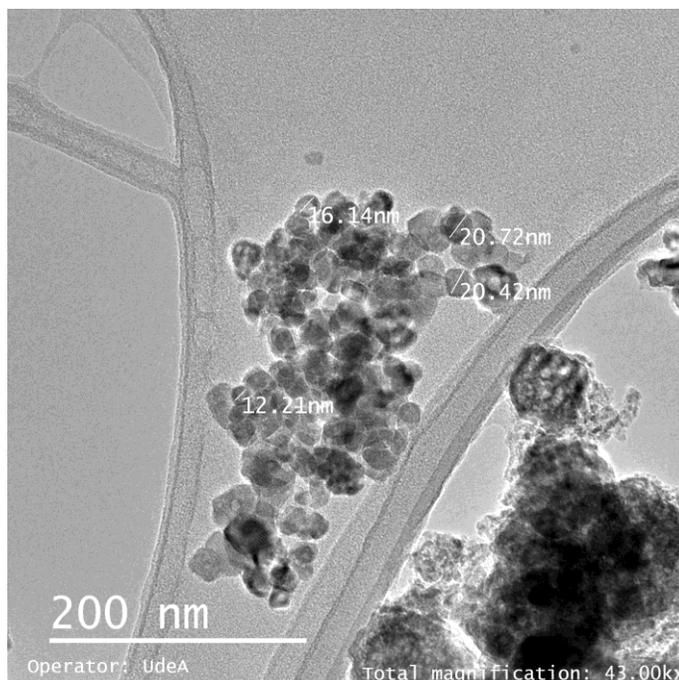


Figura 2.2. Determinación de tamaño de NPM- CoFe_2O_4 por microscopía electrónica de transmisión (TEM).

El análisis por EDX en la tabla 2, se presentan los datos sin ajustar, se observa que los elementos de la CoFe_2O_4 están en mayor proporción, se presentaron elementos como azufre el cual proviene de las sales de sulfato empleadas para la síntesis de las NPM, el silicio proviene del mortero donde se maceraron las muestras y el manganeso puede provenir de impurezas de los reactivos empleados. En parentesis se presenta el ajuste para cuantificación de cobalto, hierro y oxígeno en la NPM- CoFe_2O_4 . Como se detalla el elemento de mayor composición es el oxígeno, seguido del hierro y el cobalto. Evidenciando que las NPM- CoFe_2O_4 en relación $\text{Co}_{40}\text{Fe}_{60}$ fueron sintetizadas, lo cual se confirmó en los posteriores análisis de caracterización.

Tabla 2.2. Resultados de cuantificación de NPM- CoFe_2O_4 ($\text{Co}_{40}\text{Fe}_{60}$), realizado por TEM-EDX.

Element	Weight %	Atomic %	Uncert %	Correction	k-Factor
O (K)	24.36 (27,07)	52.75 (57.02)	0.05	0.51	1.889
Si (K)	1.94	2.39	0.01	0.92	1.000
S (K)	0.59	0.64	0.00	0.93	1.021
Mn (K)	0.45	0.28	0.00	0.99	1.372
Fe (K)	37.55 (37.47)	23.29 (22.64)	0.05	0.99	1.401
Co (K)	35.09 (35.49)	20.62 (20.32)	0.05	0.99	1.492

Valores en paréntesis corresponden a la Corrección para cuantificación de elementos en la NPM- CoFe_2O_4 ($\text{Co}_{40}\text{Fe}_{60}$).

El análisis por DRX para la NPM-CoFe₂O₄ en relación Co₄₀Fe₆₀, indicó la presencia de 7 picos característicos en 2θ: 20°, 35°, 42°, 52°, 68° y 75° (figura 2.3, NPM), los planos de estas señales están relacionados con los planos cristalográficos según índices de Miller (111), (220), (311), (422), (400), (511) y (440) respectivamente, correspondientes a una estructuras tipo espinela de CoFe₂O₄ con grupo espacial fd-3m (JCPDS database file, No.79e0418). El espectro NPM-1 corresponde a la NPM en relación Co₅₀Fe₅₀, que presentó un rendimiento de 10,5%, inferior al rendimiento de Co₄₀Fe₆₀ del 13,5%. La NP Co Fe equimolar también presentó menor cristalinidad debido probablemente a la presencia de sales de sulfatos de hierro y cobalto que no reaccionaron en el proceso de síntesis.

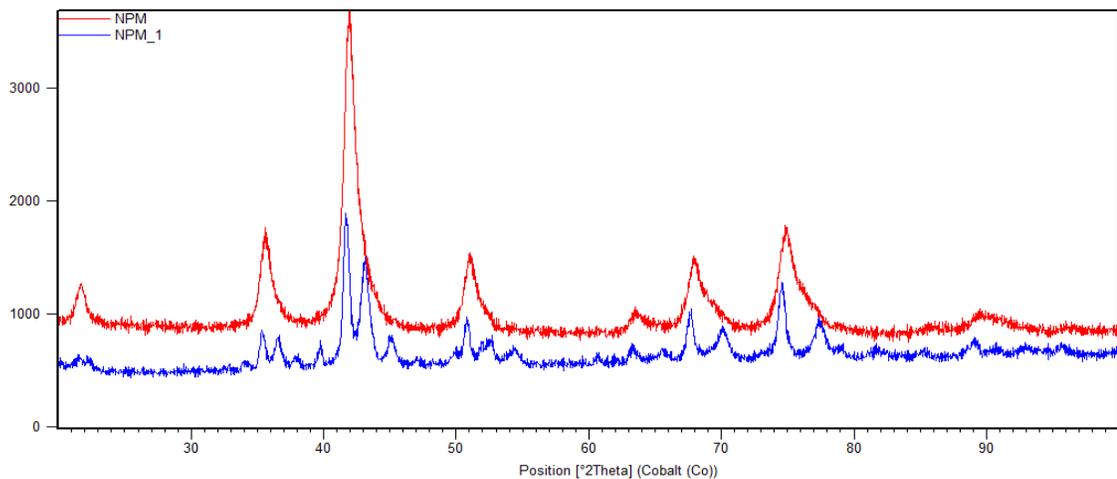


Figura 2.3. Difractograma de NPM de CoFe₂O₄ Co₅₀Fe₅₀ (NPM-1) y Co₄₀Fe₆₀ (NPM)

La Figura 2.4 presenta el análisis por FT-IR donde se observa una banda a 599 cm⁻¹ para las NPM-CoFe₂O₄ sintetizada, asignada a la vibración Fe-O-Co en la ferrita de cobalto, esta banda se encuentra normalmente entre 604-590 cm⁻¹ [31] [32] [33]. Adicionalmente alrededor de 1100 cm⁻¹ hay una señal correspondiente a la vibración de estiramiento de SO₄²⁻ proveniente de las sales de Co²⁺ y Fe²⁺ que no reaccionó [31]. Se muestra diferencia sustancial entre este espectro y el de una muestra sintetizada y lavada con solución de glutaraldehído, lo que muestra que el glutaraldehído usado para eliminar exceso de sulfatos es efectivo y contribuye a obtener NPM-CoFe₂O₄ de mejor pureza, los residuos de glutaraldehído se eliminó con un proceso de lavado con agua desionizada y secado a 60°C.

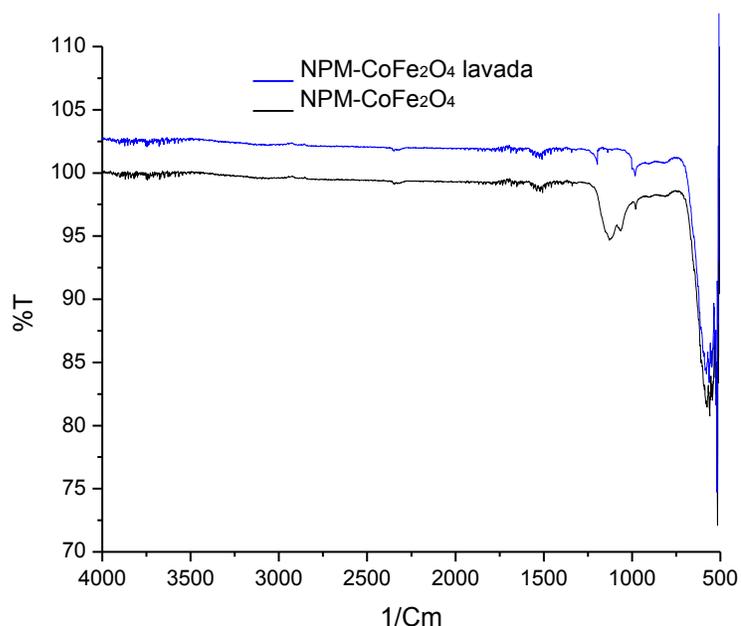


Figura 2.4. Espectro FT-IR de NPM-CoFe₂O₄ sintetizada y lavada con glutaraldehído

Los potenciales de reducción estándar en solución acuosa a 25°C, en mili-voltios respecto al electrodo normal de hidrogeno es de -280 mV para el cobalto y -409 mV para el hierro, los dos metales involucran dos electrones en el proceso redox [34]. El análisis de las NPM CoFe₂O₄, fue hecho en electrodo de gota de mercurio suspendida y la solución electrolítica contiene cloruro de amonio y citrato de sodio; inicialmente se analizaron los potenciales de reducción de los dos metales, observando que sufren desplazamientos hacia potenciales más negativos, siendo más notable en el cobalto. La formación del complejo metal-dimetilgloxima es soluble en el mercurio, aumentando hasta en cinco veces la sensibilidad y selectividad de la técnica analítica.

La Figura 2.5 a y b, presenta los potenciales de oxidación obtenido para hierro fue igual a -280 ± 7 mV y para cobalto -1060 ± 5 mV; las intensidades de corriente obtenidas para hierro fueron mayores en las dos técnicas voltamétricas, indicando que el complejo Fe-Dimetilgloxima presenta mayor sensibilidad que el complejo Co-Dimetilgloxima, estas señales fueron obtenidas a partir de soluciones estándar de cada metal. Adicionalmente el análisis por VC en la figura 2.5b, permite obtener información acerca de la reversibilidad de la reacción redox de los dos metales, siendo reversible solo en el caso del hierro.

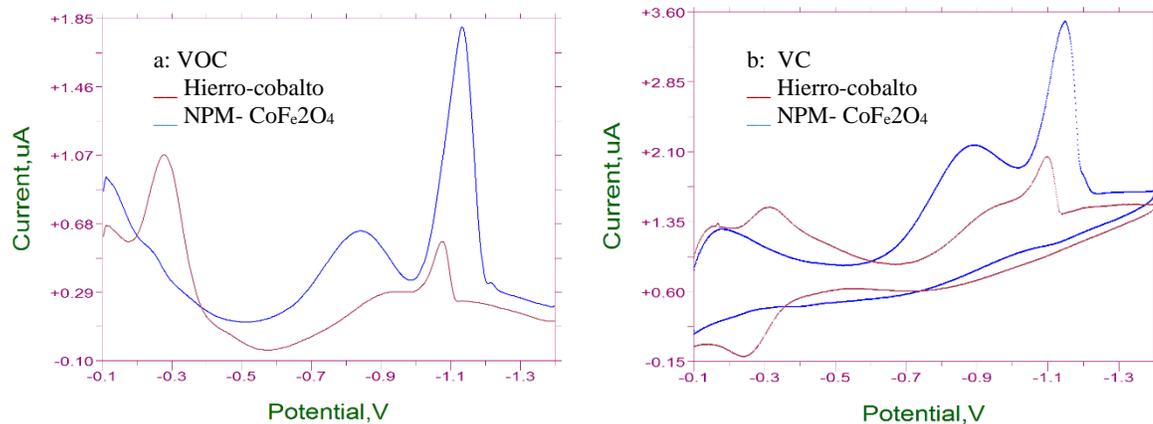


Figura 2.5. Voltagramas de Co^{2+} , Fe^{2+} y CoFe_2O_4 por VOC (a) y por VC (b).

El contenido de cobalto en la nanopartícula de CoFe_2O_4 la hace insoluble en la superficie del electrodo de trabajo de mercurio, impidiendo obtener resultados confiables, es necesario el uso de un agente complejante para mejorar la sensibilidad y resolución del análisis. La dimetilgloxima como agente complejante permite determinar hasta 0,003 mg/L de cobalto en presencia de otros metales (Borbrowsk, 1989).

El análisis voltamétrico indica la presencia de una señal característica de la nanopartícula de CoFe_2O_4 , relacionadas con la oxidación del cobalto, la señal se presenta a $-1090 \pm 6\text{mV}$ correspondiente al proceso anódico del cobalto (figura 2.5 a y b), el potencial del cobalto sufre un desplazamiento negativo de -30mV , debido a que está formando un complejo de coordinación, afectando levemente el comportamiento electroactivo del metal [35].

La ferrita de cobalto presenta una estructura tipo espinela inversa, es decir, es una red cúbica centrada en las caras (FCC) de aniones oxígeno, en la cual los iones Fe^{3+} ocupan todos los huecos tetraédricos y la mitad de los octaédricos, mientras que los iones Co^{2+} ocupan la otra mitad de los huecos octaédricos, según se esquematiza en la figura 2.6. Es por esta razón que tanto el análisis por VOC y VC (figura 2.5 a y b), la señal característica del hierro desaparece en el análisis de la NPM de CoFe_2O_4 . Los iones de Fe^{3+} en su mayoría al ocupar todos los huecos tetraédricos y al estar al interior de la estructura cristalina, cuando se aplica un potencial negativo, estos iones están protegidos y el potencial aplicado no es posible causar una actividad electrolítica en el ion. Para el caso del Co^{2+} al ocupar la mitad de los huecos octaédricos en la estructura de la NPM de CoFe_2O_4 , los cuales están en los extremos de la molécula, son susceptibles a actividad electrolítica al aplicar potenciales negativos. En el análisis por VOC se obtuvo una señal de Co^{2+} con una intensidad de potencial de $3,21\text{E}-07$ A, cuando el Co^{2+} está en la NPM de CoFe_2O_4 , la intensidad del potencial obtenido aumenta

4,6 veces obteniendo $1,49E-6$ A, este cambio se aprecia en la figura 2.4 a y b, es decir la señal y la sensibilidad aumenta 460%.

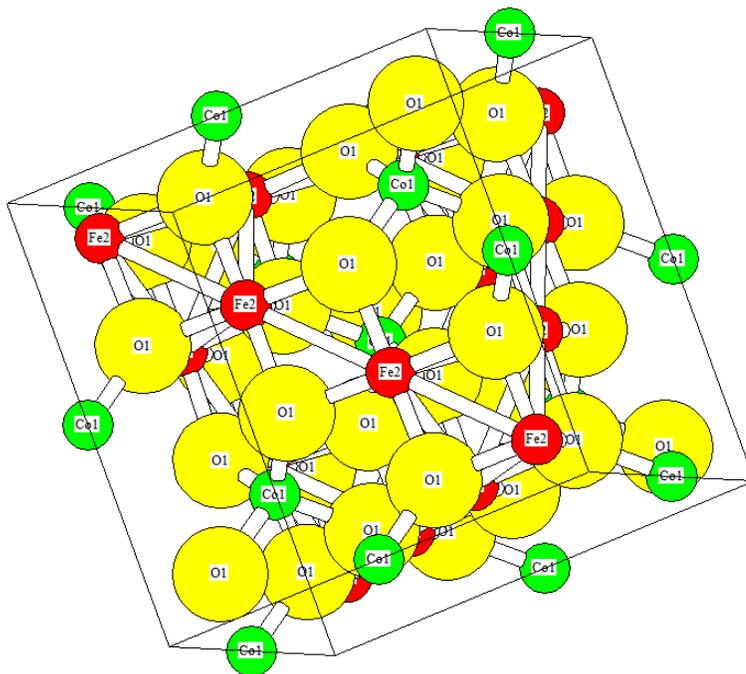


Figura 2.6. Estructura cristalina de CoFe_2O_4 (fuente, el autor)

La determinación de cobalto por voltametría sobre electrodos de mercurio estacionarios y polarografía con electrodos de gota de mercurio suspendida ha sido reportada por diferentes autores: Mrzljak, 1993, Urbanska, 1985, Komarek, Mrzljak, 1993, S. Lu et al., 16, Schmidt 1988, Bobrowski 1989, quienes lograron la determinación de cobalto en concentraciones bajas de 0,3-5,8 ppb; estos estudios fueron realizados a pH 5,5-7,5, los potenciales reportados oscilan entre -930 a -1120 mV. Estos reportes bibliográficos indican la determinación de cobalto en diversas matrices por técnicas voltamétricas y polarográficas, pero en nanoestructuras no hay reportes de su caracterización o determinación. Los potenciales de oxidación reportados fueron útiles como referente para la caracterización de las NPM de CoFe_2O_4 , los cuales están dentro del potencial de oxidación determinado para la CoFe_2O_4 en este estudio: -1090 ± 6 mV.

2.4. CONCLUSIONES

La síntesis de NPM- CoFe_2O_4 por el método poliol empleando etilenglicol como medio de reacción permitió obtener NPM de hierro y cobalto en tres proporciones diferentes: $\text{Co}_{20}\text{Fe}_{80}$, $\text{Co}_{40}\text{Fe}_{60}$ y $\text{Co}_{50}\text{Fe}_{50}$, de las cuales el mayor rendimiento y mayor atracción magnética lo presento las NPM de proporción $\text{Co}_{40}\text{Fe}_{60}$: rendimiento $13,2 \pm 0,32$ y atracción magnética

alta, las proporciones $\text{Co}_{50}\text{Fe}_{50}$ y $\text{Co}_{20}\text{Fe}_{80}$, presentaron rendimientos $10,5 \pm 0,28$ y $9,8 \pm 0,25$ respectivamente, con atracción magnética media.

Las NPM- CoFe_2O_4 en relación $\text{Co}_{40}\text{Fe}_{60}$ sintetizadas, presentaron una morfología ovalada con un diámetro promedio de $17,37 \pm 2,02$ nm, presentaron una saturación de magnetización de $33,7$ emu/g. Las NPM presentaron algunas impurezas de sulfatos, los cuales se remueven con lavados de solución de glutaraldehído.

Como aporte, se realizó la caracterización de las NPM- CoFe_2O_4 , por técnicas voltamperométricas aún no reportadas en la literatura, entre ellas voltimetría de onda cuadrada (VOC) y voltimetría cíclica (VC). Estas técnicas permiten establecer el comportamiento electroactivo de elementos y compuestos.

3. CAPITULO II

ENZIMA BROMELINA USADA COMO MODELO PARA LA INMOVILIZACIÓN SOBRE NANOPARTICULAS MAGNETICAS DE COBALTO-HIERRO (CoFe₂O₄)

3.1. Introducción

En este capítulo, se describe la inmovilización de la enzima bromelina sobre NPM-CoFe₂O₄ en relación Co₄₀Fe₆₀, las cuales según en el capítulo II, presentaron el mayor rendimiento y atracción magnética. La inmovilización se realizó inicialmente con la enzima bromelina usada como modelo, la cual es de fácil acceso y económica, con el fin de establecer las condiciones óptimas del proceso de inmovilización. Así, posteriormente, seguir este proceso en la inmovilización de la enzima β-glucohidrolasa para aplicarla en la hidrólisis de extractos de solasonina, lo cual se describe en los capítulos IV y V. La inmovilización de la bromelina se realizó usando quitosano como soporte y glutaraldehído como agente activador. La bromelina inmovilizada covalentemente sobre las NPM recubiertas de quitosano (NPM-Q) forma una base de Schiff unida al segundo grupo aldehído del glutaraldehído y los grupos amino terminal de la bromelina. La actividad de la enzima inmovilizada fue evaluado en la hidrólisis de caseína. Como producto de este capítulo, a continuación se presenta un artículo versión en español, el cual fue enviado a sometimiento y evaluación la revista South African Journal of Science.

3.2. CINETICA DE BROMELINA IMMBILIZADA SOBRE NANOPARTICULAS MAGNETICAS DE COBALTO-HIERRO (CoFe₂O₄)

3.2.1. Resumen

A nivel industrial, el uso de enzimas inmovilizadas simplifica el proceso y disminuye el costo económico de la producción. Se investigó el reusó de la enzima bromelina inmovilizada sobre nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto CoFe₂O₄, para la hidrólisis de la caseína. La inmovilización de la bromelina se efectuó covalentemente mediante puentes de glutaraldehído de nanopartículas recubiertas con quitosano y se confirmó por UV-Vis, IR y voltametría de onda cuadrada (VOC). Los valores de actividad enzimática clásicos K_M y V_{max} de la enzima libre e inmovilizada se calcularon a partir de la hidrólisis de la caseína usada como sustrato, esta reacción se monitoreó por el método de Biuret, y los datos de espectrometría UV-vis obtenidos se aplicaron en la ecuación de Michaelis-Menten y el diagrama de Hanes-Woolf. Los resultados obtenidos para la enzima inmovilizada y libre incluyen un K_M de 2,1mm/l y 1,8 mm/l, así como un V_{max} de 6,46 U/min y 6,08E-2 U/min,

respectivamente. Las condiciones óptimas de la actividad enzimática se establecieron a pH 6 y temperatura de 20°C, aunque hasta 30°C de temperatura, no se presentan variaciones significativas de la actividad. La estabilidad térmica de la enzima libre fue mayor 95-98% frente a la enzima inmovilizada 83-87%. La enzima inmovilizada a los 12 minutos alcanzó la velocidad máxima de reacción y conservó el 85 ± 2 % de la actividad catalítica inicial. Debido a la inmovilización, la enzima pierde un 16% de su actividad catalítica, pero esta pérdida se compensa con la reutilización de la bromelina inmovilizada, la cual en su segundo uso mantiene el 87% de la actividad catalítica, incluso hasta el quinto uso se mantiene un 50% de la actividad.

Palabras claves: nanopartículas, inmovilización de bromelina, cinética, hidrólisis enzimática, voltametría

3.2.2. Abstract

Industrial use of immobilized enzyme simplifies the process and improves the economics and **process** efficiencies. As a model of the recycling use of enzyme, bromelain was applied in casein hydrolysis facilitated by a nanobiocatalyst consisting of commercial bromelain, cobalt ferrite magnetic nanoparticles, chitosan and glutaraldehyde. Bromelain was immobilized on the chitosan cobalt-magnetite nanoparticle surface via covalent bonds to form the nanobiocatalyst. The formation and morphology of each composition were characterized by UV-Vis and IR spectroscopies, X-ray, square wave voltammetry, vibrating-sample magnetization (VSM) and transmission electron microscope. The hydrolysis of the casein used as a substrate was monitored by the Biuret method at pH 6.0, and the UV-vis spectrometry data obtained were applied in the Michaelis-Menten equation and the Hanes-Woolf diagram. Results showed a remarkable production yield of 95% by using the nanostructures at 20°C for two hours reaction time. The classical enzymatic activity values K_M and V_{max} of the free and immobilized enzyme were calculated, including a K_M of 2.1 mm/l and 1.8 mm/l, as well as a V_{max} of 6.46 U/min and 6.08E-2 U/min, respectively. The thermal stability of the free enzyme was 95-98% higher than the immobilized enzyme 83-87%. The enzyme immobilized at 12 minutes reached the maximum reaction rate and retained 85 ± 2 % of the initial catalytic activity. The immobilized enzyme lost 16% of its catalytic activity, such a **loss** in activity can be **compensated** by the reuse of the nanostructure, bromelain, which in its second use maintains 87% of the catalytic activity, even until the fifth. This method does not result in large loss of enzyme activity, while the immobilized bromelain proved to be effective and reusable for hydrolysis.

Keywords Nanoparticles, bromelain immobilization, kinetics, enzymatic hydrolysis, voltammetry

3.2.3. Introducción

La implantación de procesos enzimáticos en la industria contribuye al ahorro de materia prima y recursos energéticos debido a su acción específica y rápida; sin embargo, los costos económicos limitan su aplicación en economías emergentes [36]. Una estrategia para disminuir los costos de producción asociados con la aplicación industrial de enzimas, consiste en su reutilización. Para ello se desarrollan técnicas de inmovilización enzimática sobre soportes sólidos como la adsorción y enlace covalente sobre el material, atrapamiento/encapsulación en un material transportador y entrecruzamiento[37]. La eficiencia de la inmovilización, la producción y la carga enzimática se consideran los parámetros de evaluación de la efectividad en el proceso de inmovilización[38]. Las características del material soporte determinan el desempeño de la enzima inmovilizada, incluyendo la resistencia física, hidrofiliidad, inercia, facilidad de acoplamiento de la enzima, biocompatibilidad, resistencia al ataque microbiano y de disponibilidad a costo bajo[39]. Para la inmovilización se utiliza material polimérico tanto natural como sintético, así como soportes inorgánicos debido a que estos poseen áreas superficiales específicas grandes[40]. Las nanopartículas magnéticas (NPM), además del área superficial específica grande, la resistencia a la transferencia de masa, y carga enzimática efectiva; también ofrecen la posibilidad de ser separadas mediante un campo magnético, incluso cuando actúa como un soporte de la enzima inmovilizada [41]. Especialmente, el desarrollo de soportes de óxidos de hierro muestran que la actividad de enzimas inmovilizadas son comparativamente mejores que para las enzimas libres [17]. El acoplamiento de la enzima sobre la NPM se desarrolla mediante diferentes métodos, incluyendo: atrapamiento (en gel, fibra y micro-encapsulación), inmovilización sobre soporte sólido (adsorción física, enlace iónico, quelación o unión metálica, enlace covalente) y entrecruzamiento [42].

Para establecer un proceso económicamente favorable para la inmovilización de enzimas, se desarrollaron NPM binarias que contienen hierro y cobalto, las cuales presentan una saturación de magnetización mayor a las NPM de hierro, así como mayor resistencia a la corrosión [43] [44].

La modificación de NPM con enzimas se realiza mediante un enlace covalente, que debido a la fuerza y estabilidad del enlace enzima-soporte ofrecido, es una de las técnicas más investigadas para inmovilización. Dentro de la técnica de enlace covalente se incluye la formación de una base de Schiff, entre otros método [42].

La modificación de las NPM para que actúen como soporte, se realiza por interacción electrostática [45] [46], como ocurre con el recubrimiento de quitosano, el cual presenta grupos amino libres y puede ser activado con glutaraldehído formando una base de Schiff.

El quitosano es un soporte común, económico e ideal para la inmovilización de enzimas. Entre sus ventajas características se encuentra su notable afinidad por las proteínas, capacidad para la formación de geles, resistencia a la degradación química y propiedades anti-bacteriales [16].

El presente trabajo describe la inmovilización de la enzima bromelina, sobre nanopartículas magnética de ferrita de cobalto, usando quitosano como soporte y glutaraldehído como agente activador, de acuerdo con la reacción de la figura 1. La bromelina inmovilizada covalentemente sobre las NPM recubiertas de quitosano (NPM-Q) forma una base de Schiff unida al segundo grupo aldehído del glutaraldehído y los grupos amino terminal de la bromelina. La actividad de la enzima inmovilizada fue evaluada en la hidrólisis de caseína.

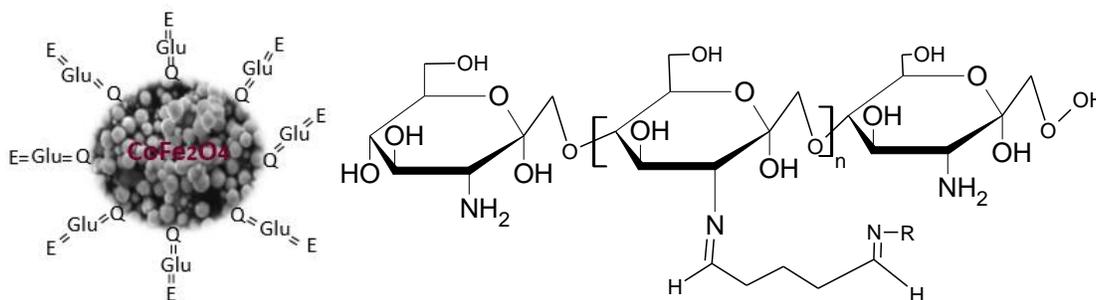


Figura 3.1. Reacción de inmovilización de la bromelina sobre NPM, usando quitosano como soporte y glutaraldehído como activador. Q-quitosano, glu-glutaraldehído, R- bromelina.

3.3.4. MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos Químicos

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico. Enzima bromelina 35000 Da extraída de *Ananas comosus*, Caseína 25000 Da, sulfato de hierro pentahidratado 99,5%, sulfato de cobalto pentahidratado 99,5%, hidróxido de sodio 98%, ácido acético 99,5%, y glutaraldehído 25% se compraron a Panreac; quitosano 99%, fosfato disódico dibásico 99%, reactivo de biuret, etilenglicol 99% se adquirieron a Merck; fosfato de potasio monobásico 99% se obtuvo de J.T. Baker. Todas las soluciones se prepararon con agua tipo I obtenida de un Q-millipore de conductividad 0,05 μ s.

Síntesis y caracterización de nanopartículas magnética (NPM) de $CoFe_2O_4$

Se siguió el procedimiento del polirol descrito por Chiriac, Moga, & C, (2008) [24]. Una mezcla estequiométrica de sulfatos de Co y Fe a concentración total de 0,7 M de sulfatos, se disuelven en 50 mL de etilenglicol (99%) a pH 11 y se somete a reflujo con calentamiento

controlado en el rango de 185-195°C, para obtener NPM $\text{Co}_{50}\text{Fe}_{50}$. Transcurridas cuatro horas de reacción, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente, y se filtra, el precipitado se secaa a 120 °C durante 2h y luego se calcino a 650°C durante 4h. También se sintetizaron NPM $\text{Co}_{20}\text{Fe}_{80}$ y $\text{Co}_{40}\text{Fe}_{60}$, en relación 1:4, 1:3, siguiendo el método descrito, pero cambiando el rango de secado de 190-195°C.

Se estableció el porcentaje de rendimiento de la síntesis de las NPM y se evaluó la atracción magnética, que consistió en acercar un metal previamente pesado a las NPM y después tomar nuevamente el peso, la mayor cantidad de NPM que se adhieran al metal, se les atribuyo la mayor atracción magnética.

La morfología y el tamaño de distribución de las NPM seleccionadas se determinó por microscopía electrónica de transmisión (TEM-STEM) en un microscopio Tecnai G2 F20 de FEI. La composición de las NPM se evaluó por difracción de rayos X (DRX) en un difractómetro de rayos-X PW1700 de Philips, equipado con un generador PW1825 y con monocromador de grafito con un ángulo de 26°, utilizando radiación de Cu. La caracterización de la bromelina libre e inmovilizada se evaluó por espectroscopias FT-IR usando la técnica ATR y UV-vis, en un espectrofotómetro Shimadzu IR-Prestige-21 y en un espectrofotómetro Génesys 10 V. El comportamiento electroquímico se determinó mediante voltametría cíclica (VC) y voltametría de onda cuadrada (VOC) en un polarógrafo CV-50W, equipado con un analizador voltamperométrico, y estación electroquímica CGME analizador, en una celda de tres electrodos, conformada de un electrodo de trabajo de mercurio, un electrodo de referencia Ag/AgCl BASI MF-2052 y un electrodo auxiliar de platino BASI MW-1032, las lecturas se realizaron en atmósfera inerte de nitrógeno y como patrón se utilizó una mezcla de estándares de hierro-cobalto. El comportamiento magnético de las NPM- CoFe_2O_4 y de la bromelina inmovilizada se midió en un Magnetómetro VERSALAB, de la Quantum Design, basado en la técnica de muestra vibrante (VSM).

Recubrimiento y activación de NPM- CoFe_2O_4 con quitosano y glutaraldehído (NPM-Q-G)

Las NPM- CoFe_2O_4 obtenidas se lavaron tres veces con agua desionizada y se modificaron según el procedimiento de Xie, Wenlei, Wang, (2012) [47]. Se tomó 200 mg de NPM y se suspendieron en una solución al 0,5% de quitosano disuelto en ácido acético 0,35M, ajustando a pH 10, se agitó a 150 rpm durante 1h, después la mezcla se calentó a 80°C durante 30 min, se filtró y lavó tres veces con agua desionizada, en seguida las NPM-Q se disolvieron en 50 mL de glutaraldehído al 2%, en presencia de buffer fosfato a pH 6, la solución se calentó a 37°C durante una hora; este ensayo se denominó tipo A. Las NPM-Q-G activadas se recuperaron con un campo magnético externo y se lavaron con agua desionizada y buffer

fosfato pH 6 hasta eliminar los residuos de glutaraldehído. Siguiendo el mismo método también se modificaron NPM con 2% de quitosano: ensayo denominado tipo B.

Inmovilización y caracterización de bromelina sobre NPM-Q-G de CoFe_2O_4

La bromelina al 40% se extrajo de la piña por un procedimiento convencional [48]. Para la mezcla se utilizan concentraciones de bromelina de $2\text{E-}4$ y $4\text{E-}8$ M con solución 0.1 M de buffer fosfato a pH 6 que contiene 200 mg de las NPM-Q-G al 0.5% de Quitosano, se agitó a 150 rpm durante 1h a 20°C y se denominaron NPM-Q-G-Bromelina tipo A y tipo B. La reacción de formación de la Base de Schiff se monitoreó por VOC y espectroscopía UV-vis, cada 10 minutos. Para obtener los espectros UV-vis, cada 10 minutos el sobrenadante se separó de las NPM modificadas a través de un campo magnético y el sobrenadante se usó para determinar la disminución de enzima libre mediante análisis de proteína libre por el método de Biuret a 545 nm determinado cada 10 minutos hasta 30 minutos de reacción. La enzima inmovilizada se separó y se lavó con buffer fosfato pH 6. La inmovilización también se evaluó utilizando el mismo método, NPM-Q-G con un contenido de 2% de Quitosano interactuaron con concentraciones de bromelina de $2\text{E-}4$ y $4\text{E-}8$ M y las NPM-Q-G-Bromelina se denominaron tipo C y tipo D.

La inmovilización de la enzima sobre NPM-Q-G se determinó por UV-Vis, FT-IR y VOC, la estructura cristalina se determinó por difracción de rayos X (DRX), la morfología y el tamaño de distribución de la NPM-Q-G se estableció por microscopia electrónica de transmisión (TEM), el comportamiento electroquímico se analizó por voltametría de onda cuadrada (VOC) y el comportamiento magnético se determinó por técnica de magnetización de muestra vibrante (VSM).

Determinación de la actividad enzimática de la bromelina

La actividad enzimática de la bromelina libre e inmovilizada sobre NPM-Q-G se evaluó mediante la hidrólisis de caseína monitoreada por el método espectrofotométrico de Biuret. Para lo cual se construyó una curva de calibración de concentración de proteína a 545 nm con el estándar de albumina sérica bovina [49]. Para la medida de la actividad enzimática se mezcló 1,5 mL de enzima libre $2,0\text{E-}4$ M, 1,5 mL de caseína como sustrato $4,0\text{E-}4$ M en presencia de 1 mL de buffer fosfato 0,1 M pH 6. Se realizaron 7 ensayos variando el tiempo de reacción: 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos, deteniendo la reacción con 1 mL de ácido acético 1 M. De estas soluciones se tomó 1,5 mL y mezcló con 1 mL del reactivo de Biuret, se agitó por 20 min y se midió la absorbancia a 545 nm, la concentración de caseína se calculó con la ecuación de la curva de calibración de albumina. Para la actividad de la bromelina inmovilizada sobre NPM, se tomó 200 mg de NPM-Q-G ($\text{Co}_{40}\text{Fe}_{60}$), que contenía bromelina

en concentración $2,0E-4$ M y se procedió como se describió para la actividad de la bromelina libre.

Determinación de los parámetros cinéticos de la bromelina inmovilizada sobre NPM-Q-G

Los parámetros cinéticos de la enzima inmovilizada se determinaron variando la concentración de la caseína usada como sustrato: $4,0E-4$ M a $8,0E-5$ M, y la temperatura de $15-35^{\circ}\text{C}$ en presencia de buffer fosfato $0,1$ M pH 6. Con los datos obtenidos se calcularon los valores de K_M y V_{\max} de la enzima libre e inmovilizada usando la regresión no lineal de la ecuación de Michaelis-Menten y el diagrama de Hanes-Woolf [13]. Como control se usó igual cantidad de enzima libre evaluada bajo similares condiciones.

Evaluación de reciclaje de la bromelina inmovilizada en NPM-Q-G

La reutilización de la bromelina inmovilizada fue evaluada a 20°C , mediante hidrólisis de caseína bajo condiciones estándar. Después de cada uso, la enzima fue lavada con agua desionizada y buffer fosfato a pH 6. En cada ensayo se adicionaba 2 mL de buffer fresco y 3 mL de caseína $4,0E-5$ M, procediendo como se describió en la determinación de la actividad enzimática. La actividad de la enzima inmovilizada después del primer uso, se definió como el control y se le atribuyó una actividad relativa del 100%.

3.3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis y caracterización preliminar de NPM-CoFe₂O₄

Se sintetizaron NPM-CoFe₂O₄ en proporciones Co₂₀Fe₈₀, Co₄₀Fe₆₀ y Co₅₀Fe₅₀. Evaluando el porcentaje de rendimiento en la síntesis y la atracción magnética, las NPM en relación Co₄₀Fe₆₀, presento los mejores criterios evaluados. En la tabla 3.1, se observa que el rendimiento en la síntesis de estas NPM fue del $13 \pm 0,9$ % y la atracción magnética fue alta. Con base a estos criterios se procedió a realizar el proceso de inmovilización de la bromelina y su caracterización.

Tabla 3.1. Caracterización preliminar de NPM-CoFe₂O₄ sintetizadas

CRITERIO	NPM-CoFe ₂ O ₄		
	Co ₂₀ Fe ₈₀	Co ₄₀ Fe ₆₀	Co ₅₀ Fe ₅₀
Rendimiento %	$9,8 \pm 0,6$	$13 \pm 0,9$	$10,5 \pm 0,7$
Atracción magnética	Media	Alta	Media

Caracterización de nanopartículas magnéticas NPM-CoFe₂O₄ (Co₄₀Fe₆₀)

Se evaluó las propiedades magnéticas de las NPM-CoFe₂O₄ en relación Co₄₀Fe₆₀ y de la bromelina inmovilizada sobre NPM-Q-G, usando la técnica VSM. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente. La figura 3.2 presenta la saturación de magnetización de la NPM, que ocurre a 33,7 emu/g, la saturación de magnetización para la bromelina inmovilizada fue determinada en 26,3 emu/g. El momento de magnetización de CoFe₂O₄ decrece significativamente en un 21,96 % cuando se inmoviliza la bromelina a través de enlaces covalentes al glutaraldehído. Las curvas de histéresis obtenidas revelan que las NPM y la bromelina inmovilizada tienen comportamiento ferromagnético[29],[28]. Tanto las NPM- CoFe₂O₄ como la bromelina inmovilizada mantienen altos valores de saturación de magnetización, lo cual facilita su recuperación de soluciones por medio de un campo magnético externo.

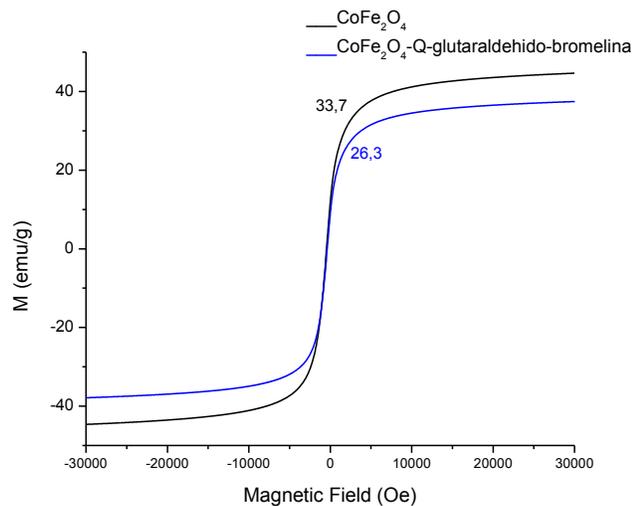


Figura 3.2. Curvas de magnetización a temperatura ambiente de NMM-CoFe₂O₄ y la bromelina inmovilizada.

La micrografía de transmisión típica de las NPM-CoFe₂O₄ (Co₄₀Fe₆₀), se presentan en la figura 3.3. Como indica la figura, las NPM sintetizadas presentan algunas aglomeraciones, se distingue una morfología ovalada con un diámetro promedio de $17,37 \pm 2,02$ nm (izquierda). Las aglomeraciones desaparecen cuando se realiza el proceso de inmovilización de la bromelina, el sistema de inmovilización distribuye uniformemente las NPM-CoFe₂O₄, la morfología no se ve afectada y el tamaño aumenta a $25,68 \pm 4,02$ nm, este aumento puede ser debido a la capa quitosano que recubre la NPM, a la activación con glutaraldehído y a la enzima bromelina unida covalentemente al glutaraldehído. Este recubrimiento se puede observar en la Figura 3.3 (100 nm derecha), se puede evidenciar la presencia de una película que recubre la NPM, esta película no se presenta en la NPM sin tratamiento de funcionalización (figura 3, 200 nm, izquierda).

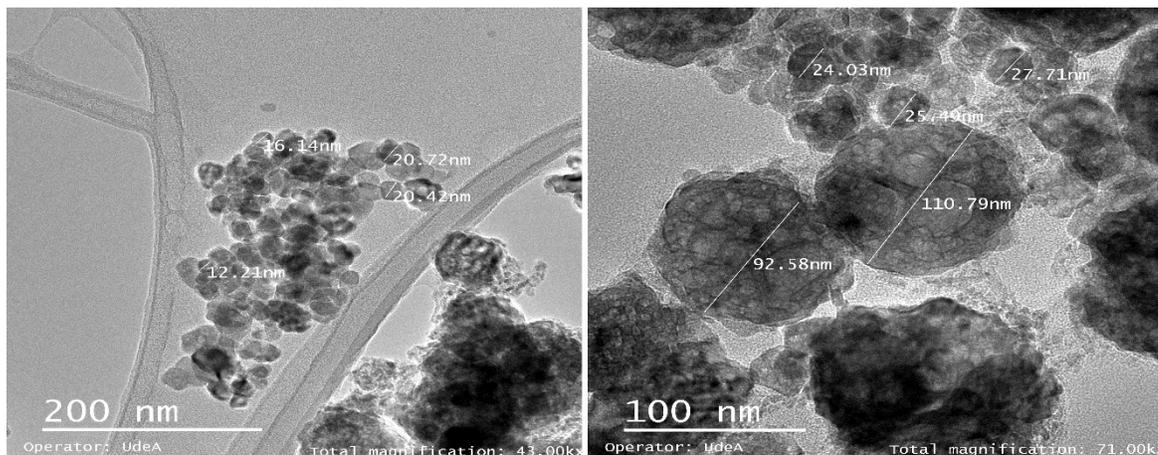


Figura 3.3. Micrografías electrónicas de Transmisión (TEM): CoFe_2O_4 (izquierda) y CoFe_2O_4 -Q-G-bromelina (derecha).

El proceso de inmovilización de la bromelina sobre las NPM-Q-G, se confirmó por espectroscopía FT-IR, figura 3.4. Los espectros de quitosano, bromelina, NPM y glutaraldehído, representan estos reactivos en estado puro, sin modificar. El espectro NPM-Q-E, representa la bromelina inmovilizada sobre las NPM-Q-G y se observa que esta se unió covalentemente al glutaraldehído formando una base de Schiff, la señal de la NPM- CoFe_2O_4 que presenta a 588cm^{-1} permanece (Co^{2+} y Fe^{2+}), y aparecen nuevas señales a 3390cm^{-1} asignada a tensiones de grupos NH y OH, hacia 1694cm^{-1} atribuida a una flexión del grupo OH, en 1540cm^{-1} reconocida como flexión del grupo NH, a 1240cm^{-1} que señala la flexión del grupo CH y en 1058cm^{-1} asignada a una flexión del grupo NC que sirve de indicador de formación de bases de Schiff, la primera corresponde a la interacción entre los grupos amino secundarios de la bromelina y un grupo aldehído del glutaraldehído y la segunda base de Schiff se genera de la unión covalente de los grupos amino secundario del quitosano con el otro grupo aldehído del glutaraldehído.

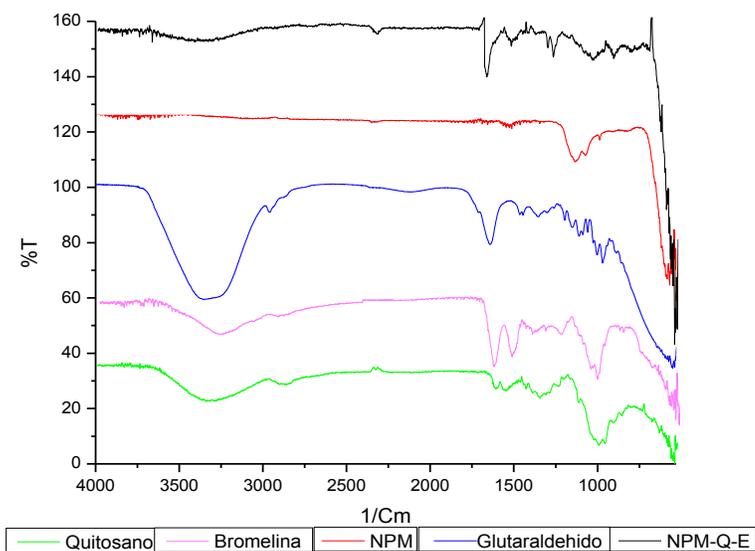


Figura 3.4. Espectro FT-IR. Sistema inmobilizado: CoFe_2O_4 -glutaraldehyde-Bromelina

La figura 3.5, corresponde al difractograma de RX de $\text{NPM-CoFe}_2\text{O}_4$ ($\text{Co}_{40}\text{Fe}_{60}$), se observan seis picos en 2θ , localizados en: 21.2, 35.6, 42.3, 51.5, 67.8, 75.2, relacionados con los planos cristalográficos según índices de Miller (111), (220), (311), (422), (400), (511) y (440) respectivamente, correspondientes a una estructura tipo espinela de CoFe_2O_4 con grupo espacial $fd-3m$ (JCPDS database file, No. 79e0418). Para NPM-Q-G con la bromelina inmobilizada se observaron los mismos seis picos característicos. Se sugiere que el recubrimiento de quitosano y activación con glutaraldehído en el proceso de inmobilización de la bromelina no afectó las fases de las $\text{NPM-CoFe}_2\text{O}_4$. Las NPM conservan sus propiedades magnéticas durante el proceso de separación, que es adecuado para su bioseparación.

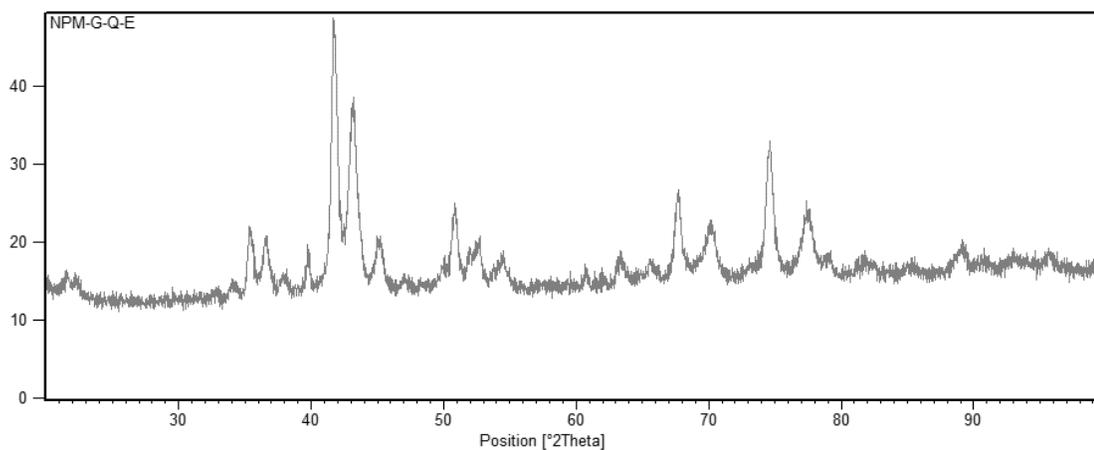


Figura 3.5. Difractogramas de rayos X de $\text{NPM-CoFe}_2\text{O}_4$.

La figura 3.6a y 6b, indican los potenciales de oxidación obtenidos para la mezcla de estándares de hierro a -280 ± 7 mV y para cobalto a -1060 ± 5 mV, análisis realizado por VOC y VC. El comportamiento electroquímico de las NPM- CoFe_2O_4 indica la presencia de una señal característica relacionadas con proceso anódico del cobalto a -1090 ± 6 mV, la ausencia de una banda de oxidacion en el voltamograma VC indica que este proceso es irreversible [35]; el hierro no presento señal por VOC y VC, comportamiento atribuido a que las NPM- CoFe_2O_4 presenta una estructura tipo espinela inversa, es decir, es una red cúbica centrada en las caras (FCC) de aniones oxígeno, en la cual los iones Fe^{3+} ocupan todos los huecos tetraédricos y la mitad de los octaédricos, mientras que los iones Co^{2+} ocupan la otra mitad de los huecos octaédricos [50]. Los iones de Fe^{3+} en su mayoría al ocupar todos los huecos tetraédricos y al estar al interior de la estructura cristalina, cuando se aplica un potencial negativo, estos iones están protegidos y el potencial aplicado no es posible causar una actividad electrolítica en el ion hierro interior. Para el Co^{2+} , que ocupa la mitad de los huecos octaédricos en la estructura de la NPM- CoFe_2O_4 , los cuales están en los extremos de la molécula, son susceptibles a actividad electrolítica al aplicar potenciales negativos.

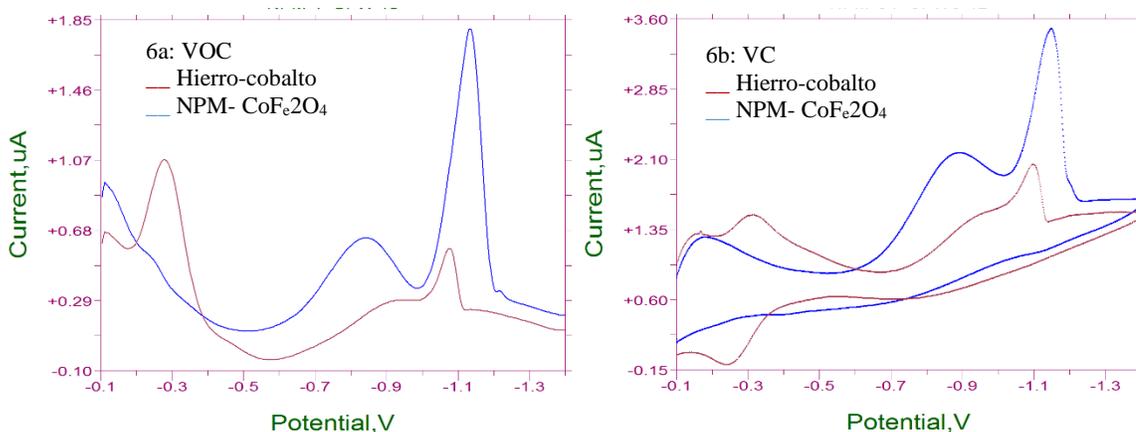


Figura 3.6. Polarogramas de estándares de hierro-cobalto y NPM- CoFe_2O_4

Inmovilización y caracterización de bromelina sobre NPM- CoFe_2O_4 ($\text{Co}_{40}\text{Fe}_{60}$)

La inmovilización de la bromelina sobre NPM- CoFe_2O_4 , se evaluó por VOC, VC y espectroscopia UV-Vis. En la figura 3.7a y 3.7b, se observa la señal anódica a -1206 ± 6 mV de la bromelina inmovilizada, la cual disminuye hasta quedar por debajo del límite de cuantificación (60 ppb), esta señal corresponde al Co^{2+} y presenta un leve desplazamiento en su potencial anódico ocasionado por la interacción con el sistema de inmovilización.

Las NPM- CoFe_2O_4 , cuando se recubren con quitosano, son activadas con glutaraldehído y se une covalentemente la bromelina, ocasiona que la actividad electroquímica de la NPM- CoFe_2O_4 , disminuya hasta perder su actividad electroactiva al aplicar un potencial externo

negativo. Esta pérdida de electriactividad se atribuye al recubrimiento de la NPM, por tres capas, con quitosano mediante interacción física; activado con glutaraldehído mediante formación de un enlace covalente que origina una base de Schiff entre glutaraldehído-quitosano; y con la bromelina formando una base de schiff entre la bromelina-glutaraldehído, Figura 3.1.

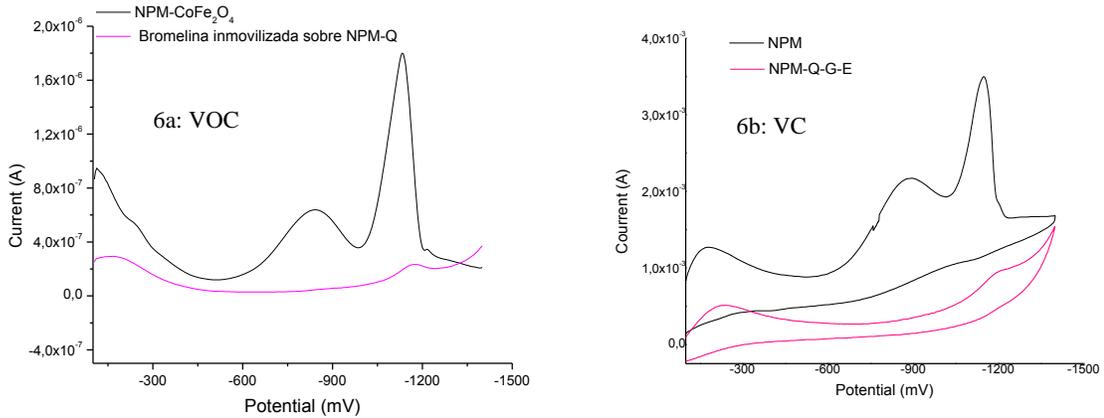


Figura 3.7. Polarogramas de VOC y VC de la actividad electroactiva de las NPM-CoFe₂O₄ y la bromelina inmovilizada sobre NPM-CoFe₂O₄

Para las NPM tipo A se presentan los resultados de la inmovilización monitoreada a diferentes tiempos de reacción. El polarograma de VOC en la figura 3.8a, representa la cinética de inmovilización de la bromelina, se observa que a medida que pasa el tiempo la cantidad de enzima inmovilizada aumenta. A los 5 minutos de iniciar la inmovilización la eficiencia fue del 63.4%, en 20 minutos alcanzo un porcentaje de 78,8% y a los 30 minutos alcanzo un máximo de 81,3% de inmovilización. En paralelo se evaluó el proceso por espectroscopia UV-Vis, la figura 3.8b, se observa que después de 30 minutos de inmovilización la absorbancia se hace constante indicando que la enzima alcanzo su máximo porcentaje de inmovilización.

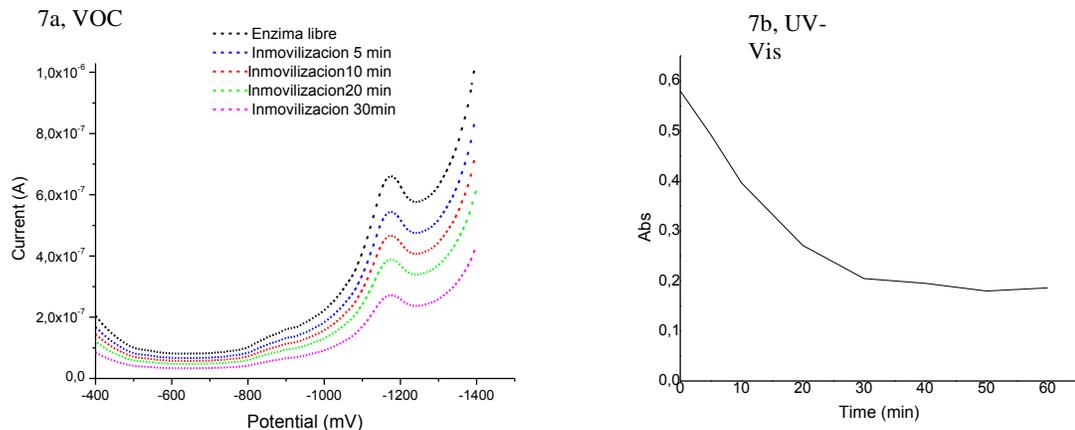


Figura 3.8. Seguimiento proceso de inmovilización de la bromelina sobre NPM-CoFe₂O₄

Los resultados de Biuret en el sobrenadante para estimar la bromelina libre se presentan en la tabla 3.2. Como se observa, se generaron cambios en la reducción de Biuret, siendo más significativo para el tipo A y C, el cambio de 100% a 23 y a 35%, respectivamente; significando una reducción de bromelina en el sobrenadante del 77 y 65% respectivamente, la cual se inmovilizó sobre la NPM-Q-G; mientras que para el tipo B y D, el porcentaje de bromelina en el sobrenadante fue mayor, significando menor porcentaje de inmovilización.

Tabla 3.2. Evaluación de condiciones de recubrimiento de NPM-Q-G con bromelina

Modificación NPM-Q	Concentración		% Reducción Biuret (proteína libre en sobrenadante)
	Quitosano/glutaraldehido constante %	Bromelina M	
Tipo A	0,5:2	2,E-04	23%
Tipo B	2:2	2,E-04	60%
Tipo C	0,5:2	4,E-08	35%
Tipo D	2:2	4,E-08	40%

La inmovilización de la bromelina sobre NPM-Q-G, depende de la concentración de enzima en la solución, y el tiempo de inmovilización. Las condiciones optimizadas del proceso fueron: 200 mg de NPM de CoFe_2O_4 , 0,5% de quitosano, 2% de glutaraldehido, $2\text{E}-4\text{M}$ de bromelina y tiempo de inmovilización 30 minutos. En estas condiciones se genera una pérdida total de electroactividad de la NPM-Q-G-bromelina, este factor es de importancia al aplicar este sistema en la hidrólisis de caseína, debido a que se previene la contaminación con NPM al producto de hidrólisis, la NPM- CoFe_2O_4 es estable en las condiciones de reacción determinadas, aunque el sistema de inmovilización de la bromelina, ocasiona una leve pérdida del poder magnético de la NPM, Figura 3.2, aún es posible su recuperación a través de un campo magnético externo.

La inmovilización de bromelina ha sido llevada a cabo en diferentes sistemas y soportes, aplicando diversas técnicas con éxito, con porcentajes de inmovilización de 20-90% [51] [52]. Los resultados de inmovilización obtenidos en este estudio son satisfactorios, obteniendo un porcentaje máximo de inmovilización de bromelina de $82,6 \pm 3 \%$, son superiores a los obtenidos por Benucci et al., (2012) [53] y Zappino et al., (2015) [1], quienes obtuvieron un máximo de inmovilización de 40% con bromelina comercial inmovilizada en microestructuras.

Determinación de actividad enzimática y parámetros cinéticos

La determinación de la actividad proteolítica de la bromelina libre e inmovilizada se obtuvo al evaluar su velocidad de reacción de 0 a 30 minutos. A medida que el tiempo de reacción avanza la absorbancia disminuye tendiendo a ser constante, obteniéndose que a 12 minutos la enzima alcanza su máxima velocidad de actividad proteolítica sobre la caseína. Los valores de absorbancia disminuyen debido a la ruptura de los enlaces peptídicos que ejerce la enzima sobre la caseína, generando una disminución en su concentración y al realizar el análisis por el método de Biuret, el cobre se acompleja con menos cantidad de grupos amino procedentes del substrato caseína.

Del diagrama de Michaelis-Menten (figura 3.9) se determinaron matemáticamente los valores de K_M y V_{max} de la enzima libre e inmovilizada usando la regresión no lineal de la ecuación de Michaelis-Menten y el diagrama de Hanes Woolf; obteniendo un K_M de 2,1mm/l para la enzima inmovilizada y 1,8 mm/l para la enzima libre, la V_{max} para la enzima libre fue $6,08E-2$ U/min y para la enzima inmovilizada 6,46 U/min. La bromelina inmovilizada mantiene un máximo de 87% de actividad catalítica en comparación con la bromelina libre que presenta un máximo de 95% de actividad. Para alcanzar la misma actividad catalítica de la enzima libre, se requiere un 16,6% más de enzima inmovilizada.

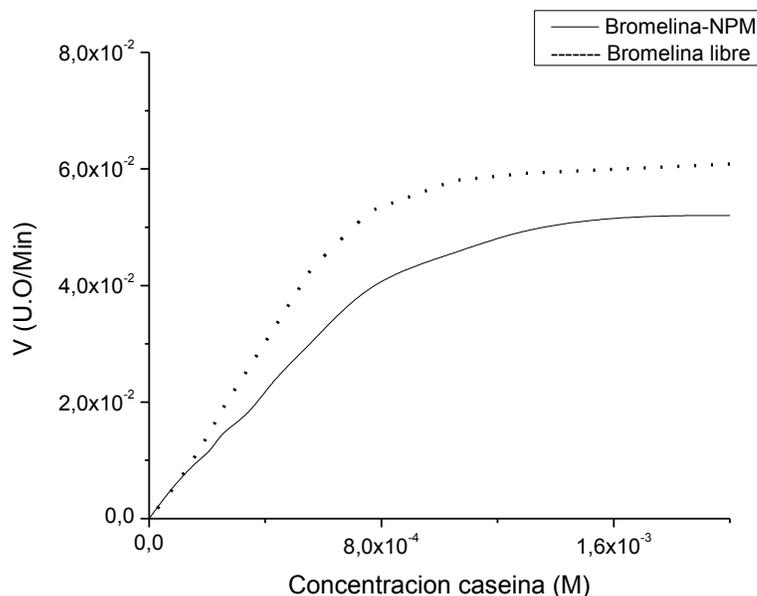


Figura 3.9. Diagrama de Michaelis-Menten: Cinética de bromelina libre e inmovilizada

Reutilización de la bromelina inmovilizada

Para esta evaluación de acuerdo a la K_M obtenida, la bromelina inmovilizada tipos A, se monitoreo con el método de Biuret. La actividad de la enzima inmovilizada después del primer uso, durante 30 minutos, se definió como el control y se le atribuyó una actividad relativa del 100%. La figura 3.10 presenta la actividad enzimática de la bromelina inmovilizada 2,5 con respecto a la actividad inicial del 100%, en su segundo uso mantiene el 87% de la actividad enzimática, hasta el quinto uso mantiene un 50% de su actividad, después decrece significativamente de 49,3% a 2,4%. La absorbancia medida de la caseína después del ciclo quinto aumenta, indicando que la enzima pierde gradualmente su actividad, hasta el ciclo 9 donde la actividad es del 2,4%.

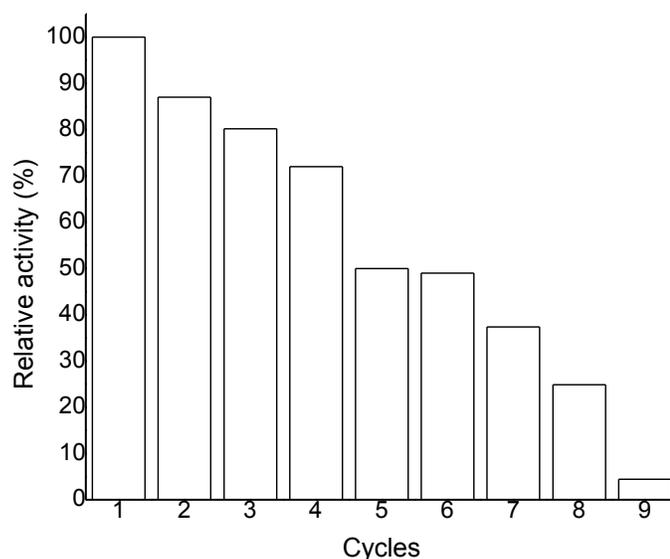


Figura 3.10. *Actividad enzimática de bromelina inmovilizada sobre NPM-Q-G*

Otras proteasas han sido usadas para la hidrólisis de caseína, obteniendo diferentes porcentajes en la eficiencia de la reacción. Zhang et al., 2010 [54], usaron papaína libre (0.06–0.50 g/L) y caseína en una concentración de 23.3g/L logrando hidrolizar el 99.5% de caseína. Yazid et al., 2017 [55], evaluaron la inmovilización sobre nanopartículas magnéticas dos proteasas extraídas de residuos de cabello y de fibra de soya, las dos enzimas inmovilizadas retenían el 66% y 64% de la actividad catalítica, después de 7 ciclos. Obtuvieron con la enzima extraída de cabello un 80% de hidrólisis de caseína y un 40% con la enzima extraída de soya luego de 24 h de reacción a 50°C. Valenberg et al., 2010 [56], con quimosina indujo la hidrólisis de caseína, obteniendo mínimo un 50% y máximo 80% de hidrólisis. La bromelina inmovilizada sobre NPM de CoFe_2O_4 , se determinó que se

requiere 2,1mm/l de enzima para hidrolizar 1 μ m de caseína, con una eficiencia del 97%, para la bromelina libre se requiere 1,8mm/L de enzima para tener la misma eficiencia de la bromelina inmovilizada.

Efecto de la temperatura

La temperatura óptima para la inmovilización de la bromelina fue determinada en 20°C, aunque hasta 30°C la actividad enzimática no presenta variación significativa. En el rango de temperatura 15-25°C la actividad de la enzima inmovilizada es de 83-87%% con respecto a la enzima libre que genera una actividad de 91-95%. La bromelina inmovilizada sobre NPM-Q-G mantiene una máxima actividad catalítica de 87% a 20°C sobre la caseína usado como sustrato. Chen y Huang, 2004 [57], evaluaron la separación de bromelina de ácido poliácrico unido con nanopartículas de óxido de hierro, determinado que la adsorción y desorción de la bromelina en el sistema, retenía el 87,4% de la actividad catalítica, siendo otra alternativa de recuperación y reutilización de enzimas, aunque el tiempo de adsorción de la bromelina reportado es de 1 minuto, no obstante la unión de la bromelina con el sistema, es a través de interacción electrostática lo cual puede generar pérdidas de la enzima en las condiciones de reacción, aunque reportan que la bromelina presenta buena estabilidad termina de 15-35°C coincidiendo al determinado en este trabajo, la estabilidad frente al pH fue de 2-5 con optimo en pH 5, en nuestro sistema se trabajó a pH 6.

3.3.6. CONCLUSIONES

La síntesis de NPM por el método poliol empleando etilenglicol como medio de reacción permitió obtener NPM de hierro y cobalto en tres proporciones diferentes: $\text{Co}_{20}\text{Fe}_{80}$, $\text{Co}_{40}\text{Fe}_{60}$ y $\text{Co}_{50}\text{Fe}_{50}$, de las cuales el mayor rendimiento y mayor atracción magnética lo presento las NPM de proporción $\text{Co}_{40}\text{Fe}_{60}$: rendimiento 13% y atracción magnética alta, las proporciones $\text{Co}_{50}\text{Fe}_{50}$ y $\text{Co}_{20}\text{Fe}_{80}$, presentaron rendimientos 10,5%, y 9,8% respectivamente, con atracción magnética media.

La enzima bromelina fue inmovilizada en un sistema bionanoestructurado reciclable usando como soporte NPM- CoFe_2O_4 recubiertas de quitosano y funcionalizado con glutaraldehido. El sistema fue evaluado en caseína usada como sustrato. La bromelina inmovilizada mantuvo una actividad catalítica de $87 \pm 2\%$. La K_M y V_{MAX} fueron mayores en la enzima libre, y fue requerido un 16,6% más de enzima inmovilizada para alcanzar la misma actividad catalítica de la enzima libre. Sin embargo esta diferencia es superada por la bromelina inmovilizada al lograr ser reutilizada durante cinco ciclos; la cual después del segundo ciclo mantiene una actividad del 87%, y en el quinto ciclo aún mantiene el 50% de su actividad, decreciendo a 2,4% en su noveno ciclo.

3. CAPITULO III

APLICACIÓN DEL SISTEMA DE INMOVILIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA β -GLUCOSIDASA SOBRE NPM DE CoFe_2O_4

4.1. Introducción

De acuerdo al capítulo anterior, con base a las condiciones optimizadas para el proceso de inmovilización de la bromelina, en el presente capítulo se describe la inmovilización de la enzima β -glucosidasa, sobre nanopartículas magnética de ferrita de cobalto, usando glutaraldehído como agente activador, de acuerdo con la reacción de la figura 1. No se usó quitosano porque este agente no permitió inmovilizar esta enzima. La β -glucosidasa inmovilizada covalentemente sobre las nanopartículas magnéticas de CoFe_2O_4 (NPM-G), forma una base de Schiff unida a grupos aldehídos del glutaraldehído y los grupos amino terminal de la β -glucosidasa. La actividad de la enzima inmovilizada fue evaluada en la hidrólisis de celobiosa.

4.2. EXPERIMENTAL

4.2.1. METODOLOGÍA - PROCEDIMIENTO

La investigación planteada es experimental: se analizó el comportamiento de la variable respuesta (eficiencia de hidrólisis enzimática, medida en porcentaje) bajo condiciones controladas de laboratorio.

4.2.1.1. Reactivos Químicos

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico. Enzima β -glucosidasa de almendras 7,6 U/mg adquirida de Sigma; celobiosa, hidróxido de sodio 98%, ácido acético 99,5%, y glutaraldehído 25% se compraron a Panreac; fosfato disódico dibásico 99%, azul brillante de comasie, etanol 98 %, se adquirieron a Merck; fosfato de potasio monobásico 99% se obtuvo de J.T. Baker. Todas las soluciones se prepararon con agua tipo I obtenida de un Q-millipore de conductividad 0,05 μs .

4.2.1.2. Fase 2. Modificación y caracterización de NPM-G por la β -glucosidasa.

Las NPM- CoFe_2O_4 obtenidas se lavaron tres veces con agua desionizada y según el procedimiento de Verma y Madan (2013) [13], se tomó 200 mg de NPM y se suspendieron en una solución de glutaraldehído 1M en presencia de buffer fosfato a pH 6, la solución se calentó a 37°C durante una hora en agitación a 250 rpm; este ensayo se denominó tipo A. Las NPM-G activadas se recuperaron con un campo magnético externo y se lavaron con agua

desionizada y buffer fosfato pH 6 hasta eliminar los residuos de glutaraldehído. Siguiendo el mismo método también se modificaron NPM con 0,5% de glutaraldehído: ensayo denominado tipo B.

Los grupos amino terminal de la β -glucosidasa puede covalentemente inmovilizarse sobre las NPM-G. Según el procedimiento de Verma y Madan (2013) [13], para la mezcla se utilizaron concentraciones de enzima β -glucosidasa de $5,7E-5$ M y $8,5E-8$ M con solución de buffer acetato de sodio 20 mM a pH 6 que contiene 200 mg de NPM-G al 1M de glutaraldehído, se incubo a $37^{\circ}C/20h$ y se denominaron NPM-G-BGL tipo A y tipo B. La reacción de formación de la Base de Schiff se monitoreó por VOC y espectroscopía UV-vis, cada 2 horas. Para obtener los espectros UV-vis, cada 2 horas se tomó 200 μ l de sobrenadante y se usó para determinar la disminución de enzima libre mediante análisis de proteína libre por el método de Bradford a 595 nm [58], determinado cada 2 horas hasta 20 horas de reacción. La enzima inmovilizada se separó con un campo magnético externo y se lavó con agua desionizada y buffer acetato de sodio pH 6. La inmovilización también se evaluó utilizando el mismo método, NPM-G con un contenido de 1,5 M de glutaraldehído interactuaron con concentraciones de β -glucosidasa de $5,7E-5$ M y $8,5E-8$ M y las NPM-G-BGL se denominaron tipo C y tipo D.

El porcentaje de actividad de la enzima fue calculado con la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad enzimática (\%)} = \frac{\text{Actividad de la enzima inmovilizada}}{\text{Actividad de la enzima libre}} * 100 \text{ (Ec. 2)}$$

El porcentaje de la inmovilización de la enzima β -glucosidasa se determinó con la siguiente ecuación

$$\text{Inmovilización (\%)} = \left(\frac{\text{Act. enzima libre} - \text{Act. de la enzima en el sobrenadante}}{\text{Acti. enzima libre}} \right) * 100 \text{ (Ec. 3)}$$

La inmovilización de la β -glucosidasa sobre las NPM-G se determinó por UV-Vis, FT-IR y VOC, la estructura cristalina se determinó por difracción de rayos X (DRX); la morfología y el tamaño de distribución de la NPM-G-BGL se estableció por microscopia electrónica de transmisión (TEM), el comportamiento electroquímico se analizó por voltametría de onda cuadrada (VOC) y voltametría cíclica (VC) y el comportamiento magnético se determinó por técnica de magnetización de muestra vibrante (VSM).

4.2.1.3. Fase 3. Determinación de la actividad enzimática de β -glucosidasa inmovilizada

La actividad enzimática de la β -glucosidasa libre e inmovilizada sobre NPM-G se evaluó mediante la hidrólisis de celobiosa monitoreada por el método espectrofotométrico de DNS, siguiendo el procedimiento de Takahashie et al., (2011) [59], cambiando el sustrato de p-nitrofenol-glucósido (pNPG) por celobiosa. Para lo cual se construyó una curva de calibración de concentración de glucosa. Para la medida de la actividad enzimática se mezcló 2,5 mL de enzima β -glucosidasa de concentración $5,7E-5$ M, 45 μ L de celobiosa 10 mM y 1,45 mL de buffer acetato de sodio 20 mM a pH 4,5. La mezcla se incubó a 60 °C durante 20 h. cada 2 horas se tomó 100 μ L de muestra y se mezcló con 0,5 mL del reactivo de DNS, se calentó a 90°C/5 min, la mezcla se dejó enfriar, se adicionó 5 ml de agua desionizada y se midió la absorbancia a 540 nm, la concentración de glucosa liberada por hidrólisis de la celobiosa se calculó con la ecuación de la curva de calibración de glucosa. Para la actividad de la β -glucosidasa inmovilizada sobre NPM, se tomó 200 mg de NPM-G ($Co_{40}Fe_{60}$), que contenía β -glucosidasa en concentración $5,7E-5$ M y se procedió como se describió para la actividad de la enzima libre. La unidad de actividad enzimática [U] se define como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μ mol de glucosa por hora bajo las condiciones ensayadas. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

4.2.1.4. Fase 4. Evaluación de la estabilidad térmica y pH de la β -glucosidasa inmovilizada

20 mg ($5,7E-5$ M) de la enzima inmovilizada se mezcló con 45 μ L de celobiosa 10 mM y 1,45 mL de buffer acetato de sodio 20 mM a pH 3-8, se incubó a temperatura de 30-70°C durante 18 horas. Cada dos horas se analizó 100 μ l la disolución enzimática, adicionando un estándar de 150 mg/L de glucosa, y se procedió tal y como se describe en la fase 3. Como control se evaluó la actividad de la β -glucosidasa libre (2,5 ml, $5,7E-5$ M) en similares condiciones.

Diseño experimental: para la evaluación de la estabilidad de la temperatura y del pH de la enzima inmovilizada, se llevó a cabo según un diseño experimental factorial 5^2 . Se realizaron 25 ensayos por triplicado para un total de 75 pruebas. Los factores evaluados fueron: temperatura y pH, cada factor se evaluó en cinco niveles; la temperatura se evaluó a: 30, 40, 50, 60 y 70 °C y el pH se evaluó a: 3,0, 4,5, 6,0, 7,5 y 8,0. La variable respuesta evaluada fue el porcentaje de hidrólisis del sustrato: glucosa liberada desde la celobiosa.

4.2.1.5. Fase 5. Determinación de los parámetros cinéticos de la β -glucosidasa inmovilizada sobre NPM-G

Los parámetros cinéticos de la β -glucosidasa inmovilizada se determinaron a 60°C, variando la concentración de la celobiosa usada como sustrato: 2,0-15,0 mM en presencia de buffer acetato de sodio 0,1 M pH 4,5. Con los datos obtenidos se calcularon los valores de K_M y V_{max} de la enzima libre e inmovilizada usando la regresión no lineal de la ecuación de Michaelis-Menten y el diagrama de Hanes-Woolf [13], [60]. Como control se usó igual cantidad de enzima libre evaluada bajo similares condiciones. Estos diagramas indican de forma precisa el valor de K_M , es decir la cantidad de enzima requerida para hidrolizar un μmol de sustrato*unidad de tiempo y el valor de V_{max} indica el tiempo al cual la enzima alcanza su mayor actividad catalítica a las condiciones de ensayo establecidas.

4.2.1.6. Fase 6. Reutilización de la β -glucosidasa inmovilizada

La reutilización de la β -glucosidasa inmovilizada se evaluó a 60 °C, mediante hidrólisis de celobiosa bajo condiciones estándar. Después de cada uso, la enzima fue lavada con agua desionizada y buffer acetato de sodio pH 4,5. En cada ensayo se adicionó 1,45 mL de buffer fresco y 45 μL ml de celobiosa 12 mM, se procediendo como se describe en la determinación de la actividad enzimática. La actividad de la enzima inmovilizada después del primer uso, se definió como el control y se le atribuyó una actividad relativa del 100% [13]. Se realizaron dos tipos de ensayos: en el primer ensayo se evaluó 12 ciclos de uso de la β -glucosidasa inmovilizada (NPM-G- β GL), aplicado en sustrato puro (celobiosa) y el segundo tipo de ensayo, 6 pruebas sobre el extracto de solasonina obtenido de la especie *Solanum marginatum*.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Inmovilización de la enzima β -glucosidasa sobre NPM-G de CoFe_2O_4 (NPM-G-BGL)

La inmovilización de la β -glucosidasa sobre NPM- CoFe_2O_4 , se evaluó por VOC, VC y espectroscopía UV-Vis. En la figura 4.1a y 4.1b, se observa la señal anódica a -1206 ± 6 mV de la β -glucosidasa inmovilizada, la cual disminuye hasta quedar por debajo del límite de cuantificación (60 ppb), esta señal corresponde al Co^{2+} y presenta un leve desplazamiento en su potencial anódico ocasionado por la interacción con el sistema de inmovilización, el comportamiento electroquímico de la β -glucosidasa sobre NPM- CoFe_2O_4 , fue muy similar al presentado por la bromelina (figura 3.7).

Las NPM-CoFe₂O₄, cuando se activan con glutaraldehído y se une covalentemente la β-glucosidasa, ocasiona que la actividad electroquímica de la NPM-CoFe₂O₄, disminuya hasta perder su actividad electroactiva al aplicar un potencial externo negativo. Esta pérdida de electriactividad se atribuye al recubrimiento de la NPM, por dos capas, la primera con glutaraldehído mediante interacción física y la segunda con la β-glucosidasa formando una base de Schiff entre la β-glucosidasa-glutaraldehído, Figura 8.

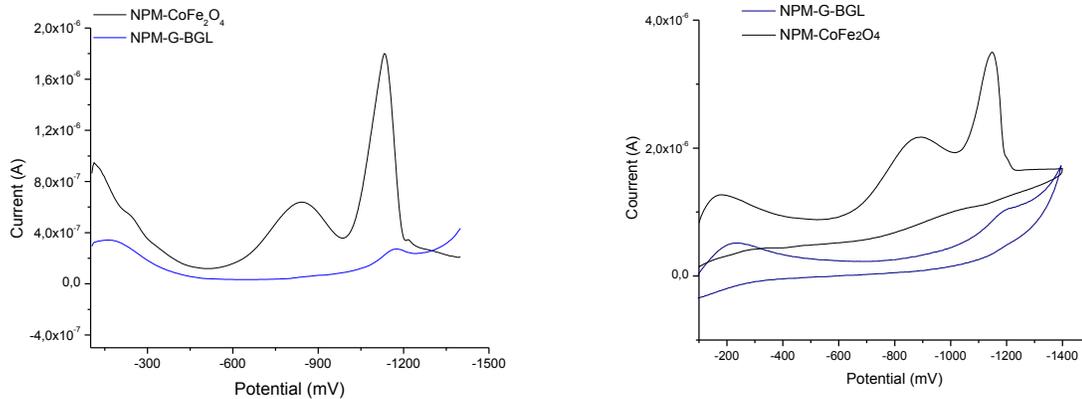


Figura 4.1. Polarogramas de VOC y VC de la actividad electroactiva de las NPM-CoFe₂O₄ y la β-glucosidasa inmovilizada sobre NPM-CoFe₂O₄ (NPM-G-BGL).

Para las NPM tipo A se presentan los resultados de la inmovilización monitoreada a diferentes tiempos de reacción. El polarograma de VOC en la figura 4.2 (izquierda), representa la cinética de inmovilización de la β-glucosidasa, se observa que a medida que pasa el tiempo la cantidad de enzima inmovilizada aumenta. Durante las primeras 8 horas de inmovilización el proceso fue lento, alcanzando un porcentaje de 35,8%. La máxima velocidad de inmovilización transcurrió de 8-16 horas; en 12 horas alcanzó un porcentaje de 83,2% y a las 16 horas alcanzó un máximo de 85,6% de inmovilización, luego la absorbancia tiende a ser constante, definiendo como 16 horas el tiempo necesario para el proceso de inmovilización. En paralelo se evaluó el proceso por espectroscopía UV-Vis, la figura 4.2 (derecha), se observa que después de 16 horas de inmovilización la absorbancia se hace constante indicando que la enzima alcanzó su máximo porcentaje de inmovilización.

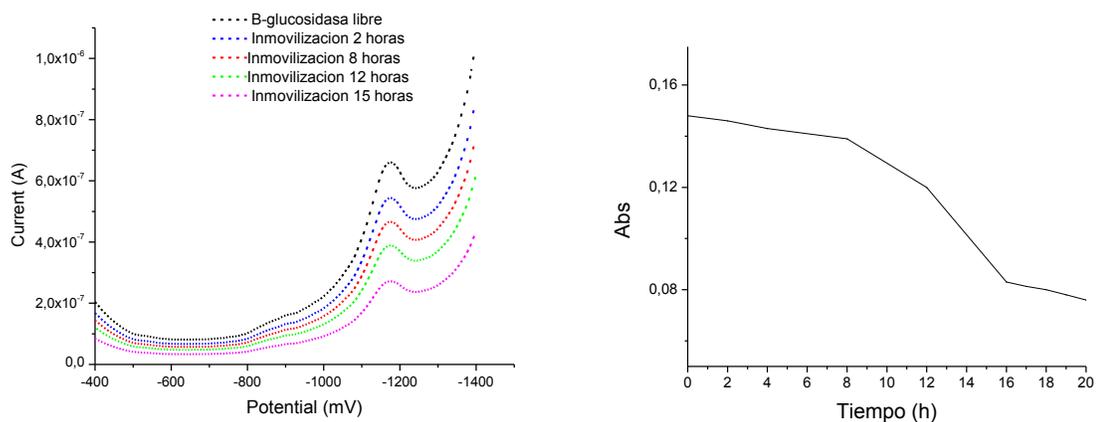


Figura 4.2. Seguimiento proceso de inmovilizacion de β -glucosidasa sobre NPM-G de CoFe_2O_4 . Seguimiento por VOC (izquierda) y seguimiento po UV-Vis (derecha).

4.3.2. Optimización de condiciones de inmovilización

El seguimiento del proceso de inmovilización se realizó calculado la concentración de enzima en el sobrenadante, obtenida de la curva de calibración de estándar de albumina sérica bovina (figura 4.3).

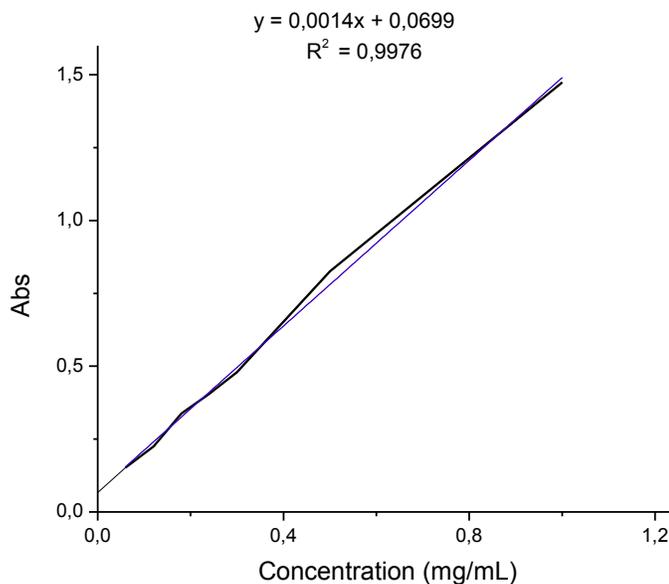


Figura 4.3. Curva de calibración de Albúmina Sérica Bovina

Los resultados de Bradford en el sobrenadante para estimar la β -glucosidasa libre se presentan en la tabla 4.1. Como se observa, se generaron cambios en la reducción de

Bradford, siendo más significativo para el tipo A y C, el cambio de 100% a 15,4 y a 25%, respectivamente; significando una reducción de β -glucosidasa en el sobrenadante del 85,6 y 75% respectivamente, la cual se inmovilizó sobre la NPM-G; mientras que para el tipo B y D, el porcentaje de β -glucosidasa en el sobrenadante fue mayor, significando menor porcentaje de inmovilización.

Tabla 4.1. Evaluación de condiciones de recubrimiento de NPM-G con β -glucosidasa

Modificación NPM-G	Concentración		% Reducción Bradford (proteína libre en sobrenadante)
	Glutaraldehído M	β -glucosidasa M	
Tipo A	1	5,7E-05	15,4 \pm 2,1%
Tipo B	1	8,5E-08	60 \pm 3,5%
Tipo C	1,5	5,7E-05	25 \pm 2,4%
Tipo D	1,5	8,5E-08	40 \pm 3,2%

Estos resultados podrían explicarse si se piensa que las reacciones del glutaraldehído con los grupos amino de las proteínas enzimáticas implican tanto reacciones intramoleculares como intermoleculares. Las condiciones que favorecen uno u otro mecanismo dependen, entre otros factores, de las características de cada enzima [61]. De hecho, en los resultados en los que la β -glucosidasa entrecruzada con glutaraldehído presentaba menor actividad que el enzima libre podría pensarse en un mayor número de reacciones intramoleculares [61], mientras que un entrecruzamiento intermolecular podría explicar los resultados en los que se producía una activación de la β -glucosidasa inmovilizada [62].

La inmovilización de la β -glucosidasa sobre NPM-G, depende de la concentración de enzima en la solución, y el tiempo de inmovilización. Las condiciones optimizadas del proceso fueron: 200 mg de NPM de CoFe_2O_4 , 1 M de glutaraldehído, 5,7E-05 M de β -glucosidasa y tiempo de inmovilización 15 horas. En estas condiciones se genera una pérdida total de electroactividad de la NPM-G-BGL, este factor es de importancia al aplicar este sistema en la hidrólisis de celobiosa, debido a que se previene la contaminación con NPM al producto de hidrólisis, la NPM- CoFe_2O_4 es estable en las condiciones de reacción determinadas, aunque el sistema de inmovilización de la β -glucosidasa, ocasiona una leve pérdida del poder magnético de la NPM, figura 4.4, aún es posible su recuperación a través de un campo magnético externo.

La inmovilización de β -glucosidasa ha sido llevada a cabo en diferentes sistemas y soportes, aplicando diversas técnicas con éxito, con porcentajes de inmovilización de 20-90% [51]

[52]. Los resultados de inmovilización obtenidos en este estudio son satisfactorios, obteniendo un porcentaje máximo de inmovilización de β -glucosidasa de $85,4 \pm 3 \%$, están en el rango de los obtenidos por Bustos et al., (2005) [63], quienes inmovilizaron esta enzima sobre humatos edáficos y obtuvieron porcentajes de inmovilización de 80,7-96,5%; Zheng et al., (2013) inmovilizó esta enzima sobre microesferas magnéticas de quitosano y el sistema mantuvo el 78,2% de actividad en 8 ciclos [12].

4.3.3. Caracterización de la enzima β -glucosidasa inmovilizada sobre NPM-G ($\text{Co}_4\text{Fe}_6\text{O}$)

Se evaluó las propiedades magnéticas de β -glucosidasa inmovilizada sobre NPM-G, usando la técnica VSM. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente. La figura 4.4 presenta la saturación de magnetización de la β -glucosidasa inmovilizada, el valor fue determinado en 33,7 emu/g. El momento de magnetización de la enzima inmovilizada decrece significativamente en 18,6%, esta reducción fue menor que el sistema inmovilizado con la enzima bromelina que presentó una reducción de 21,96 % en comparación con la NPM- CoFe_2O_4 . Las curvas de histéresis obtenida revela la β -glucosidasa inmovilizada tienen comportamiento ferromagnético al igual que la NPM[29],[28]. Tanto las NPM- CoFe_2O_4 como la β -glucosidasa inmovilizada mantienen altos valores de saturación de magnetización, lo cual facilita su recuperación de soluciones por medio de un campo magnético externo.

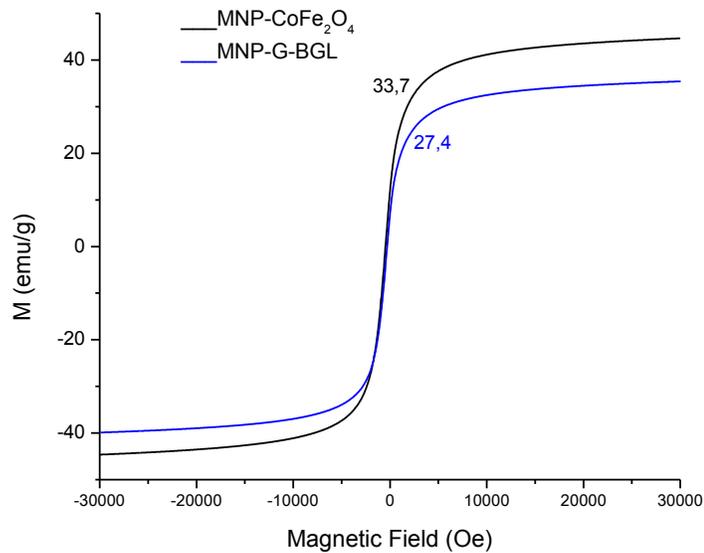


Figura 4.4. Curvas de magnetización a temperatura ambiente de NPM- CoFe_2O_4 y β -glucosidasa inmovilizada sobre NPM-G.

La micrografía de transmisión obtenida para las NPM-CoFe₂O₄ (Co₄₀Fe₆₀), se presentan en la figura 4.5 (izquierda). Como indica la figura, las NPM presentan una morfología ovalada con un diámetro promedio de $17,37 \pm 2,02$ nm (izquierda). El proceso de inmovilización de la β -glucosidasa sobre las NPM-CoFe₂O₄, no afectó su morfología, el tamaño aumenta a $23,68 \pm 3,82$ nm, este aumento puede ser debido al recubrimiento de la NPM, con glutaraldehído y a la enzima β -glucosidasa unida covalentemente a este. El recubrimiento se puede observar en la figura 4.5 (derecha), se puede evidenciar la presencia de una película que recubre la NPM, esta película no se presenta en la NPM sin tratamiento de funcionalización (figura 4.5, izquierda). Esto indica que el proceso de inmovilización llevado a cabo en las condiciones optimizadas, permite obtener NPM-CoFe₂O₄ activadas y pueden ser utilizadas en bioprocesos de hidrólisis de celobiosa y extractos de solasonina. El aumento de tamaño fue inferior al sistema de inmovilización con la enzima bromelina ($27,68 \pm 4,02$ nm), debido a que en este último se usó recubrimiento con quitosano y glutaraldehído.

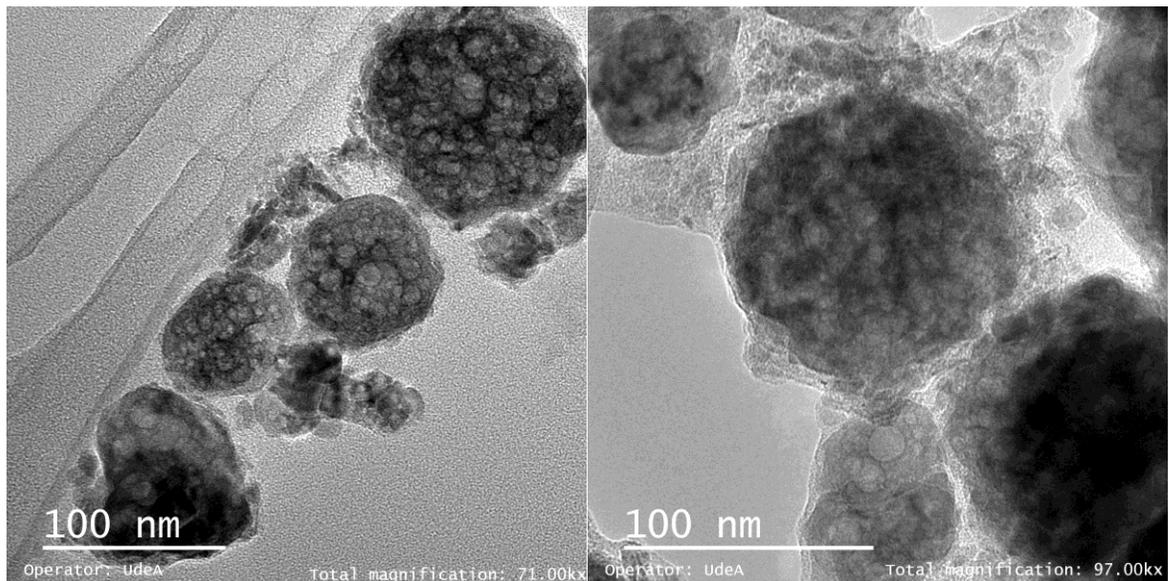


Figura 4.5. Micrografías electrónicas de Transmisión (TEM): NPM-CoFe₂O₄ (izquierda) y NPM-G-BGL (derecha).

El análisis por TEM, además permitió realizar la cuantificación de las NPM-G-BGL, en la tabla 4.2 se observa los elementos cuantificados. El silicio proviene del mortero donde se molio la muestra, el azufre proviene de las sales de sulfatos de hierro y cobalto empleados en la síntesis y el manganeso obedece a impurezas de los reactivos. Estos valores fueron ajustados (valores en parentesis) para cuantificar de forma precisa los principales elementos en la NPG-G-BGL. Como se observa, la β -glucosidasa y el glutaraldehído empleados en la inmovilización, no modificaron la composición de la NPM-CoFe₂O₄ (ver tabla 2.2).

Tabla 4.2. Resultados de cuantificación de NPM-G-BGL (Co₄₀Fe₆₀), realizado por TEM-EDX

Element	Weight %	Atomic %	Uncert %	Correction	k-Factor
O (K)	24.02 (26.27)	52.15 (56.09)	0.05	0.51	1.889
Si (K)	2.60	3.21	0.01	0.92	1.000
S (K)	0.37	0.41	0.00	0.93	1.021
Mn (K)	0.51	0.32	0.00	0.99	1.372
Fe (K)	35.68 36.30)	22.19 (22.21)	0.04	0.99	1.401
Co (K)	36.80 (37.41)	21.69 (21.69)	0.04	0.99	1.492

los valores en parentesis indican el ajuste de resultados para cuantificación de NPM-G-BGL (Co₄₀Fe₆₀).

El proceso de inmovilización de la β -glucosidasa sobre las NPM-G, se confirmó por espectroscopía FT-IR, figura 4.6. Los espectros de β -glucosidasa, NPM-CoFe₂O₄ y glutaraldehído, representan estos reactivos en estado puro, sin modificar (anexos1-3). El espectro NPM-G-BGL, representa la β -glucosidasa inmovilizada sobre las NPM-G y se observa que esta se unió covalentemente al glutaraldehído formando una base de Schiff, la señal de la NPM-CoFe₂O₄ que presenta a 588cm⁻¹ permanece (Co²⁺ y Fe²⁺), y aparecen nuevas señales a 3390 cm⁻¹ asignada a tensiones de grupos NH y OH, hacia 1694 cm⁻¹ atribuida a una flexión del grupo OH, en 1540 cm⁻¹ reconocida como flexión del grupo NH, a 1240 cm⁻¹ que señala la flexión del grupo CH y en 1058 cm⁻¹ asignada a una flexión del grupo NC que sirve de indicador de formación de bases de Schiff y corresponden a la interacción entre los grupos amino secundarios de la β -glucosidasa y grupos aldehído del lutaraldehído.

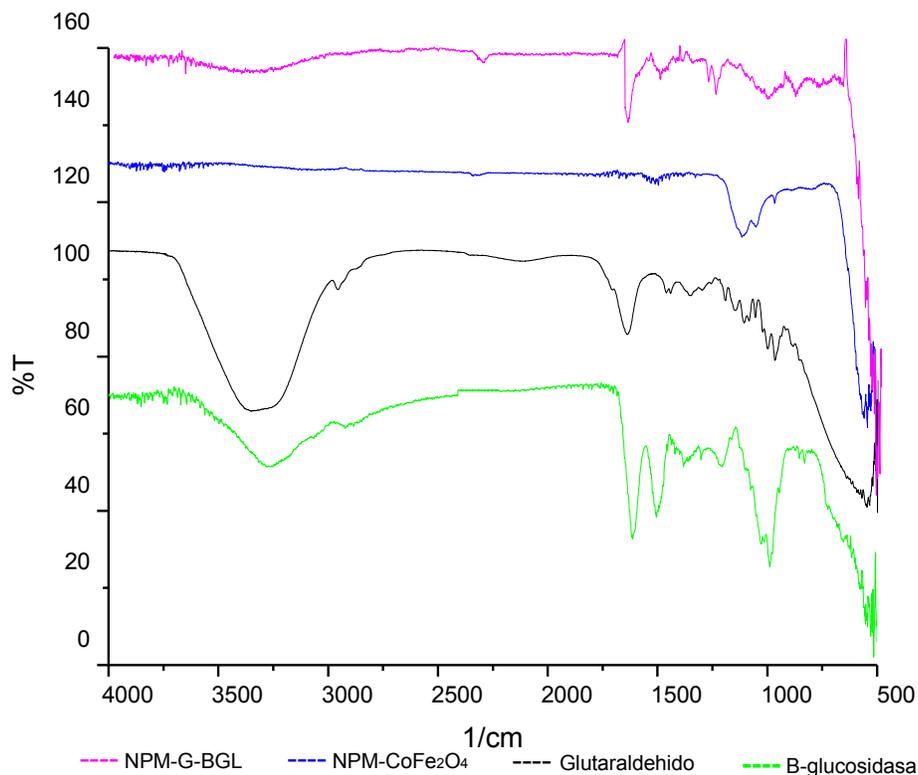


Figura 4.6. Espectro FT-IR. Sistema inmovilizado: β -glucosidasa inmovilizada sobre NPM-CoFe₂O₄ (Co₄₀Fe₆₀) NPM-G-BGL.

La figura 4.7, corresponde al difractograma de RX de NPM-G-BGL (Co₄₀Fe₆₀), se observaron los mismos seis picos característicos observados las NPM-CoFe₂O₄ (figura 2.3) relacionados con los planos cristalográficos según índices de Miller (111), (220), (311), (422), (400), (511) y (440) respectivamente, correspondientes a una estructuras tipo espinela de CoFe₂O₄ con grupo espacial fd-3m (JCPDS database file, No.79e0418). Se sugiere que el recubrimiento y activación con glutaraldehído en el proceso de inmovilización de la β -glucosidasa no afectó las fases de las NPM-CoFe₂O₄. Las NPM conservan sus propiedades magnéticas durante el proceso de separación, que es adecuado para su bioseparación.

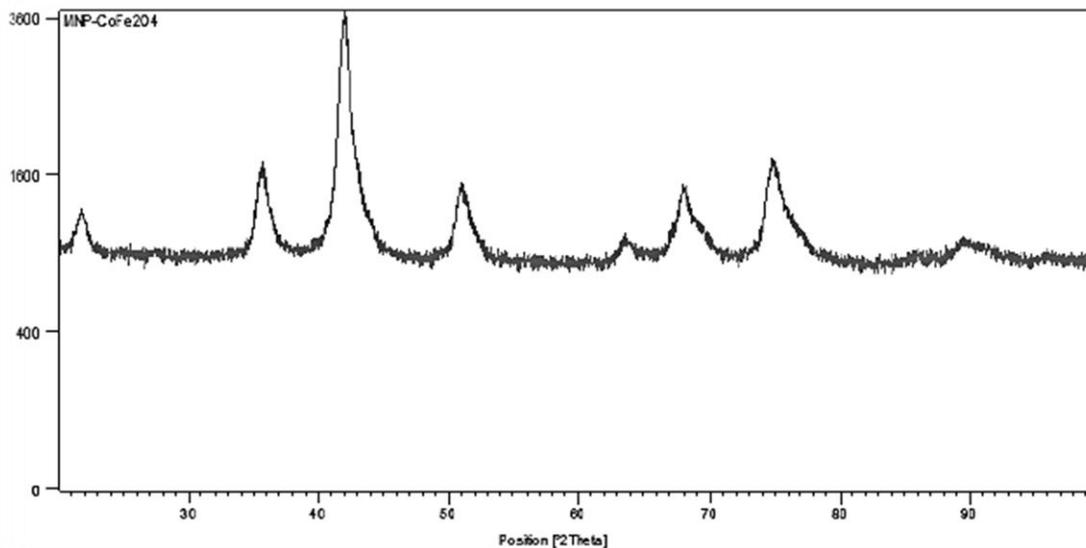


Figura 4.7. Difractograma de β -glucosidasa inmovilizada sobre NPM-G ($\text{Co}_{40}\text{Fe}_{60}$)

4.3.4. Determinación de la actividad enzimática y parámetros cinéticos de β -glucosidasa

La figura 4.8 (izquierda), corresponde a la curva de calibración de DNS, elaborada para la determinación de glucosa liberada desde la hidrólisis de la celobiosa por acción de la β -glucosidasa libre.

La determinación de la actividad enzimática de la β -glucosidasa libre e inmovilizada se obtuvo al evaluar su velocidad de reacción de 0 a 20 horas. En la figura 4.7 (derecha) se observa que a medida que el tiempo de reacción avanza la concentración de glucosa aumenta tendiendo a ser constante, obteniéndose que a 15 horas la enzima alcanza su máxima velocidad de actividad hidrolítica sobre la celobiosa. Los valores de concentración aumentan debido a la hidrólisis de la celobiosa, generando 2 moléculas de glucosa, ocasionando un aumento en su concentración que es determinada por el método de DNS.

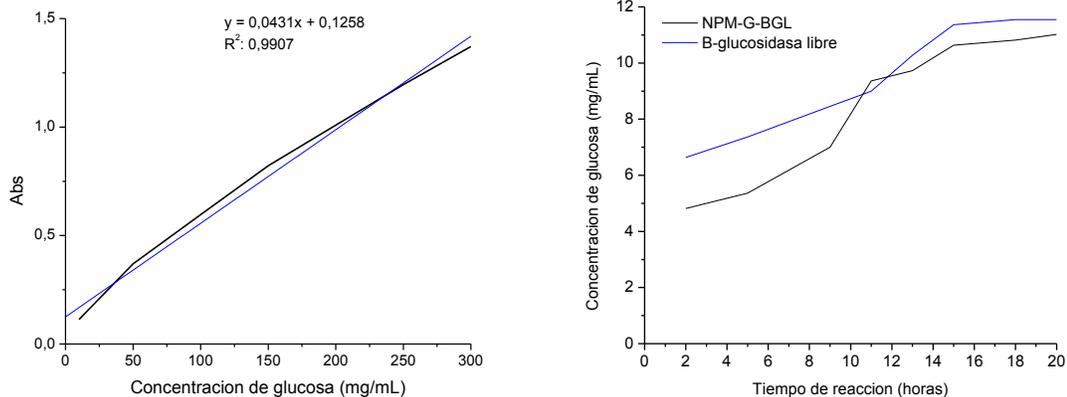


Figura 4.8. Curva de calibración de DNS para determinación de glucosa (izquierda), y velocidad máxima de reacción de la β -glucosidasa libre e inmovilizada (derecha).

Una vez determinada la velocidad máxima de reacción de la β -glucosidasa libre e inmovilizada sobre la hidrólisis de celobiosa, se determinó su actividad enzimática sobre este sustrato manteniendo su concentración en 10 mM y la concentración de la enzima libre e inmovilizada en $4,5E-5M$ en buffer citrato de sodio a pH 4,5. La actividad de la β -glucosidasa libre y de la NPM-G-BGL fue determinada en $95 \pm 3,6$ y $87 \pm 2,8\%$ respectivamente.

Del diagrama de Michaelis-Menten se determinaron matemáticamente los valores de K_M y V_{max} de la enzima libre e inmovilizada usando la regresión no lineal de la ecuación de Michaelis-Menten y el diagrama de Lineweaver-Burk (figura 4.9) obteniendo un K_M de 2,1mm/l para la enzima inmovilizada y 1,8 mm/l para la enzima libre, la V_{max} para la enzima libre fue 9,46-2 U/hora y para la enzima inmovilizada 1,767 U/hora. La β -glucosidasa inmovilizada mantiene un máximo de 82% de actividad catalítica en comparación con la β -glucosidasa libre que presenta un máximo de 93% de actividad. Para alcanzar la misma actividad catalítica de la enzima libre, se requiere un 11,9% más de enzima inmovilizada. Usando celobiosa como sustrato, la K_M aparente reportada es 1,1-6,46 mmol/l y la V_{max} aparente reportada es 6,1-13,7 $\mu\text{mol}/\text{min}/$ [64]. Los valores obtenidos experimentalmente para la β -glucosidasa, están dentro del rango de valores reportados en la literatura.

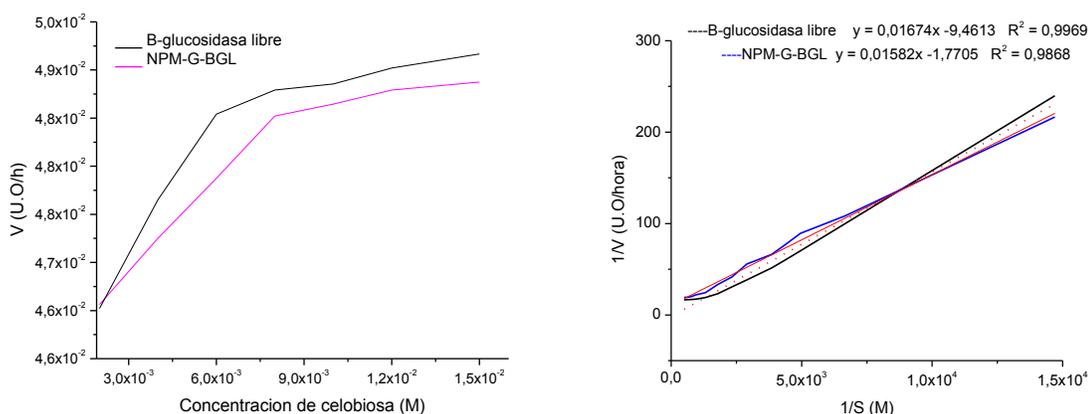


Figura 4.9. Determinación de parámetros cinéticos de β -glucosidasa libre e inmovilizada. Diagrama de Michaelis-Menten (izquierda) y diagrama de Lineweaver-Burk (derecha).

La figura 4.10, corresponde a la evaluación de la influencia de la concentración de la celobiosa. Como se observa, la celobiosa a una concentración mayor de 12 mM, genera inhibición enzimática por sustrato, tanto a la de β -glucosidasa libre como inmovilizada, siendo mayor en el sistema inmovilizado.

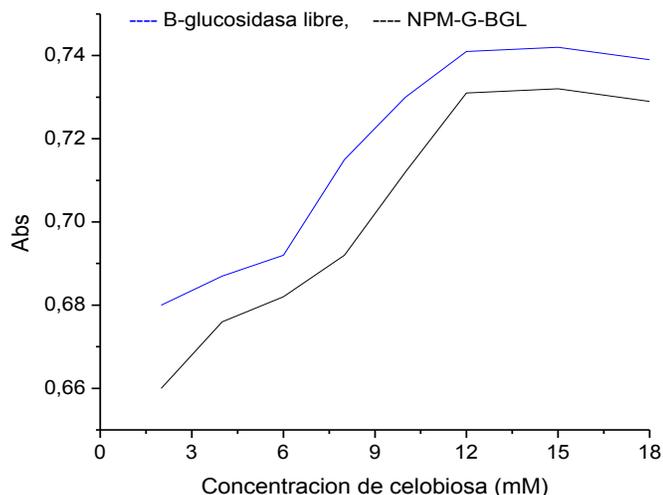


Figura 4.10. Evaluación del efecto de la concentración del sustrato celobiosa en la actividad catalítica de la de β -glucosidasa libre como inmovilizada.

4.3.5. Evaluación de la estabilidad térmica y del pH de la β -glucosidasa libre e inmovilizada

En la tabla 4.3 se detalla la información del diseño experimental realizado para la evaluación de la estabilidad térmica y del pH, de la β -glucosidasa libre e inmovilizada. Los ensayos fueron realizados aleatoriamente. La variable respuesta evaluada fue la hidrólisis de celobiosa, expresada en concentración de glucosa liberada en un tiempo de reacción de 15

horas. Como se detalla la mayor concentración de glucosa es producida por la acción de la β -glucosidasa libre. El ensayo 17 que corresponde a la combinación de temperatura de 60°C y pH 4, presentó la mejor condición para la hidrólisis de celobiosa, ya que se obtuvo la mayor concentración de glucosa tanto por la enzima libre como inmovilizada.

Tabla 4.3. Diseño experimental factorial balanceado 5², para la evaluación de la estabilidad térmica y del pH de la enzima libre e inmovilizada.

OrdenEst	Orden Corrida	Tipo Pt	Bloques	T°C	pH	NPM-G-BGL. Glucosa mg/mL.	β -glucosidasa libre. Glucosa mg/mL
1	1	1	1	30	3,0	8,12	9,32
2	2	1	1	30	4,5	23,04	24,14
3	3	1	1	30	6,0	14,63	15,02
4	4	1	1	30	7,5	17,62	18,04
5	5	1	1	30	8,0	12,54	13,01
6	6	1	1	40	3,0	12,33	13,05
7	7	1	1	40	4,5	34,72	36,01
8	8	1	1	40	6,0	34,72	36,01
9	9	1	1	40	7,5	22,19	23,65
10	10	1	1	40	8,0	20,63	19,65
11	11	1	1	50	3,0	15,92	16,83
12	12	1	1	50	4,5	38,82	39,61
13	13	1	1	50	6,0	34,25	36,04
14	14	1	1	50	7,5	27,37	28,08
15	15	1	1	50	8,0	21,87	22,16
16	16	1	1	60	3,0	16,21	18,72
17	17	1	1	60	4,5	44,91	45,64
18	18	1	1	60	6,0	36,09	38,27
19	19	1	1	60	7,5	30,36	32,35
20	20	1	1	60	8,0	29,32	31,06
21	21	1	1	70	3,0	11,56	12,06
22	22	1	1	70	4,5	30,24	31,06
23	23	1	1	70	6,0	32,43	31,63
24	24	1	1	70	7,5	21,76	22,06
25	25	1	1	70	8,0	16,84	17,06

Las figuras 4.11-4.12, detalla la evaluación de los efectos principales: Temperatura y pH de la de β -glucosidasa libre como inmovilizada. Como se observa en los dos casos, el pH

adecuado para llevar a cabo la reacción de hidrólisis de celobiosa es a pH 4,5 y a temperatura de 60°C, ya que en estas condiciones se obtiene mayor concentración de glucosa libre de la hidrólisis de la celobiosa.

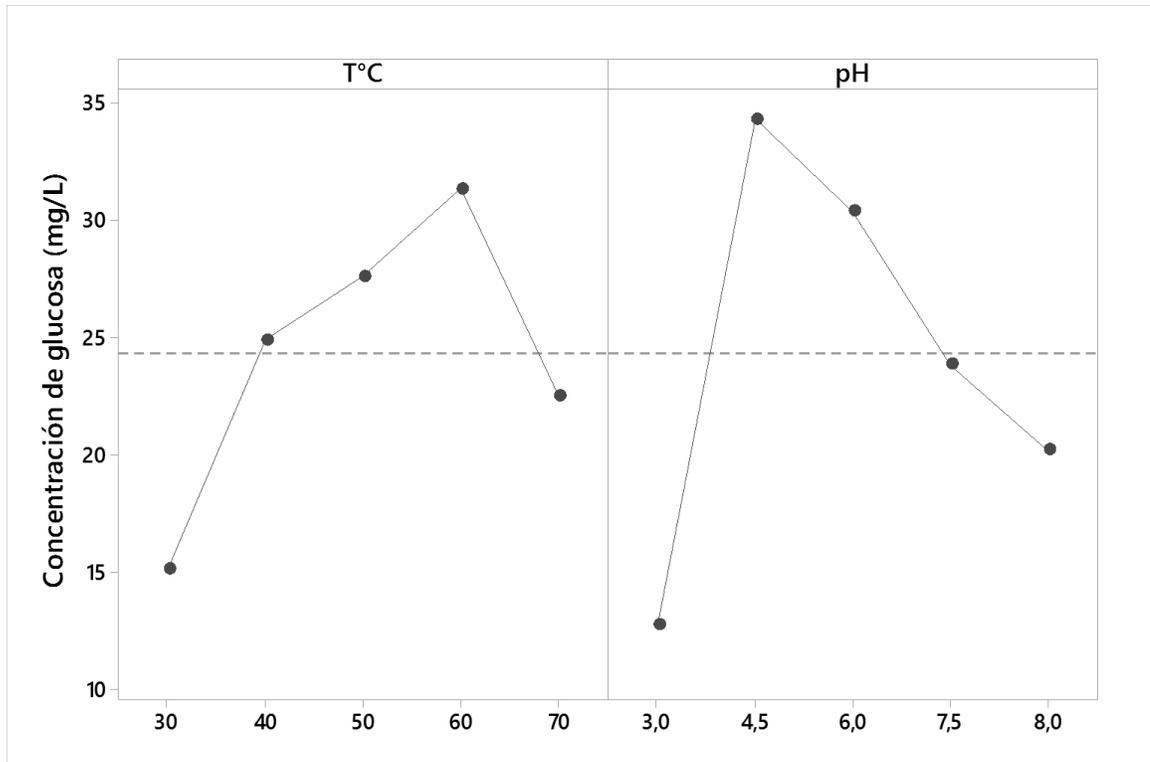


Figura 4.11. Efectos principales T°C-pH para β -glucosidasa libre.

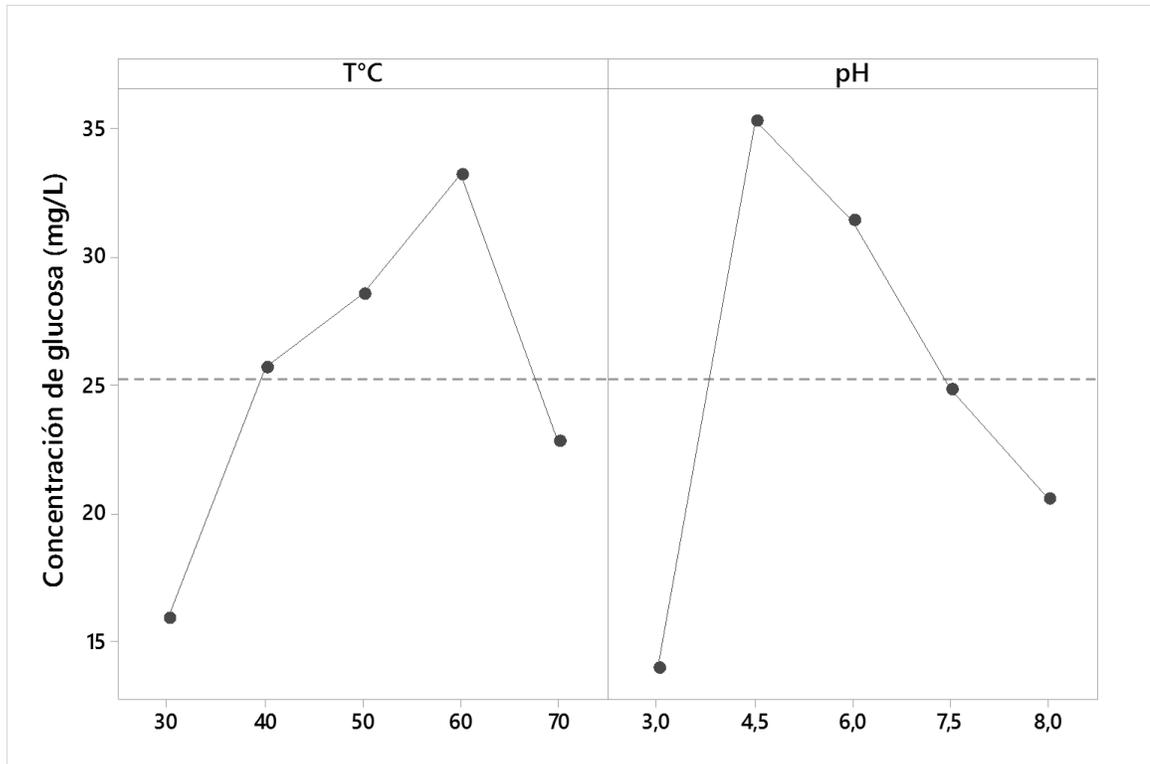


Figura 4.12. Efectos principales T°C-pH para β -glucosidasa inmovilizada.

Se evaluó la interacción de los efectos principales pH y temperatura. En las figuras 4.13-4.14 se observa que la mejor interacción de estos dos efectos se presenta a pH 4,5 y a 60 °C. Las figuras indican que en las condiciones descritas anteriormente, se debe llevar a cabo la hidrólisis de celobiosa eficientemente.

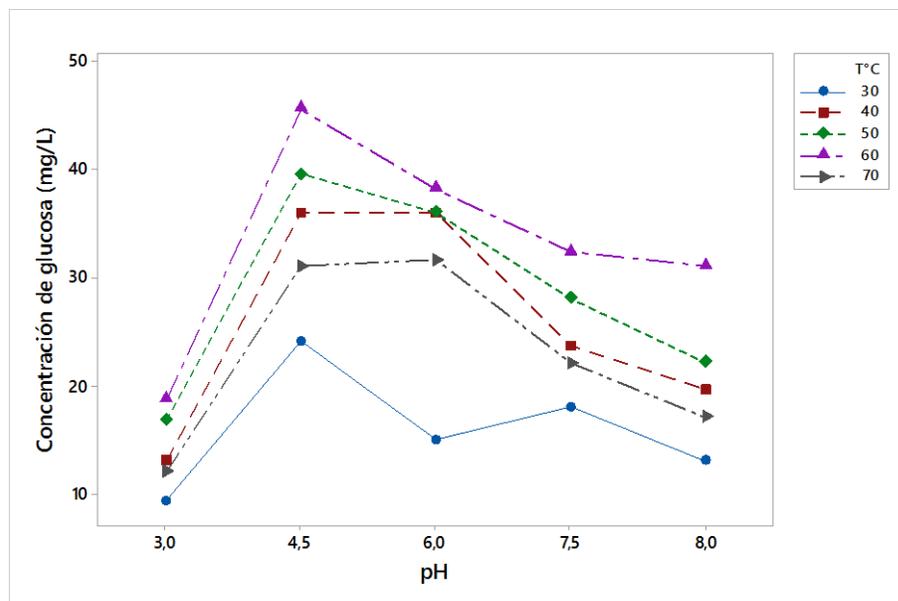


Figura 4.13. Interacción de efectos principales T°C-pH para β -glucosidasa

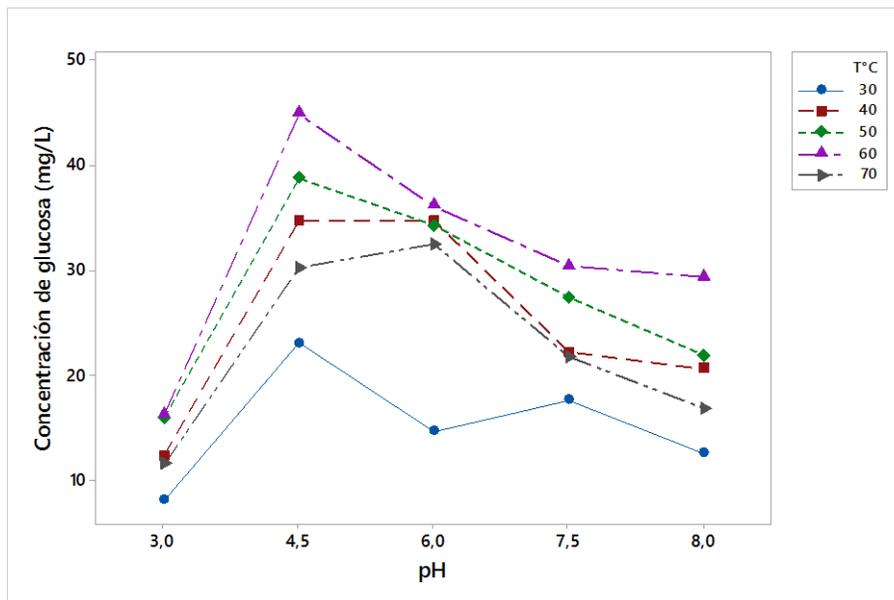


Figura 4.14. Interacción de efectos principales T°C-pH para β -glucosidasa inmovilizada

La temperatura óptima para la inmovilización de la β -glucosidasa fue determinada de 30-70°C, presentándose variaciones significativas en el rango de temperatura evaluado. En el rango de temperatura 50-60°C la actividad de la enzima inmovilizada es de 83-85,4% con respecto a la enzima libre que genera una actividad de 91-95%. La β -glucosidasa inmovilizada sobre NPM-G mantiene una máxima actividad catalítica de 82,4% a 60°C sobre la celobiosa usada como sustrato. La literatura reporta para la actividad enzimática temperaturas de β -glucosidasa, temperaturas óptimas que oscilan entre 50-70°C y a temperaturas mayores se desnaturaliza la enzima [60], [12] con valores de actividad catalítica a estas temperaturas oscilan entre 60-92% [60], [13].

4.3.6. Reutilización de la β -glucosidasa inmovilizada

Para esta evaluación de acuerdo a la K_M obtenida, la β -glucosidasa inmovilizada tipos A, se evaluó sobre sustrato celobiosa y extracto de solasonina, reutilizada 15 y 6 ciclos respectivamente, realizando el monitoreo con el método de Bradford. La actividad de la enzima inmovilizada después del primer uso, durante 15 horas, se definió como el control y se le atribuyó una actividad relativa del 100%. Para la celobiosa, la figura 4.15 (izquierda) presenta la actividad enzimática de la β -glucosidasa inmovilizada con respecto a la actividad inicial del 100%, en su segundo uso mantiene el 98% de la actividad enzimática, hasta el décimo uso mantiene un 52% de su actividad, después decrece significativamente de 47,9% a 17,6%. La absorbancia medida de la glucosa después del décimo ciclo disminuye,

indicando que la enzima pierde gradualmente su actividad, hasta el ciclo 15 donde la actividad es del 17,6%. Para la reutilización sobre extractos de solasonina, en el segundo ciclo la actividad de la glucosidasa inmovilizada mantuvo el 97% y en el ciclo 6 mantuvo el 75,4% de actividad. Paralelamente se evaluó la estabilidad de la β -glucosidasa inmovilizada, el ensayo se realizó por el método de Bradford aplicado en el sobrenadante en cada ciclo. La figura 4.15 (derecha) indica que la estabilidad de la enzima inmovilizada, al ciclo 1, representa la concentración de la β -glucosidasa inmovilizada sobre NPM-G y se le asignó un valor relativo de 100%. La concentración se mantiene estable es decir no hay pérdida significativa de la β -glucosidasa inmovilizada hacia el sobrenadante. La pérdida de enzima hacia el sobrenadante de celobiosa y extractos de solasonina fueron determinados en $2,6 \pm 0,25$ y $2,5 \pm 0,3$ % respectivamente. Esta unión es fuerte, como ya se mencionó la β -glucosidasa se une covalentemente a los grupos aldehídos del glutaraldehído formando bases de Schiff, las cuales dan estabilidad al sistema inmovilizado bajo las condiciones evaluadas. Chen et al., (2014) inmovilizó esta enzima sobre NPM de Fe_3O_4 y reporta que el sistema inmovilizado mantiene el 90% de actividad hasta el ciclo 15 [60]. Verma et al., (2013) reporta que después de 16 ciclos la β -glucosidasa inmovilizada en nanopartículas de óxido de hierro, mantiene el 50% de la actividad catalítica [13].

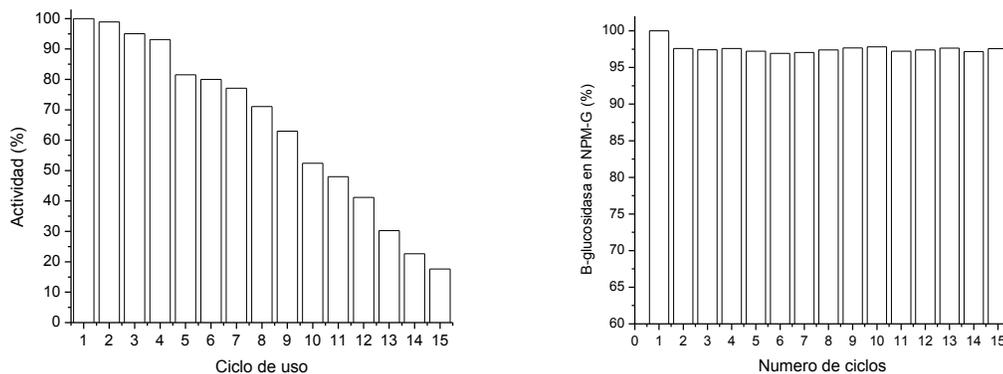


Figura 4.15. Reutilización y actividad enzimática de la β -glucosidasa inmovilizada sobre NPM-G. Izquierda reutilización y derecha pérdida de actividad en cada ciclo.

4.4. CONCLUSIONES

La enzima β -glucosidasa fue inmovilizada en un sistema bionanoestructurado reciclable usando como soporte NPM-CoFe₂O₄ recubiertas y activadas con glutaraldehído. El sistema fue evaluado en celobiosa usada como sustrato. La β -glucosidasa tipo A y C, presentaron la mayor eficiencia de inmovilización de $84,6 \pm 2,1\%$ y $75 \pm 2,4\%$. La actividad catalítica de la enzima libre e inmovilizada fue determinada en $93 \pm 2,6$ y $82 \pm 2,8\%$ respectivamente. La K_M y V_{MAX} fueron mayores en la enzima libre, y fue requerido un 11,9% más de enzima inmovilizada para alcanzar la misma actividad catalítica de la enzima libre. Sin embargo esta diferencia es superada por la β -glucosidasa inmovilizada al lograr ser reutilizada durante diez ciclos; la cual después del segundo ciclo mantiene una actividad del $98 \pm 1,6\%$, y en el décimo ciclo aún mantiene el $52 \pm 2,5\%$ de su actividad, decreciendo a $17,6 \pm 2,1\%$ en su ciclo 15.

La morfología de la β -glucosidasa inmovilizada sobre las NPM-G no se vio afectada, el tamaño aumentó de $17,37 \pm 2,02$ a $25,68 \pm 4,02$ nm, este aumento puede ser debido al recubrimiento de la NPM, con glutaraldehído y a la enzima β -glucosidasa unida covalentemente a éste.

Según el diseño experimental para evaluar la estabilidad de la temperatura y del pH, indicaron que existe una interacción entre estos efectos principales y las condiciones óptimas para la hidrólisis de celobiosa por la β -glucosidasa libre e inmovilizada, fueron determinados en 60°C y pH 4,5.

5. CAPITULO IV

APLICACIÓN DE LA β -GLUCOSIDASA INMOVILIZADA SOBRE NPM-G, EN LA HIDRÓLISIS DE SOLASONINA PARA OBTENCIÓN DE SOLASODINA

5.1. Introducción

Las diferentes rutas químicas usadas para extraer saponinas y alcaloides de matrices vegetales se basan en la naturaleza polar de estos compuestos. Inicialmente se realiza un proceso de extracción en caliente o en frío, con agua o alcoholes de bajo peso molecular, como metanol, etanol, butanol o mezclas acuosas de estos alcoholes en diversas proporciones [10]; seguido de una hidrólisis ácida o enzimática para generar la ruptura del enlace glicosídico de la solasonina, liberando la solasodina; finalmente se requieren procesos adicionales de purificación. El proceso tradicional de hidrólisis de solasonina emplea ácidos inorgánicos (HCl, H₂SO₄, en altas concentraciones 4-10 N, requiere tiempos largos de reacción 4-8 horas y se generan residuos peligrosos para el entorno natural. Llevar a cabo la reacción de hidrólisis con el uso de enzimas evitaría las dificultades mencionadas pero es inviable por su alto costo. Los rendimientos de extracción de solasodina varían de 0,7-2,4% en base seca, dependiendo del método de extracción empleado y según algunos autores el estado de madurez del fruto de “jaboncillo” afecta significativamente el rendimiento de solasodina [5].

Para evitar la generación de residuos peligrosos al medio ambiente, y superar el inconveniente del alto costo de la obtención de solasodina vía hidrólisis enzimática homogénea, se ha planteado como alternativa, la hidrólisis enzimática heterogénea que permite la reutilización de enzimas inmovilizadas sobre un soporte apropiado, a bajo costo. La enzima β -glucosidasa inmovilizada.

5.2.EXPERIMENTAL

5.2.1. METODOLOGÍA - PROCEDIMIENTO

La investigación planteada es experimental: se analizará el comportamiento de la variable respuesta (eficiencia de hidrólisis enzimática, medida en porcentaje) bajo condiciones controladas de laboratorio.

5.2.1.1. Reactivos Químicos

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico. Celobiosa, β -glucosidasa inmovilizada sobre NPM-CoFe₂O₄, hidróxido de sodio 98%, ácido acético 99,5%, ácido

sulfúrico 98%, se compraron a Panreac; fosfato disodico dibásico 99%, etanol 98% se adquirieron a Merck; fosfato de potasio monobásico 99% se obtuvo de J.T. Baker. Todas las soluciones se prepararon con agua tipo I obtenida de un Q-millipore de conductividad 0,05 μs .

5.2.1.2. Fase 1. Hidrólisis enzimática de solasonina para la obtención de solasodina

Obtención del extracto crudo de solasonina a partir de la especie “Solanum marginatum”.

Esta etapa fue llevada en fase húmeda, ya que permite obtener el mayor rendimiento de solasonina, prácticamente toda precipita en forma de sedimento. Este procedimiento ha sido desarrollado y aplicado en el grupo de investigación QUIMOL de la UPTC por Rozo et al., 2012 [65].

Recolección y preparación de la muestra: Se recolectaron muestras de 1 Kg de los frutos de “jaboncillo” en condiciones óptimas de sanidad y estado de madurez intermedio, obtenido de la vereda el Jazminal en Paipa-Boyacá. Los frutos fueron lavados con agua destilada y cortados a la mitad, se adicionó 2 litros de agua destilada, se guardó la mezcla a temperatura ambiente por 6 días. Transcurrido el tiempo, la pulpa fue separada de las semillas y de la cáscara por maceración y filtración.

Autolisis (acción de levaduras y enzimas del fruto): El filtrado del paso anterior se le adicionó agua destilada en proporción 1:1 v/v y se dejó fermentar durante 7 días, transcurrido este tiempo hubo formación de dos fases: la superior líquida se descartó, se conservó la fase inferior constituida por un sedimento de carácter coloidal que es donde está presente la solasonina parcialmente hidrolizada, se acidificó mantuvo a pH 4,5 para evitar formación de hongos y se mantuvo en refrigeración hasta realizar la hidrólisis ácida y enzimática.

Hidrólisis enzimática: Se evaluó sobre el producto de autolisis. De acuerdo a las condiciones establecidas en el capítulo II, para la hidrólisis enzimática de celobiosa con β -glucosidasa inmovilizada sobre NPM-G, se trabajó con enzima β -glucosidasa de concentración 5,7E-5M inmovilizada en 200 mg de NPM-G. Para realizar la aplicación en extractos de solasonina, se tomaron 5 fracciones de 200 ml, de extractos obtenidos en la fase de autolisis, se adicionó 1,5 g de NPM-G-BGL que contenía β -glucosidasa de concentración 5,7E-5M, la mezcla se ajustó a pH 4,5 con buffer acetato de sodio y se llevó a incubación a 60 °C durante 15 horas. En paralelo se realizó la hidrólisis ácida [65] y se contrastaron los resultados, en la figura 5.1 se observa la acción catalítica de la enzima β -glucosidasa.

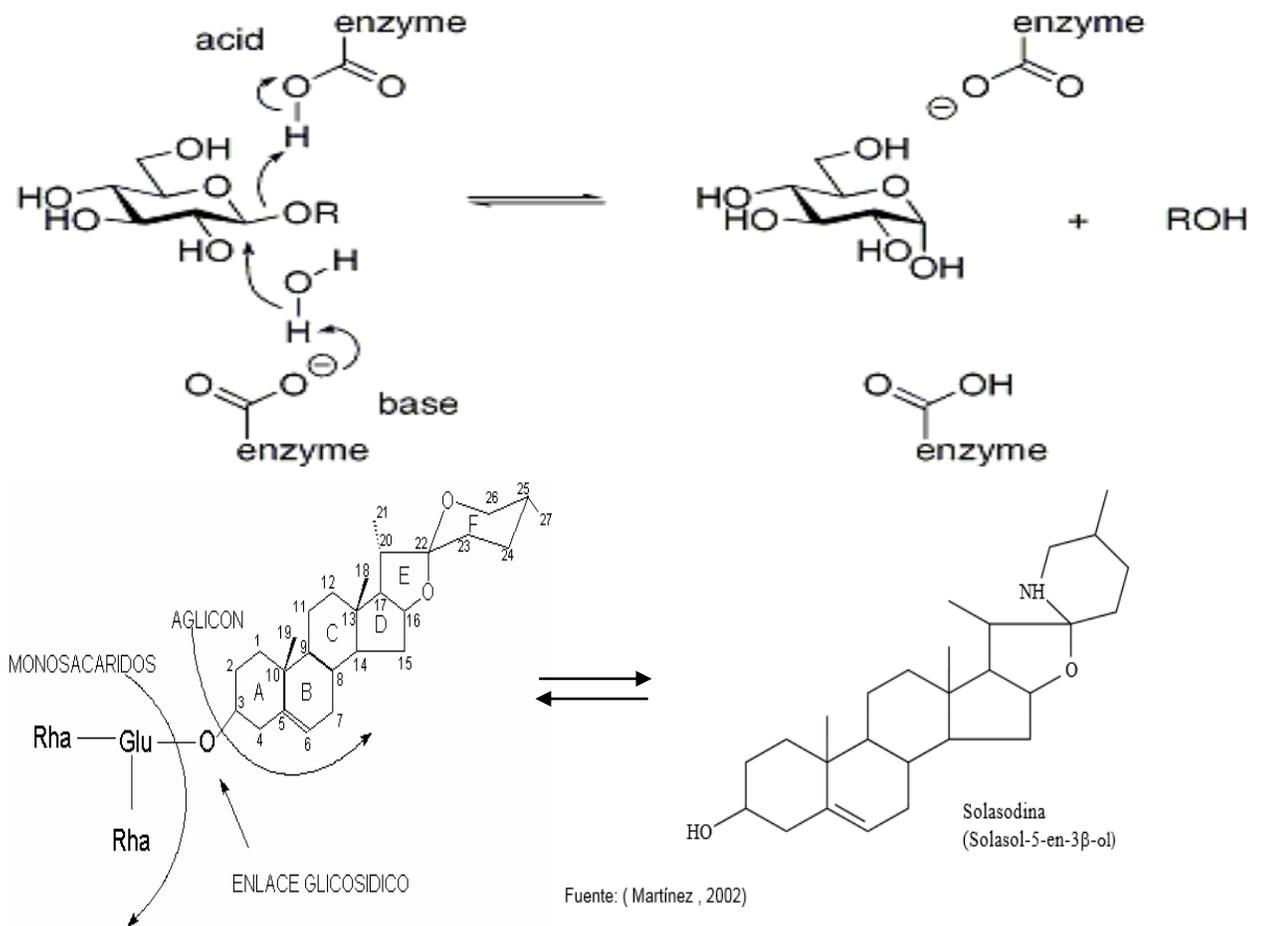


Figura 5.1. Acción catalítica de la enzima β -glucosidasa

Hidrólisis ácida. Llevada a cabo con H_2SO_4 3M en proporción 1:1 v/v con respecto a la fase coloidal obtenida del proceso de autólisis, se llevó a reflujo durante 4 horas. Se dejó enfriar, se filtró, obteniendo una torta, la cual fue neutralizada con CaCO_3 al 15% y lavada con agua destilada hasta fin de acidez. El ácido filtrado se valoró y uso en posteriores hidrólisis.

Extracción sólido-líquido. Según el proceder descrito por Sanabria 1980. La torta obtenida de la fase de hidrólisis enzimática y ácida, se llevó a secado a $50^\circ\text{C}/7$ horas, se molió y se extrajo a reflujo por una hora con una mezcla de EtOH al 96% y ácido acético concentrado en relación 95:5 v/v. El proceso fue repetido cinco veces más, llevando a reflujo media hora en cada ciclo. Se unieron los extractos y se concentraron a presión reducida. A la torta producto de descarte se evaluó la presencia de alcaloides por medio del reactivo de Meyer.

Disolución-precipitación. El extracto concentrado de la fase anterior se disolvió en ácido acético al 5%, se calentó a $80^\circ\text{C}/30\text{min}$. y se filtró en caliente. Este proceso fue repetido 6 veces hasta máximo agotamiento. A la torta de esta fase se verificó la presencia de alcaloides

por medio del reactivo de Mayer. La torta fue descartada. Los extractos fueron alcalinizados hasta pH 11 con NaOH al 10%, produciéndose la precipitación de la solasodina, la cual fue separada por filtración, lavada con agua destilada para eliminar residuos de NaOH, finalmente fue secada a 60°C/4h. Se obtuvo un polvo blanquecino. Se hizo seguimiento de la pureza de la solasodina por cromatografía en capa fina en sílica gel, usando como fase eluyente CH₂Cl₂.MeOH 95:5 v/v, revelado con H₂SO₄ al 50%. Se calentó a 90°C/3min. Se observó la presencia de manchas bajo la luz ultravioleta.

Cristalización de solasodina: antes de la cristalización, el polvo obtenido se desengrasa con éter de petróleo. La cristalización se llevó a cabo en etanol caliente. Se caracterizó mediante punto de fusión, índice de retención mediante cromatografía de capa fina (CCF) espectroscopía infra-roja (IR-ATR), difracción de rayos X (DRX) y cromatografía de gases acoplado a masa (GC-MSD). Se determinó grado de pureza, se evaluó rendimiento y se contrastó frente al método de extracción tradicional sugerido por Sanabria 1980, con algunas modificaciones.

5.3. RESULTADOS Y ANALISIS

5.3.1. Obtención del extracto crudo de saponinas a partir de la especie “*Solanum marginatum*”.

Este proceso de extracción es llevado a cabo en fase húmeda. Se recolectaron 5 muestras de 1 Kg c/u de frutos semimaduros de *Solanum marginatum*. Los frutos fueron lavados con agua destilada y se retiró todo material extraño y cortados a la mitad (imagen 5.1).





Imagen 5.1. Frutos de *Solanum marginatum* y proceso de autólisis.

Durante el proceso de autólisis se monitoreó la variación de pH, el cual para evitar la aparición de hongos, no debe ser inferior a pH 4,5. En la figura 5.2, se presentan este comportamiento. Se observa que los valores de pH bajaron en promedio de pH 5,65 en el día 1, hasta pH 4,52 al día 12 de autólisis.

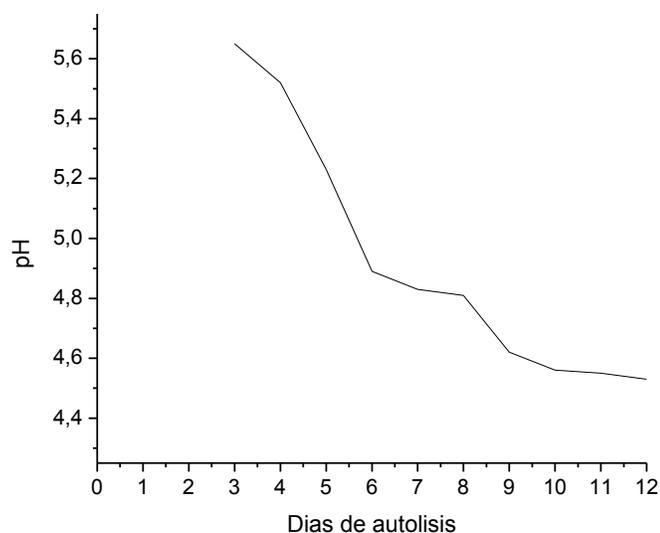


Figura 5.2. Variación de pH de frutos de *Solanum marginatum* en el proceso de autólisis.

En la imagen 5.2 se distingue claramente la formación de tres fases de los frutos sometidos al proceso de autólisis. La fase superior e inferior se descartó. Se conservó la fase intermedia constituida por un sedimento de carácter coloidal, que es donde se encuentra la solasonina parcialmente hidrolizada por acción de levaduras y enzimas del fruto, se obtuvo un volumen de 800 ml, de los cuales se dividieron en dos fracciones de 400 ml para realizar el proceso de hidrólisis enzimática y acida.



Imagen 5.2. Proceso de autólisis de frutos de *Solanum marginatum*.

Se determinó el porcentaje de pulpa, semillas, cáscara y humedad del fruto: la pulpa donde se encuentra la solasonina en forma de glicoalcaloide presentó el mayor porcentaje $77,25 \pm 2\%$, as semillas presentaron un $20,04 \pm 1,3\%$, la cáscara $2,71 \pm 0,7\%$ y un porcentaje de humedad de $46,61 \pm 0,81 \%$.

5.3.1.1. Hidrólisis de extractos de solasonina y extracción sólido-líquido

El proceso de hidrólisis enzimática con β -glucosidasa inmovilizada sobre NPM-G, género una torta café oscuro (imagen 5.3, izquierda), se filtró y seco, se obtuvo una torta con un peso de 18,05 g, representando un rendimiento de $22,56 \pm 2,3\%$ en base seca. La extracción sólido-líquido de esta torta extraída a reflujo con una mezcla de EtOH al 96% y ácido acético concentrado en relación 95:5 v/v, requirió seis repeticiones, hasta que la prueba de Mayer aplicada a la torta dio negativo para alcaloides. Esta prueba precipita los alcaloides en medio ácido de color blanco opalescente, poco solubles en exceso de reactivo y completamente solubles en alcohol. La fase orgánica fue concentrada al vacío, obteniendo un producto de color café claro (imagen 5.3, derecha) con un peso de 12,3 g, representando un rendimiento de $4,92 \pm 0,3\%$ en base seca.



Imagen 5.3. Torta obtenida de proceso de hidrólisis enzimática (izquierda) y extracción etanol-ácido acético (derecha).

5.3.1.2. Disolución-precipitación

El extracto anterior 12,3 g se disolvieron en ácido acético al 5%, se calentó a 80°C/30min. y se filtró en caliente, este proceso fue repetido 6 veces. A la torta de esta fase se verificó la presencia de alcaloides por medio del reactivo de Mayer, dando negativo en la sexta extracción. La torta fue descartada. Los extractos fueron alcalinizados hasta pH 11 con NaOH al 10%, produciéndose la precipitación de la solasodina (imagen 5.4), la cual fue separada por filtración, lavada con agua destilada para eliminar residuos de NaOH, finalmente fue secada a 60°C/4h. Se obtuvo 1,93 g de un polvo blanquecino, correspondiente a la solasodina, el rendimiento obtenido fue $2,41 \pm 0,4$ % en base seca.



Imagen 5.4. Precipitación de la solasodina.

Con el proceso de disolución-precipitación se obtiene solasodina de un alto grado de pureza, ya que al llevar la solasodina a pH básico, se logra la precipitación de esta en forma casi pura. Se hizo seguimiento de la pureza por cromatografía en capa fina en sílica gel, usando como fase eluyente CH_2Cl_2 .MeOH 95:5 v/v, revelado con H_2SO_4 al 50%. Se calentó a 90°C/3min. En la imagen 5.5, se observan cinco placas cromatográficas, estas corresponden al seguimiento del proceso de extracción y purificación de la solasodina. La placa 1 corresponde al primer extracto alcohólico realizado a la torta, en esta placa no hubo una separación de la solasodina, hay presencia de impurezas. Cuando se realiza la disolución con ácido acético y alcohol hay una separación de la solasodina (mancha púrpura), pero aún hay impurezas (placa 2); la placa tres corresponde a una segunda disolución y desengrase, las solasodina empieza a separarse mejor; la placa 4, indica una cuarta disolución de la solasodina y la placa 5, corresponde a la cristalización de la solasodina, las impurezas se removieron en su mayoría y se distingue claramente una mancha grande purpura de la solasodina y una más pequeña correspondiente al alcaloide 3,5-solasodieno [66]. El índice

de retención (Rf) obtenido fue 2,10, contrastado con el valor del patrón de solasodina de Rf 2,09.

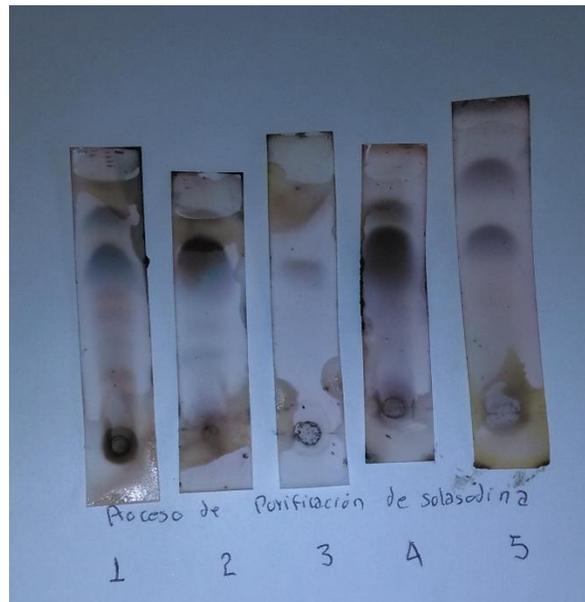


Imagen 5.5. Seguimiento por cromatografía de capa fina del proceso de purificación de solasodina.

5.3.1.3. Cristalización-caracterización

Antes de la cristalización el producto de la fase anterior 1,93 g fue desengrasado en sistema soxhlet por dos horas, usando éter de petróleo como solvente. El sólido fue secado a 60°C/2h. Se obtuvo un producto en polvo color blanco (imagen 5.6 derecha), el cual fue cristalizado en EtOH. La imagen 5.6 (izquierda), corresponde al seguimiento por CCF de la solasodina cristalizada, finalmente se obtuvo 1,44 g de solasodina, representando un rendimiento de $1,8 \pm 0,3\%$. El análisis por CCF indicó la presencia de dos manchas, la primera de color fucsia, correspondiente a la solasodina, con índice de retención de Rf 2,04 y punto de fusión 201°C. La segunda mancha de menor tamaño, con Rf de 2,8, puede tratarse del 3,5-solasodieno, compuesto que normalmente se produce por deshidratación de la solasodina en el proceso de hidrólisis [66].

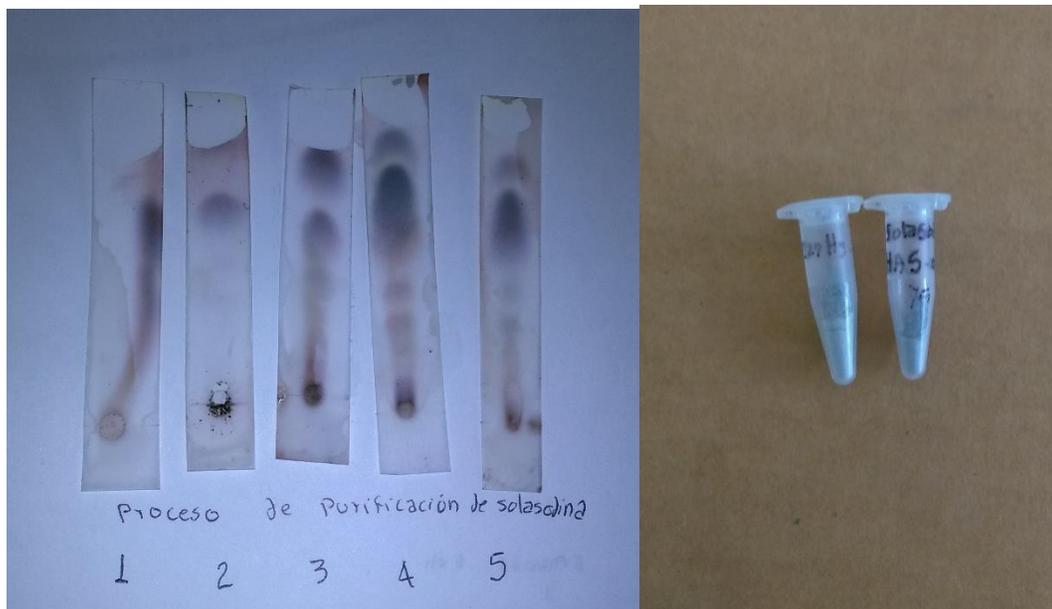


Imagen 5.6. Seguimiento por CCF del proceso de cristalización de solasodina (izquierda) y solasodina pura obtenida (derecha).

En paralelo, bajo similares condiciones se realizó la extracción de solasodina vía hidrólisis ácida con H_2SO_4 3N. En la tabla 5.1, se resume la composición de los frutos de semimaduros de *Solanum marginatum*, los rendimientos y el porcentaje de pureza de solasodina extraída vía enzimática y ácida en el proceso. Se observa que el rendimiento y pureza de solasodina vía hidrólisis ácida fueron mayores, sin embargo, la extracción enzimática es un método amigable con el entorno natural, además el sistema enzimático NPM-G-BGL puede ser usado hasta por diez ciclo manteniendo el 52 % de actividad enzimática. La pureza de la solasodina obtenida se encuentra dentro de la pureza requerida para la síntesis de fármacos, la cual requiere una pureza mínima del 85% [3].

Tabla 5.1. Composición de frutos semimaduros de *Solanum marginatum* y rendimiento de solasodina determinada en base seca.

Componentes del fruto		Contenido (%)
Pulpa		77,25 ± 2
Semillas seca		20,04 ± 1,3
Cáscara seca		2,71 ± 0,7
Humedad		46,61 ± 0,81 %
Hidrólisis	Rto. solasodina en base seca (%)	Pureza solasodina (%)
β -glucosidasa-NPM-G	1,8 ± 0,3	89,4 ± 3
Ácida: H_2SO_4	2,5 ± 0,2	91,2 ± 4

Los rendimientos reportados de solasodina en frutos de *Solanum marginatum* oscilan del 0,7 y 2,3% en peso seco en los frutos y entre 0,1 a 0,5% en la hojas (Pérez et al., 1964). El porcentaje de rendimiento obtenido vía hidrólisis ácida fue mayor (2,5%), por vía enzimática se obtuvo un $1,8 \pm 0,3\%$ de rendimiento, estos valores son superiores a la media reportado en bibliografía. Estos altos rendimientos obedecen a la modificación del proceso de extracción que se realizó. Como métodos de referencia se siguió el proceder de Sanabria 1980 [67] (anexo 4) y Rozo et al., 2012 [65], de estos dos procesos se unieron pasos y se generó un proceso que requiere menos cantidad de solventes, se fundamenta en extracción por reacciones químicas y resulta un proceso más corto, económico, más eficiente y amigable con el entorno natural. En la figura 5.3 se representa el proceso de extracción tradicional de saponinas en base húmeda realizado por Rozo et al., 2012 [65].

La diferencia del proceso de extracción en base seca y húmeda, radica en que en el primer caso el material vegetal es secado, desengrasado y se extrae el alcaloide antes de ser hidrolizado, estos pasos hacen más largo el proceso de extracción, arrastra impurezas y colorantes, debido a que en la extracción sólido-líquido con etanol, se extrae además colorantes y otras impurezas, pues el etanol no es selectivo para extracción alcaloides y saponinas, ocasionando que se requiera procesos subsecuentes de purificación. A diferencia la extracción vía húmeda, representado en la figura 5.3, es más corta, amigable con el entorno y eficiente en el proceso de extracción alcaloidal y de saponinas. Por acción de las levaduras y enzimas del material vegetal, al realizar un proceso inicial de autólisis, se logra una hidrólisis parcial del compuesto de interés, el cual se sedimenta en forma coloidal, fácil de separar y la mayoría de impurezas quedan en la fase acuosa.

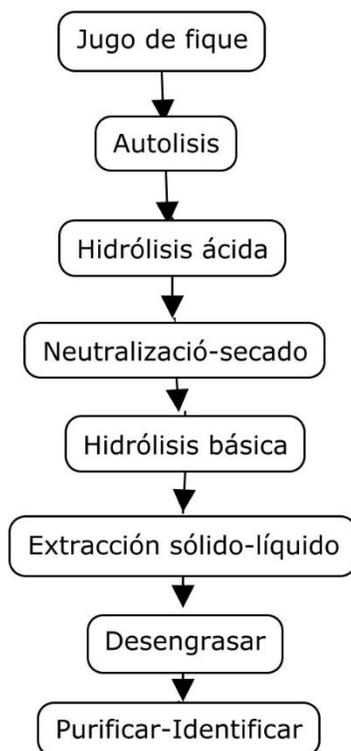


Figura 5.3. Extracción de saponinas en base húmeda.

El método modificado para extracción de alcaloides, específicamente solasodina, es detallado en la figura 5.4. Este proceso de extracción se fundamenta formación de sales de acetato de solasodina de carácter alcalino, solubles en etanol y ácido acético. Se tuvo como referencia el proceso de extracción tradicional de alcaloides y el proceso en base húmeda de la figura 5.3. Se modificó el orden del proceso y mezcla ácida de solvente (etanol-ácido acético). Como se detalla, la fase de hidrólisis básica se eliminó y se incorporó fase fases de disolución y extracción con mezcla de etanol- ácido acético 95:5 v/v.

La etapa del desengrase es previa a la cristalización, siendo una ventaja al permitir el ahorro de éter de petróleo, debido a que el producto está concentrado y la mayoría de las impurezas fueron separadas por acción del etanol- ácido acético, como ya se mencionó este forma sales de acetato de solasodina, soluble en medio ácido y por filtración se separan el residuo sólido que contiene las impurezas, el líquido se alcaliniza a pH 11 permitiendo la precipitación de la solasodina casi pura; en cada etapa del proceso se realizó prueba cualitativa para alcaloides con el reactivo de Meyer. Este método modificado no requiere empleo de cromatografía en columna para purificación y raras veces procesos de recristalización.

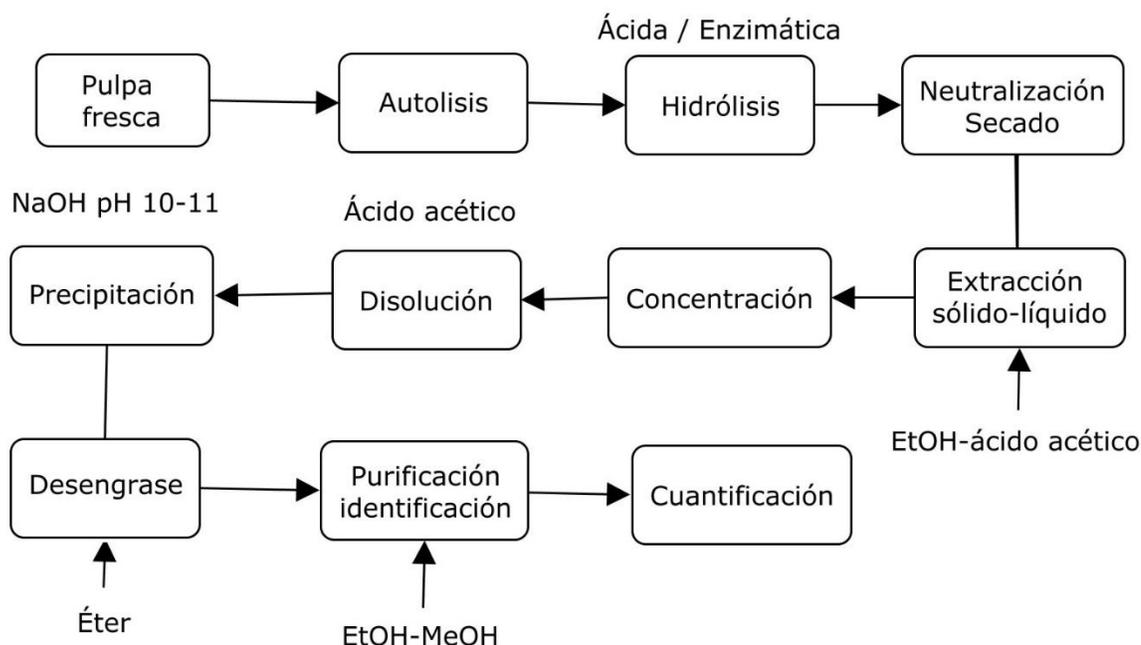


Figura 5.4. Modificación de proceso de extracción de alcaloides, base húmeda.

5.3.2. Caracterización de solasodina

A la solasodina extraída vía hidrólisis enzimática y ácida se les determinó el punto de fusión y R_f , la tabla 5.2 resume los resultados de las constantes físicas de la solasodina, comparada con los datos reportados por la literatura. Los valores de punto de fusión para la extracción ácida fue mayor, comparado con la solasodina extraída por el método bionanoestructurado. Los valores determinados son similares a los reportados en la literatura.

Tabla 5.2. Constantes físicas de la solasodina extraída de frutos la especie *Solanum marginatum*.

Constante física	Solasodina extraída		Std. Solasodina [68], [69]
	<i>NPM-G-BGL</i>	<i>H₂SO₄</i>	
$p.f$ °C	200-202	201-203	203-205
$[\alpha] D^{20}$	-87 (metanol)	-88 (metanol)	-90 (metanol)

El análisis por FT-IR en las figuras 5.5-5.6, permitió identificar las señales características de la solasodina extraída vía enzimática y ácida respectivamente. Se presentaron señales a 3304 cm^{-1} tensión de OH, 3246 cm^{-1} tensión de NH, $2931\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ tensión CH, 1703 cm^{-1} flexión OH, 1570 cm^{-1} flexión NH, 1409 cm^{-1} flexión CH, 1068 cm^{-1} flexión CN, y 1030 cm^{-1} flexión CO. La señal presentada a $2931\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a la tensión CH, fue menos intensa en la solasodina extraída vía hidrólisis con β -glucosidasa, pero su flexión hacia 1462

cm^{-1} es similar en intensidad en los dos espectros, indicando que se trata del mismo compuesto.

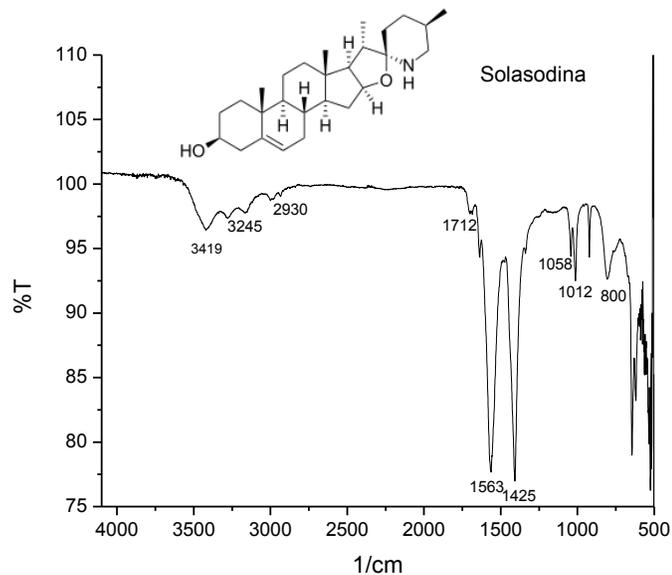


Figura 5.5. Espectro FT-IR correspondiente a la solasodina extraída por hidrólisis con β -glucosidasa inmovilizada sobre NPM-G.

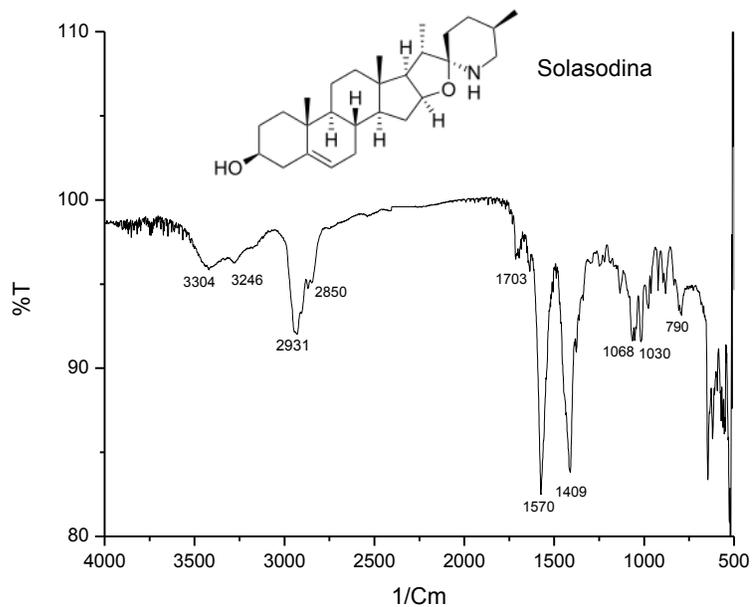


Figura 5.6. Espectro FT-IR correspondiente a la solasodina extraída por hidrólisis ácida

El análisis por GC-MSD permitió establecer que el producto obtenido corresponde a la solasodina, el análisis como se observa en la figura 5.7-5.8, indicó que el producto presento un peso molecular de 413,0 y 413,4 g/mol, frente al valor teórico de peso molecular de la solasodina de 413,6 g/mol.

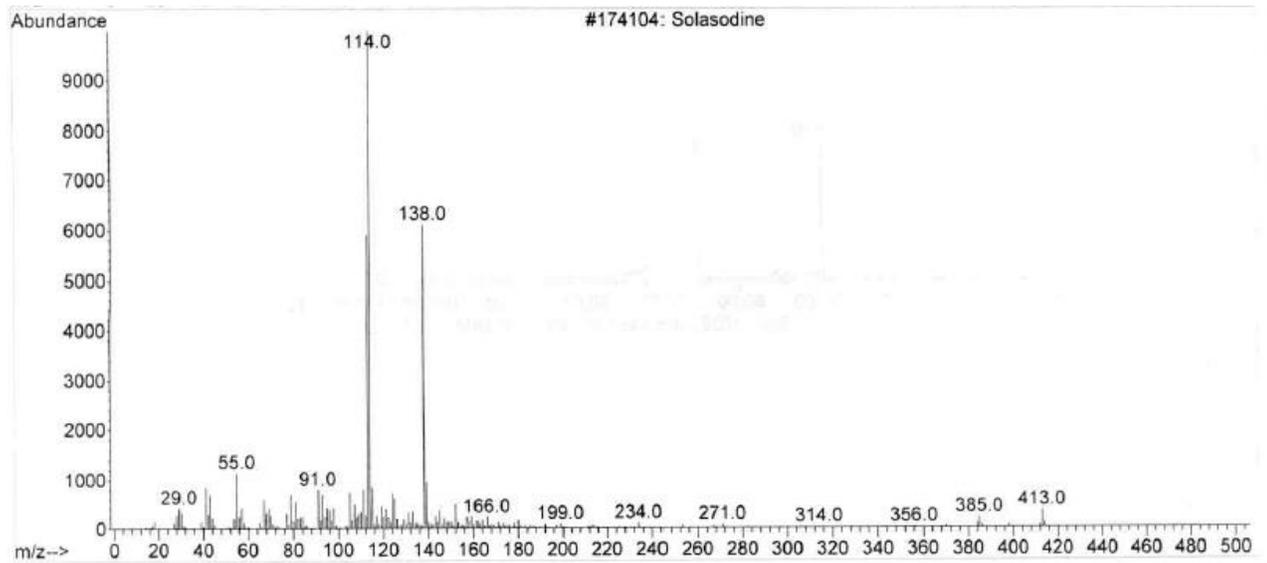


Figura 5.7. Cromatograma GC-MSD de solasodina extraída de *Solanum marginatum* via hidrolisis con β -glucosidasa inmovilizada sobre NPM-G.

El peso molecular determinado de la solasodina extraída vía hidrólisis ácida fue mayor que la extraída enzimáticamente. Lo cual se relaciona con la pureza del producto, en el primer caso fue de $91,2 \pm 4\%$ y $89,4 \pm 3\%$.

Library Searched : D:\Database\NIST05.L
Quality : 95
ID : Solasodine

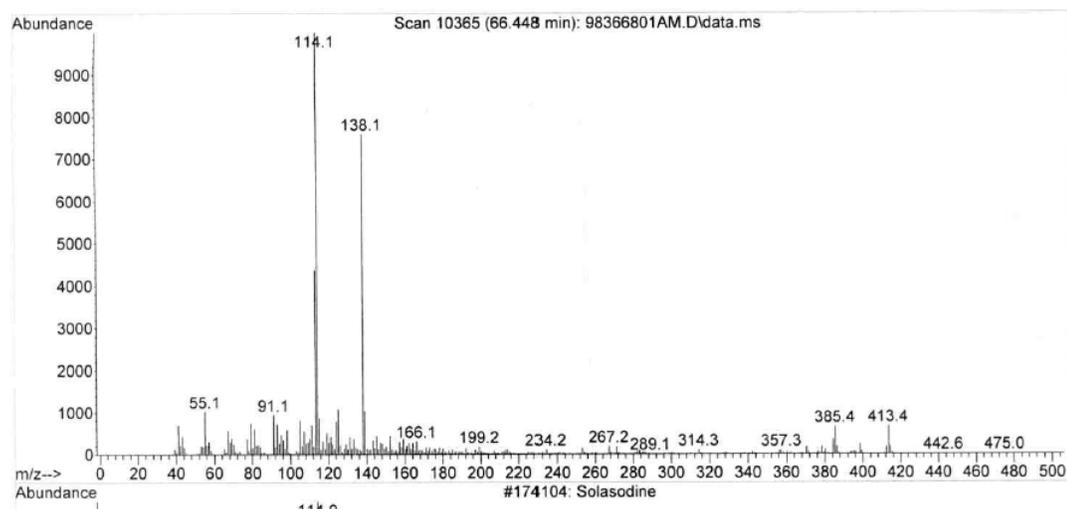


Figura 5.8. Cromatograma GC-MSD de solasodina extraída de *Solanum marginatum* via hidrólisis ácida.

6. CONCLUSIONES GENERALES

La síntesis de NPM-CoFe₂O₄ por el método poliol empleando etilenglicol como medio de reacción permitió obtener NPM de hierro y cobalto en proporción Co₄₀Fe₆₀, con rendimiento $13,2 \pm 0,32$ y atracción magnética alta. Estas NPM fueron caracterizadas y sobre estas se optimizó el proceso de inmovilización usando la enzima bromelina extraída de la piña, para confirmar que la actividad de la enzima se mantuvo con este método. También se sintetizaron proporciones de Co₅₀Fe₅₀ y Co₂₀Fe₈₀, pero el rendimiento fue inferior: $10,5 \pm 0,28$ y $9,8 \pm 0,25$ respectivamente y atracción magnética media.

Las NPM-CoFe₂O₄ en relación Co₄₀Fe₆₀ sintetizadas, presentaron una morfología ovalada con un diámetro promedio de $17,37 \pm 2,02$ nm, presentaron una saturación de magnetización de 33,7 emu/g. La morfología de la β -glucosidasa inmovilizada sobre las NPM-G no se vio afectada, el tamaño aumentó de $17,37 \pm 2,02$ a $25,68 \pm 4,02$ nm, este aumento puede ser debido al recubrimiento de la NPM, con glutaraldehído y a la enzima β -glucosidasa unida covalentemente a éste.

La enzima β -glucosidasa fue inmovilizada en un sistema bionanoestructurado reciclable usando como soporte NPM de CoFe₂O₄ activadas con glutaraldehído. Se evaluaron cuatro tipos de inmovilización. La β -glucosidasa tipo A y C, presentaron la mayor eficiencia de inmovilización de $84,6 \pm 2,1\%$ y $75 \pm 2,4\%$. La actividad catalítica de la enzima libre e inmovilizada fue determinada en $95 \pm 2,6$ y $87 \pm 2,8\%$ respectivamente. La inmovilización tipo B y D presentaron los porcentajes de inmovilización más bajos con $60 \pm 3,5$ y $25 \pm 2,4\%$ respectivamente. El sistema fue optimizado bajo las siguientes condiciones: 200 mg de NPM, glutaraldehído 1M, β -glucosidasa $5,7E-5M$, tiempo de inmovilización 16 horas a 60 °C. A diferencia de la enzima bromelina se inmovilizó sobre NPM-CoFe₂O₄ recubiertas de quitosano y funcionalizado con glutaraldehído. El sistema fue evaluado en caseína usada como sustrato. La bromelina inmovilizada mantuvo una actividad catalítica de $87 \pm 2\%$. La K_M y V_{MAX} fueron mayores en la enzima libre, y fue requerido un 16,6% más de enzima inmovilizada para alcanzar la misma actividad catalítica de la enzima libre. Sin embargo esta diferencia es superada por la bromelina inmovilizada al lograr ser reutilizada durante cinco ciclos; la cual después del segundo ciclo mantiene una actividad del 87%, y en el quinto ciclo aún mantiene el 50% de su actividad, decreciendo a 2,4% en su noveno ciclo.

El sistema fue evaluado en celobiosa usada como sustrato. La K_M y V_{MAX} fueron mayores en la enzima libre, y fue requerido un 11,9% más de enzima inmovilizada para alcanzar la misma actividad catalítica de la enzima libre. Sin embargo esta diferencia es superada por la β -glucosidasa inmovilizada al lograr ser reutilizada durante diez ciclos; la cual después del segundo ciclo mantiene una actividad del $98 \pm 1,6\%$, y en el décimo ciclo aún mantiene el

52 ± 2,5% de su actividad, decreciendo a 17,6 ± 2,1% en su ciclo 15. Al evaluar el reciclaje de la β-glucosidasa inmovilizada, aplicado a extractos de solasonina proveniente de frutos semimaduro de *Solanum marginatum*, se determinó que en el ciclo 6, la enzima inmovilizada mantiene el 75% de su actividad catalítica. En los 15 ciclos de uso de la β-glucosidasa inmovilizada la pérdida de actividad enzimática fue determinada en 2,6 ± 0,25% evaluada en sustrato de celobiosa y una pérdida de actividad de 2,5 ± 0,3% evaluado en sustrato de extracto de solasonina.

Como aporte, se realizó la caracterización por técnicas voltamperométricas aún no reportadas en la literatura, de las NPM-CoFe₂O₄ y de la β-glucosidasa inmovilizada sobre NPM-G. La caracterización por las técnicas de voltametría de onda cuadrada (VOC) y voltametría cíclica (VC), permitieron evaluar el comportamiento electroactivo de estas nanoestructuras. Los potenciales de oxidación fueron establecidos en -1090 ± 5mV para las NPM-CoFe₂O₄ y -1260 ± 6mV para la β-glucosidasa inmovilizada. En este último caso la actividad electroactiva cae a cero cuando el proceso de inmovilización es llevado a cabo en las condiciones optimizadas, convirtiéndose en una herramienta analítica para hacer seguimiento en este tipo de procesos.

Se aisló solasodina de los frutos semimaduros de *Solanum marginatum*, al comparar los espectros obtenidos para su caracterización, los puntos de fusión, se confirmó que el compuesto extraído corresponde a la solasodina, la cual presentó un rendimiento de 1,8-2,5% y pureza de 89,2-91,3%. Siendo mayor cuando se realiza la extracción vía hidrólisis ácida. Pero la enzima β-glucosidasa inmovilizada sobre NPM-G puede ser reutilizada hasta por diez ciclos manteniendo el 52% de actividad catalítica.

El proceso de extracción de solasonina fue modificado. Se logró tomando como base el proceso de extracción tradicional de alcaloides en base seca y el método tradicional para extracción de saponinas en fase húmeda. El método de extracción generado se fundamenta en la formación de sales de acetato de solasodina de carácter alcalino, solubles en etanol y ácido acético. Se eliminó algunas fases, se incorporó y modificó el orden del proceso. El método modificado es más corto y sencillo, permite extraer de 1,8-2,5% solasodina, valor superior a los métodos tradicionales de extracción, además reduce el uso de solvente haciéndolo amigable con el entorno natural.

REFERENCIAS

- [1] Zappino, M., Cacciotti, I., Benucci, I., Nanni, F., Liburdi, K., “Bromelain immobilization on microbial and animal source chitosan films, plasticized with glycerol, for application in wine-like medium: Microstructural, mechanical and catalytic characterisations,” *Food Hydrocoll.*, vol. 45, pp. 41–47, 2015.
- [2] L. M. Granados Castellanos, “Caracterización de la cadena de valor para la extracción de hecogenina a partir de jugo de fíque en el departamento de Boyacá,” Universidad Javeriana, Bogota, 2010.
- [3] J. D. Mann, “Production of Solasodine for the Pharmaceutical Industry,” *Adv. Agron.*, vol. 30, no. C, pp. 207–245, 1979.
- [4] Y. Alvarez Q, R.M., Villa V, José A., Martínez M, Alejandro., y Fujimoto, “Obtención de 16-dehidroprogesterona a partir de solasodina de frutos maduros de *Solanum mammosum*,” *Rev. Vitae*, vol. 7, p. 11, 2000.
- [5] A. Sanabria Galindo, “Alcaloides del *Solanum marginatum*. Extracción de solasodina y contenido de la misma en tres estados de madurez de los frutos,” *Rev. Colomb. ciencias Químico-Farmacéuticas*, p. 7, 1980.
- [6] K. Schreiber, “*The Alkaloids Chemistry and Physiology*,” vol. 10. 1968.
- [7] H. Ripperger, “Steroid alkaloid glycosides from *Solanum robustum*,” *Phytochemistry*, vol. 39, no. 6, pp. 1475–1477, 1995.
- [8] M. Indrayanto, G., Syahrani, A., Sondakh, R., & Santosa, *Solasodine. En Analytical profiles of drug substances and excipients.*, New Jersey, 1996.
- [9] J. E. Perez-Medina, L. A., Travededo, E., and Devia, “Glycoalkaloids in Columbian Solanaceae,” *Planta Med.*, vol. 4, pp. 478–487, 1964.
- [10] M. A. Martínez, “Saponinas esteroides,” *Rev. Univ. Antioquia.*, p. Recuperado en octubre 6, 2015, de <http://farmacia.>, 2001.
- [11] L. Rodríguez Mayor, “Hidrolisis de celobiosa con b-glucosidasa inmovilizada,” *Tesis Dr. en ciencias químicas*, p. 276, 1991.
- [12] P. Zheng, J. Wang, C. Lu, Y. Xu, and Z. Sun, “Immobilized of b-glucosidase on magnetic chitosan microspheres for hydrolysis of straw cellulose,” *Process Biochem.*, vol. 48, no. 4, pp. 683–687, 2013.
- [13] V. Madan L, R. Chaudhary, T. Tsuzuki, C. J. Barrow, and M. Puri, “Immobilization of b-glucosidase on a magnetic nanoparticle improves thermostability: Application in cellobiose hydrolysis,” *Bioresour. Technol.*, vol. 135, pp. 2–6, 2013.
- [14] S. W. Jung, Y.R., Shin, H.Y., Song, Y.S., Kim, S.B., Kim, “Enhancement of immobilized enzyme activity by pretreatment of b-glucosidase with cellobiose and glucose,” *J. Ind. Eng. Chem.*, vol. 18, p. 702–706., 2011.
- [15] H. J. Cho, E.J., Jung, S., Kim, H.J., Lee, Y.G., Nam, K.C., Lee, H.J., Bae, “Coimmobilization of three cellulases on Au-doped magnetic silica nanoparticles for the degradation of cellulose,” *Chem. Commun.*, vol. 48 (6), p. 886–888., 2012.
- [16] R. L. Juang, R.S., Wu, F.C., & Tseng, “Use of chemically modified chitosan beads for sorption and enzyme immobilization,” *Adv. Environ.*, vol. 6, pp. 171–177, 2002.
- [17] A. J. Johnson, A.K., Zawadzka, A.M., Deobald, L.A., Crawford, R.L., & Paszczynski, “Novel method for immobilization of enzymes to magnetic nanoparticles,” *J*

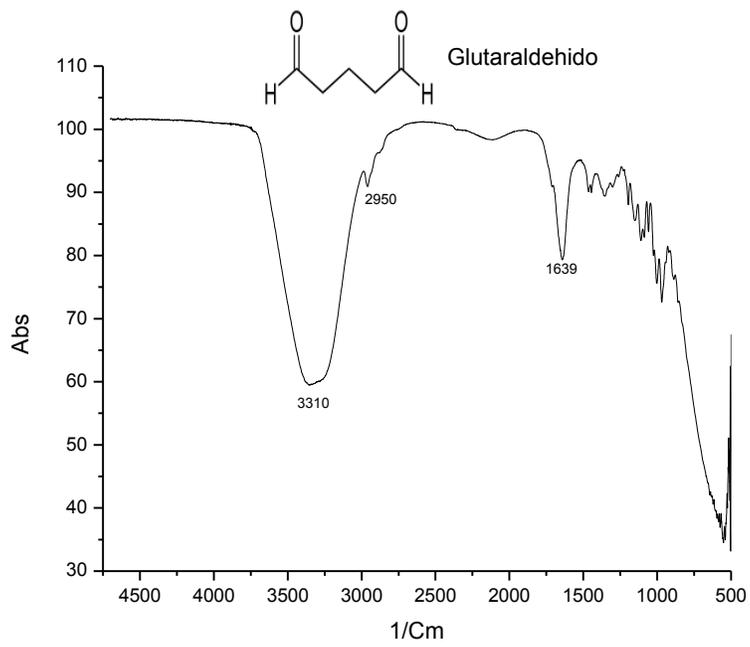
- Nanopart Res.*, vol. 10, pp. 1009–1025, 2008.
- [18] A. Konwarh, R., Karak, N., Rai, S.K., & Mukherjee, “Polymer-assisted iron oxide magnetic nanoparticle immobilized keratinase.,” *Nanotechnology*, vol. 20, p. 225–235., 2009.
- [19] J. L. Bruno, L.M., Coelho, J.S., Melo, E.H.M., & Lima-Filho, “Characterization of *Mucor miehei* lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic particles.,” *World J Microb Biotechnol*, vol. 21, p. 189–192., 2005.
- [20] J. M. Gomez-Hens, A., Fernandez-Romero, “Analytical methods for the control of liposomal delivery systems.,” *Trends Anal Chem*, vol. 25:, p. 167–178., 2006.
- [21] Jeong, S., Shin, S., Lee and J. Kim, “Magnetic properties of superparamagnetic γ -Fe₂O₃ nanoparticles prepared by coprecipitation technique,” *J Magn Magn Mater*, vol. 286, pp. 5–9, 2005.
- [22] R. I. Mrzljak, “On-line monitoring of cobalt in zinc plant electrolyte by diferential pulse adsortive stripping voltammetry,” *Anlal. Chem*, vol. 281, pp. 281–290, 1993.
- [23] J. Urbanska, J., Biernal, “Polarographic determination of cobalt (II) in prescence of nickel (II),” *Chem Anal*, vol. 30, pp. 33–37, 1985.
- [24] H. Chiriac, A. E. Moga, and G. C, “Preparation and characterization of Co, Fe y Co-Fe magnetic nanoparticles,” *Optoelectron. Adv. Mater.*, vol. 10, no. 12, pp. 3492–3496, 2008.
- [25] A. Bobrowski, “Polarographic methods for ultra-trace cobalt determination based on adsortive-catalytic effects in cobalt (II)-dioxime-nitrite systems,” *Anlal. Chem*, vol. 61, pp. 2178–2184, 1989.
- [26] T. Schmidt, “Polarographic cobalt determination in the prescence of high zinc concentrations.,” *Anlal. Chem*, vol. 330, pp. 712–713, 1988.
- [27] R. eiss, P. and Forrer, “Mean Magnetic Moments in bcc Fe–Co Alloys,” *Ann. Phys.*, vol. 10, pp. 12–279, 1929.
- [28] X. Pan, C., Hu, B., Li, W., Sun, Y., Ye, H., Zeng, “Novel and efficient method for immobilization and stabilization of b-Dgalactosidase by covalent attachment onto magnetic Fe₃O₄echitosan nanoparticles.,” *J Mol Catal B Enzym*, vol. 61, no. (3e4), p. 208–215., 2009.
- [29] H. Ma, Z., Guan., Y., Liu, “Synthesis and characterization of micron-sized monodisperse superparamagnetic polymer particles with amino groups.,” *J Polym Sci Part A Polym Chem*, vol. 43, no. 15, p. 3433–3339., 2005.
- [30] R. V. I. M. Flores Gonzalez, M.A. Montiel, H. Gonzalez, “Primeras evidencias de la obtención de materiales nanométricos Fe-Co sintetizados mediante el método poliol,” *Supl. la Rev. Latinoam. Metal. y Mater.*, vol. 1, no. 3, pp. 913–917, 2009.
- [31] K. K. Kefeni, B. B. Mamba, and T. A. M. Msagati, “Magnetite and cobalt ferrite nanoparticles used as seeds for acid mine drainage treatment,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 333, pp. 308–318, 2017.
- [32] D. G. M. Margabandhu, S. Sendhilkathan, S. Senthilkumar, “Investigation of structural, morphological, magnetic properties and biomedical applications of Cu²⁺ substituted uncoated cobalt ferrite nanoparticles,” *Braz. Arch. Biol. Technol.*, vol. 59, pp. 1–10, 2016.
- [33] X. Guo, H. Li, and S. Zhao, “Fast degradation of Acid Orange II by bicarbonate-activated hydrogen peroxide with a magnetic S-modified CoFe₂O₄ catalyst,” *J.*

- Taiwan Inst. Chem. Eng.*, vol. 55, pp. 90–100, 2015.
- [34] C. D. Lokhande, S. S. Kulkarni, R. S. Mane, and S. H. Han, “Copper ferrite thin films: Single-step non-aqueous growth and properties,” *J. Cryst. Growth*, vol. 303, no. 2, pp. 387–390, 2007.
- [35] A. Lopez, S.A., Alatorre and F. C. Gutierrez, S., Ponce, C., and Walsh, “Electrochemical study of Co(II)/Co (III) on different electrode materials for energy storage in redox flow cells,” *Electrochem. Soc. Trans.*, vol. 20, pp. 237–247, 2009.
- [36] P. . Jegannathan, K.R.; Nielsen, “Environmental assessment of enzyme use in industrial production-a literature review.,” *J. Clean. Prod.*, vol. 42, pp. 228–240, 2013.
- [37] A. Care, A. Petroll, K. Gibson, E.S.Y. Bergquist, P. L. and Sunna, “Solid-binding peptides for immobilisation of thermostable enzymes to hydrolyse biomass polysaccharides.,” *Biotechnol. Biofuels*, vol. 10, pp. 1–16, 2017.
- [38] S. Sheldon, R.A. van Pelt, “Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how.,” *Chem Soc Rev.*, vol. 42, p. 6223–6235., 2013.
- [39] M. Ahmad, R. Sardar, “Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix.,” *Biochem Anal Biochem.*, vol. 4, pp. 178–185, 2015.
- [40] X. Hartmann, M. Kostrov, “Immobilization of enzymes on porous silicas-benefits and challenges.,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, pp. 6277–6289, 2013.
- [41] M. M. C. Cicolatti, E.P. Silva, M.J. Klein, M. Feddern, V. Feltes, “Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization.,” *J. Mol. Catal B Enzym.*, vol. 99, pp. 56–67, 2014.
- [42] Q. Akhtar, S., Khan, A.A., & Husain, “Potential of immobilized bitter melon (Momordica charantia) peroxidases in the decolorization and removal of textile dyes from polluted wastewater and dyeing effluents.,” *Chemosphere*, vol. 60, pp. 291–301, 2005.
- [43] Y. Issa, B. Obaidat, I.M. Albiss, B.A. and Haik, “Magnetic Nanoparticles: Surface Effects and Properties Related to Biomedicine Applications. Sciences.,” *Int. J. Mol.*, vol. 14(11), pp. 21266–21305, 2013.
- [44] T. R. Kolhatkar, A.G. Jamison, A.C. Litvinov, D. Willson, R.C. And Lee, “Tuning the Magnetic Properties of Nanoparticles.,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14(8), pp. 15977–16009, 2013.
- [45] X. Z. Chenliang Pan, Bing Hu, Wei Li, Yi Sun, Hong Ye, “Novel and efficient method for immobilization and stabilization of β galactosidase by covalent attachment onto magnetic Fe₃O₄-chitosan nanoparticles.,” *J Mol Catal B Enzym*, vol. 61, pp. 208–215, 2009.
- [46] J. H. T. L. Khaled A. Mahmoud, Keith B. Male, Sabahudin Hrapovic, “Cellulose nanocrystal/gold nanoparticle composite as a matrix for enzyme immobilization.,” *Appl Mater Inter*, vol. 1, pp. 1383–6, 2009.
- [47] J. W. Wenlei Xie, “Immobilized lipase on magnetic chitosan microspheres for transesterification of soybean oil,” *Biomass and Bioenergy*, vol. 36, pp. 373–380, 2012.
- [48] D. Clavijo, M. Portilla, M. Cecilia., and A. Quijano Parra, “Cinética de la bromelina obtenida a partir de la piña perolera (Ananas Comosus) de Lebrija-Santander Kinetics of bromelain obtained from the pineapple (Ananas comosus) from,” *Rev. la Fac.*

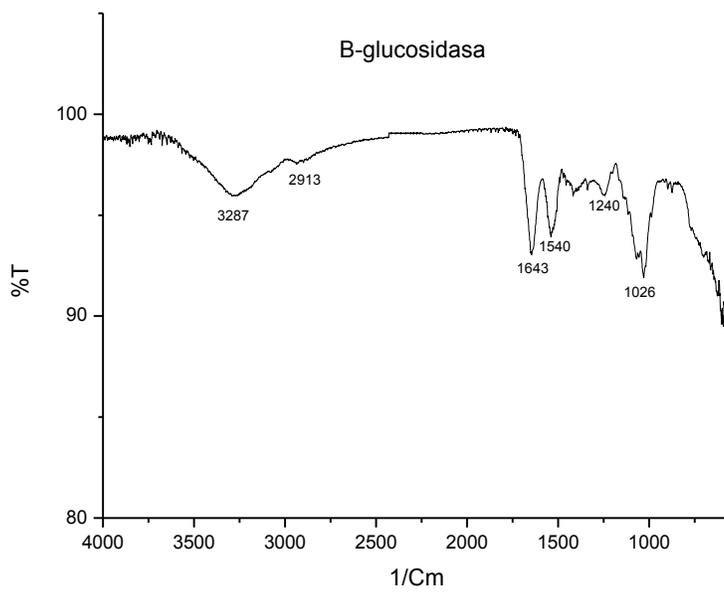
- Ciencias Básicas*, vol. 10, no. 2, pp. 41–49, 2012.
- [49] B. Blijenberg, B.G., Roetering, H.A., Zwang, L., and Leijnse, “Spinal fluid protein revisited: a reappraisal of the biuret procedure.” *J. Clin. Chem. Biochem*, vol. 23, pp. 225–30, 1985.
- [50] Y. H. Jimin Du, Zhimin Liu, Weize Wu, Zhonghao Li, Buxing Han, “Preparation of single-crystal copper ferrite nanorods and nanodisks.” *Mater. Res.*, vol. 40, pp. 928–9, 2005.
- [51] X. C. Yu-long Tan, Chen-guang Liu, Le-jun Yu, “Effect of linoleic-acid modified carboxymethyl chitosan on bromelain immobilization onto self-assembled nanoparticles,” *Front. Mater. Sci.*, vol. 2, no. 2, pp. 209–213, 2008.
- [52] et al. S. Yodoya, T., Takagi, M., Kurotani, T., Hayashi, M., Furuta, M., Oka, “Immobilization of bromelain onto porous copoly(γ -methyl-l-glutamate/l-leucine) beads,” *Eur. Polym. Journal.*, vol. 9, no. 1, pp. 173–180, 2003.
- [53] A. M. V. Benucci, I., Esti, M., Liburdi, K., Garzillo, “Pineapple stem bromelain immobilized on different supports: catalytic properties in model wine,” *Biotechnol. Progress.*, vol. 28, no. 6, pp. 1472–1477, 2012.
- [54] Y. Zhang, G. A. Shi, and F. Zhao, “Hydrolysis of casein catalyzed by papain in n-propanol/NaCl two-phase system,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 46, no. 6, pp. 438–443, 2010.
- [55] N. A. Yazid, R. A. Barrena, and A. Sánchez, “The immobilisation of proteases produced by SSF onto functionalized magnetic nanoparticles: Application in the hydrolysis of different protein sources,” *Journal Mol. Catal. B, Enzym.*, pp. 1–13, 2017.
- [56] B. Etske *et al.*, “Chymosin-induced hydrolysis of caseins: Influence of degree of phosphorylation of alpha-s1-casein and genetic variants of beta-casein,” *Int. Dairy J.*, vol. 39, no. 2, pp. 215–221, 2014.
- [57] C. Dong Hwang and H. Shih Hung, “Fast separation of bromelain by polyacrylic acid-bound iron oxide magnetic nanoparticles,” *Process Biochem.*, vol. 39, no. 12, pp. 2207–2211, 2004.
- [58] Bradford, “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding,” *Anal. Biochem*, vol. 72, pp. 248–254, 1976.
- [59] T. Takahashi, M., Konishi, Y., “Biochemical characterization of *Magnaporthe oryzae* β -glucosidases for efficient β -glucan hydrolysis,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 91, p. 1073–1082., 2011.
- [60] C. Tigting, Yang, Wenjuan., G. Yuling, Y. Renjun, and Y. Li, Xu and Yan, “Enhancing catalytic performance of β -glucosidase via immobilization on metal ions chelated magnetic nanoparticles,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 63, pp. 50–57, 2014.
- [61] A. C. Jansen, E.F., Tomimatsu, Y. y Olson, “Cross-linking of a chymotrypsin and other proteins by reaction with glutaraldehyde,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 144, p. 394–400., 1971.
- [62] L.-J. C. Wong, S.S. y Wong, “Chemical crosslinking and the stabilization of proteins and enzymes,” *Enzym. Microb. Technol.*, vol. 14, p. 866-870., 1992.
- [63] M. Busto, M.D., y Pérez-Mateos, “Extraction of humic- β -glucosidase fractions from soil,” *Biol. Fertil. Soils*, vol. 20, p. 77–82., 1995.

- [64] Dekker RFH., “Application of a magnetic immobilized α -glucosidase in the enzymatic saccharification of steam-exploded lignocellulosic residues.,” *Appl Biochem Biotechnol.*, vol. 23, p. :25–39.
- [65] A. L. Rozo, W.E., Pacheco, J.C., Blanco, L.A., y Rueda, “Efecto del ión cobre (Cu 2+) en la producción de hecogenina en jugo de fique de la especie *Furcraea macrophylla*.,” Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Colombia., 2012.
- [66] Y. Kusano, G., Beisler, J., Sato, “Steroidal constituents of *Solanum xanthocarpum*.,” *Phytochem.*, vol. 12, pp. 399–401, 1973.
- [67] A. Castillo, Jorge E., Hurtado, Isabel C., and Chamorro, “Extracción y cuantificación del alcaloide esteroidal solasodina , de los frutos del *Solanum wrightii* Benth y el *Solanum pseudocapsicum* L.,” vol. 6, pp. 57–62, 2012.
- [68] A. A. Favez, M.B.E., Saleh, “Constituents of local plants X. The esteroidal alkaloids of *Solanum Wrightii* Benth.,” *Phytochem.*, vol. 6, p. 433–436., 1967.
- [69] O. R. Motidóme, M., ILeekning, M.E., Gottlies, “A química de Solanáceaes Brasileiras. I-A Presenca de solamargina e de solasonina no juá o na lobeira.,” *An. Acad. Bras. Cienc.*, vol. 42, p. 375.76, 1970.

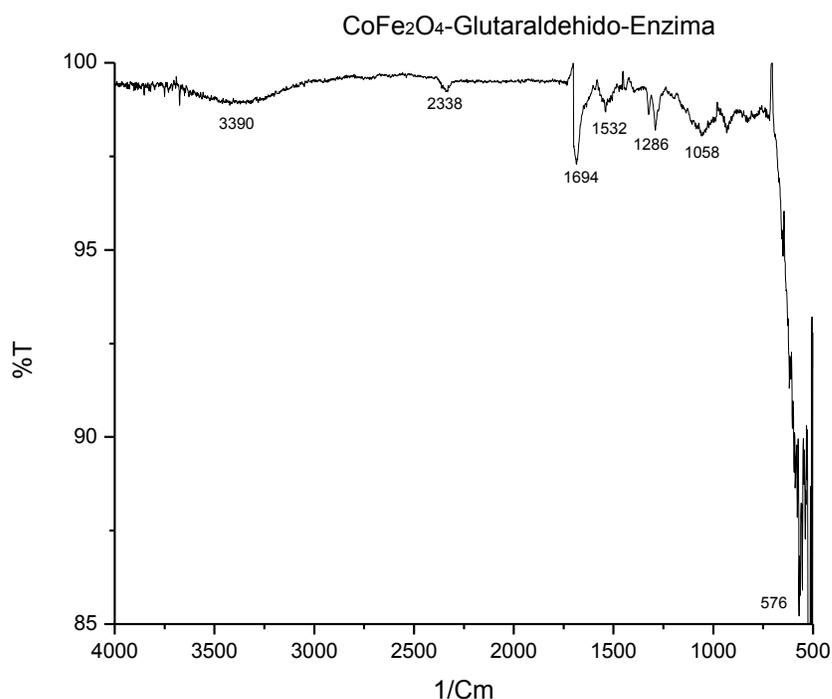
ANEXOS



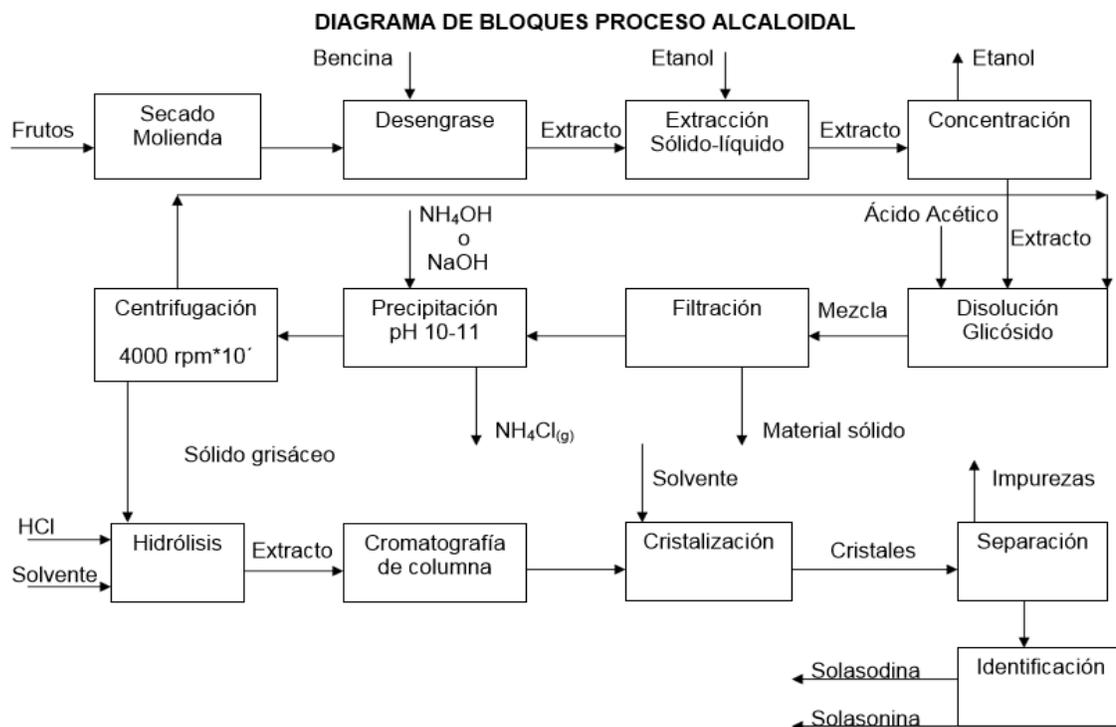
Anexo 1. Espectro FT-IR de solución estándar de glutaraldehído



Anexo 2. Espectro FT-IR. Estándar de la enzima β -glucosidasa



Anexo 3. Espectro FT-IR. Sistema inmovilizado: CoFe₂O₄-glutaraldehído-β-glucosidasa



Anexo 4. Método de extracción tradicional para alcaloides, en base seca