



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LIPROVE)

**Estudio de la actividad de hidrólisis y síntesis de
una lipasa presente en el látex de *Araujia
hortorum***

GABRIELA PAULA DI SANTO MEZTLER

Directora: Dra. SUSANA R. MORCELLE DEL VALLE

Laboratorio de Procesos Biotecnológicos – Año 2012

Noviembre de 2012 - La Plata, Buenos Aires, Argentina

El presente trabajo para optar al título de Licenciada en Biotecnología y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas, se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LiProVe), Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. Susana R. Morcelle del Valle.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de La Plata por posibilitar mi formación académica.

A mis compañeros del Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales, por conformar un ambiente cálido de trabajo.

Al Prof. Dr. Néstor O. Caffini por escucharme y aconsejarme tanto en lo académico como en lo personal.

A la Dra. Susana Morcelle, por acompañarme y ayudarme en el desempeño del trabajo de laboratorio.

Al Lic. Juan Manuel Padró, del Laboratorio de Separaciones Analíticas de la Facultad de Ciencias Exactas, por su colaboración en los ensayos de cromatografía.

A la Lic. María Elisa Fait, del Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales, por su gran aporte en el trabajo experimental y su buena predisposición a atender mis inquietudes.

Al Lic. Gonzalo Acevedo por acompañarme siempre.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	5
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. Lipasas.....	6
1.2. Mecanismo catalítico	8
1.3. Características de las lipasas.....	9
1.4. Beneficios en la utilización de lipasas como catalizadores	9
1.5. Aplicaciones de las lipasas.....	10
1.6. Fuentes de lipasas.....	10
1.7. Lipasas comerciales.....	11
1.8. Lipasas de origen vegetal	12
1.8.1. Lipasas de semillas y látex.....	12
1.8.2. Lipasas de látex	12
2. OBJETIVOS.....	14
2.1. Objetivos generales:	14
2.2. Objetivos específicos:	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1. Material vegetal	15
3.2. Obtención de las lipasas.....	18
3.2.1. Optimización de la separación de gomas.....	18
3.3. Determinación cualitativa de la actividad lipolítica	20
3.4. Optimización del ensayo de determinación de actividad lipolítica	21
3.5. Determinación del pH óptimo	22
3.6. Determinación de la temperatura óptima.....	23
3.7. Estabilidad al almacenamiento.....	23
3.8. Reacciones de hidrólisis utilizado sustratos cromogénicos (ésteres de <i>p</i>-nitrofenilo) 	25
3.9. Ensayos de esterificación	27
3.9.1. Reacción de esterificación. Determinación de la preferencia por el ácido graso	27
3.9.2. Temperatura óptima de esterificación.....	29
3.9.3. Influencia del contenido acuoso en la reacción de esterificación	29

3.10. Síntesis de surfactantes derivados de arginina empleando decilamina y dodecilamina como nucleófilos	31
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
4.1. Obtención de lipasas del látex de <i>Araujia hortorum</i> . Optimización de la separación del material insoluble	33
4.2. Actividad lipolítica presente en el látex de <i>Araujia hortorum</i>	33
4.2.1. Determinación de la presencia de actividad lipolítica	33
4.2.2. Optimización del ensayo de actividad lipolítica	34
4.3. Determinación de pH óptimo	37
4.3.1 Efecto del pH sobre la actividad enzimática	37
4.4. Determinación de temperatura óptima	38
4.5. Estabilidad al almacenamiento	40
4.6. Hidrólisis utilizado sustratos cromogénicos (ésteres de <i>p</i> -nitrofenilo).....	40
4.6.1. Efecto de la masa de biocatalizador sobre la velocidad de hidrólisis de los sustratos cromogénicos	41
4.6.2. Especificidad de sustrato.....	42
4.7. Ensayos de esterificación	42
4.7.1. Determinación de la preferencia por el ácido graso	43
4.7.2. Temperatura óptima de esterificación.....	44
4.7.3. Influencia del contenido acuoso en la reacción de esterificación	44
4.8. Síntesis de surfactantes derivados de arginina empleando distintas aminas grasas como nucleófilos	45
5. CONCLUSIONES.....	49
6. PERSPECTIVAS	50
7. BIBLIOGRAFÍA.....	51

ABREVIATURAS

Abs.: absorbancia	His: histidina
AD: agua destilada	HPLC: cromatografía líquida de alta presión
AG: ácidos grasos	kDa: kilo Dalton
AHL: lipasa de <i>Araujia hortorum</i>	Km: constante de Michaelis-Menten
AMPSO: (3-[(1,1-Dimethyl-2-hidroxyethyl)amino]-2-hidroxypropanesulfonic acid)	LC ESI MS/MS: cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray
Asp: asparagina	MES: (2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid)
BAEE: éster etílico de N^{α} -benzoil-arginina	MOPS: (3-[N-Morpholino]propanesulfonic acid)
Bz-Arg-NHC ₁₀ : N^{α} -benzoil-arginina decilamida	PM: peso molecular
Bz-Arg-NHC ₁₂ : N^{α} -benzoil-arginina dodecilamida	Py: piridina
Bz-Arg-OH: N^{α} -benzoil-arginina	rpm: revoluciones por minuto
CAPS: (3-[Cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid),	SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio
cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario	Ser: serina
CPL: lipasa de <i>Carica papaya</i>	TAPS: (<i>N</i> -tris[Hydroxymethyl]methyl-3-aminopropane sulfonic acid)
δ : densidad	TFA: ácido trifluoroacético
EC: Enzyme Commission (Comisión de Enzimas) del NC-IUBMB (Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular).	TG: triacilglicéridos
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético (sal disódica)	Tris: tris(hidroximetil)aminometano
Glu: glutamina	

1. INTRODUCCIÓN

1.1.Lipasas

Las lipasas (EC 3.1.1.3) son las enzimas responsables de catalizar reacciones de hidrólisis de triacilgliceroles (TG) produciendo ácidos grasos libres, diacilgliceroles, monoacilgliceroles y glicerol (Figura 1). En los seres vivos cumplen una función clave en el catabolismo de las grasas o aceites, así como en su almacenamiento y liberación cuando son utilizados como reservorio de energía en los organismos (Villeneuve et al., 2000).

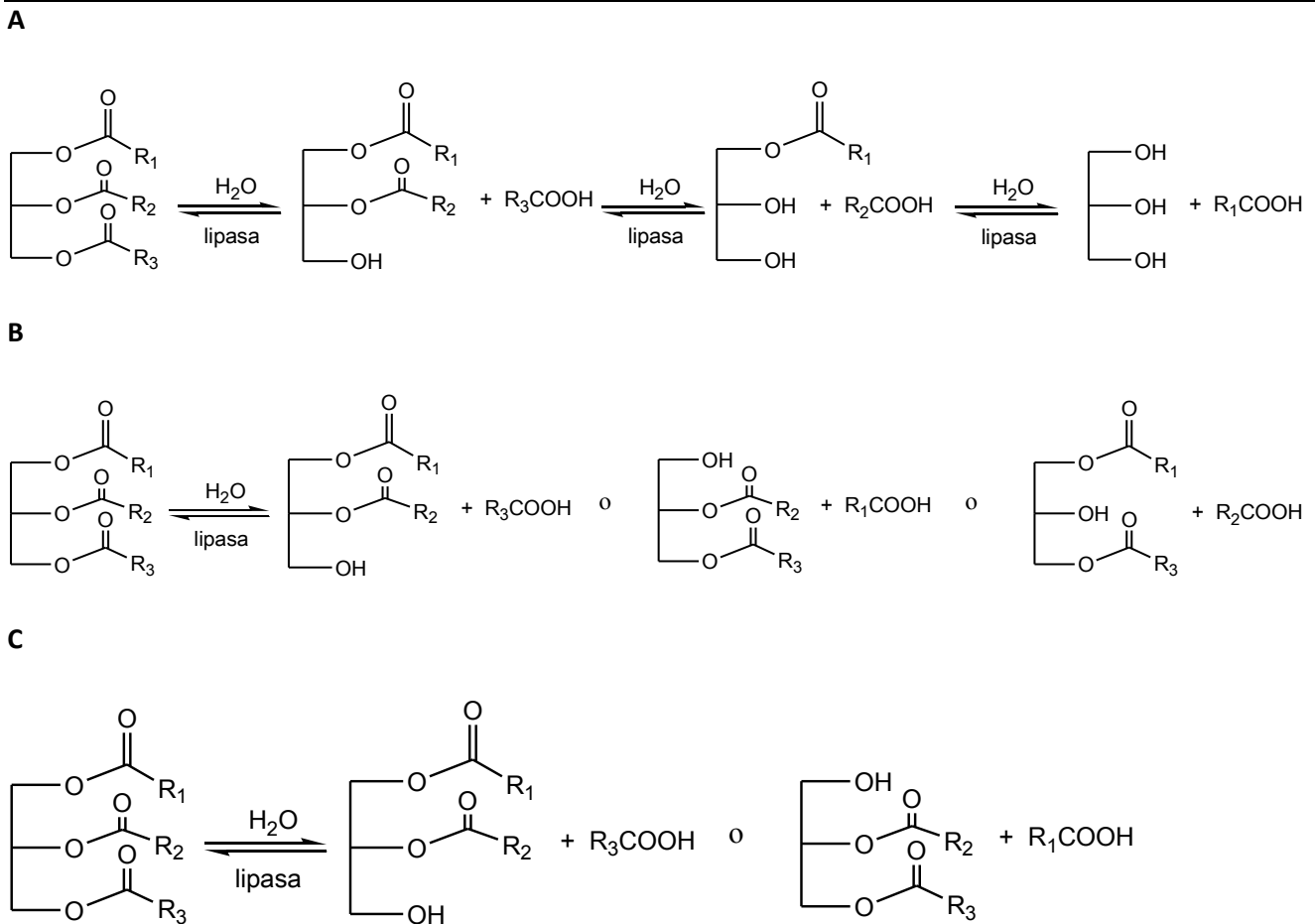


Figura 1. A. Ecuación general de hidrólisis de TG catalizada por lipasas. **B.** Hidrólisis de TG catalizada por una lipasa inespecífica. **C.** Hidrólisis de TG catalizada por una lipasa 1,3 específica.

A pesar de esto, no existe una definición simple y concreta que indique sin ambages lo que es una lipasa. Los criterios empleados para clasificar a una enzima lipolítica como una verdadera lipasa son (Jaeger et al., 1999):

- a) Debe activarse por la presencia de una interfase, esto quiere decir que su actividad debe incrementarse notablemente tan pronto como los TG formen una emulsión (activación interfacial).
- b) Debe contener una “tapa” (“lid”), que es un loop superficial de la proteína que cierra el sitio activo de la enzima, y que debe abrirse al tomar contacto con la interfase.

No obstante estos criterios son insuficientes para definir una lipasa, ya que existen un gran número de excepciones que incluyen enzimas con tapas que no presentan activación interfacial. Por lo tanto, las lipasas se definen como carboxilesterasas que catalizan la hidrólisis (y síntesis) de acilglicerol de cadena larga. Se consideran “de cadena larga” los ésteres de glicerol compuestos por grupos acilo de diez o más carbonos. La hidrólisis de ésteres de glicerol que contengan grupos acilo con un número de carbonos menor a diez usualmente indican la presencia de una esterasa. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la mayoría de las lipasas son perfectamente capaces de hidrolizar los sustratos de las esterasas (Jaeger et al., 1999).

En este aspecto, las esterasas (EC 3.1.1.1) hidrolizan enlaces ésteres según el esquema general de la Figura 2. Es así que, si el sustrato es un éster cuyo componente alcohol es un residuo de glicerol, el componente ácido son ácidos grasos y el TG es insoluble en agua, la enzima capaz de hidrolizarlo será una lipasa, por lo que las lipasas pueden describirse también como enzimas que hidrolizan ésteres en la interfase agua-aceite en un sistema insoluble o heterogéneo (Uligh, 1989).

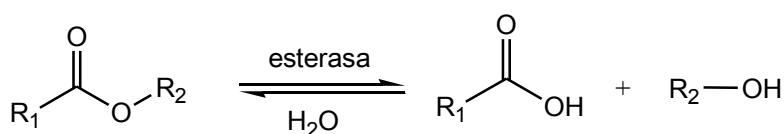


Figura 2. Ecuación general de hidrólisis de una esterasa.

1.2. Mecanismo catalítico

Las lipasas son hidrolasas que actúan sobre los enlaces éster presentes en los acilgliceroles para liberar ácidos grasos y glicerol. Su sitio activo consiste en una tríada catalítica Ser-His-Asp/Glu, similar a la observada en las proteasas serínicas.

La hidrólisis tiene lugar en dos etapas (Figura 3). Comienza mediante el ataque nucleofílico del oxígeno del grupo oxhidrilo de la Ser sobre el carbono del carbonilo activado del enlace éster susceptible del lípido. Se forma un intermediario tetraédrico transitorio, caracterizado por una carga negativa en el átomo de oxígeno del carbonilo.

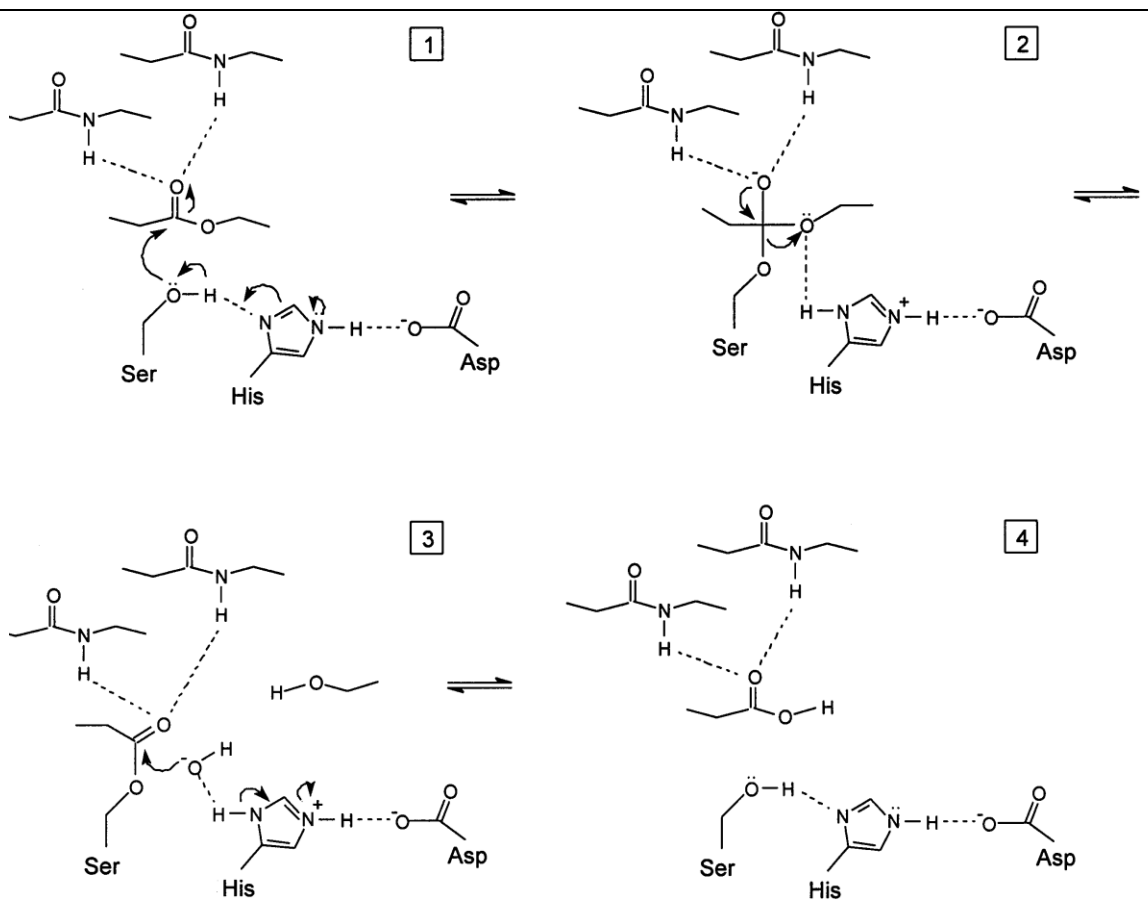


Figura 3. Mecanismo de reacción de las lipasas. [1] Unión del lípido, activación del residuo de serina nucleofílica por la histidina vecina y ataque nucleofílico del carbonilo del sustrato por la Ser-O⁻. [2] Intermediario tetraédrico transitorio, con la Ser-O⁻ estabilizada por interacciones con grupos peptídicos -NH-. La His dona un protón al componente alcohólico saliente del sustrato. [3] El intermediario covalente ("acil enzima") en el que el componente ácido del sustrato está esterificado con el residuo de serina de la enzima. La molécula entrante de agua es activada por el residuo de His vecino, y el resultante ión hidroxilo realiza un ataque nucleofílico sobre el átomo de carbono del carbonilo del intermediario covalente. [4] El residuo de His dona un protón al átomo de oxígeno del residuo activo de Ser, el enlace éster entre la Ser y el componente acilo se rompe. Finalmente, el producto acilo es liberado.

1.3. Características de las lipasas

Las lipasas, al igual que las proteasas, además de hidrólizar, pueden catalizar las reacciones reversas, como esterificación, transesterificación, aminólisis y lactonización (Wiermann y Alves Macedo, 2006). El equilibrio entre las reacciones de hidrólisis y de síntesis están controladas por la actividad del agua de la mezcla de reacción (Villeneuve et al., 2000). Las lipasas son enzimas generalmente estables, que pueden soportar el efecto de la desnaturalización de varios solventes orgánicos. (Dhouib et al., 2011). Además presentan compatibilidad con sustratos sintéticos y una alta velocidad de reacción. (Wiermann y Alves Macedo, 2006).

1.4. Beneficios en la utilización de lipasas como catalizadores

Los biocatalizadores (enzimas y células enteras) están siendo explotados en forma creciente para procesos preparativos que van desde la escala de laboratorio hasta la industrial (Gardossi et al., 2010). De hecho, la biocatálisis ofrece una perspectiva de diseño de procesos industriales limpios y se ha convertido en una tecnología aceptada en la mayoría de los sectores. Esto se debe fundamentalmente al impacto de los procesos industriales, lo que conlleva al desarrollo de alternativas más benignas para el medio ambiente: esto es, el diseño de productos y procesos factibles y económicos, que reduzcan la generación de la contaminación en sus propios orígenes, minimicen el consumo de energía y empleen materias primas renovables (Anastas y Warner, 1998; U.S. Environmental Protection Agency, 2009). Los procesos biotecnológicos consisten en una alternativa para mejorar la sustentabilidad, ya que hacen uso de las características propias de los sistemas biológicos tales como versatilidad, selectividad de sustrato y catálisis en condiciones de temperatura y presión suaves (Aracil et al., 2006). No obstante, el desafío para los bioprocesos es la competitividad frente a los procesos químicos ya existentes. En este aspecto, los descubrimientos sobre la biodiversidad y el impacto de la biología molecular permiten el hallazgo de nuevos biocatalizadores capaces de adaptarse mejor a requerimientos industriales limpios, especialmente aquellos vinculados a las industrias farmacéutica y agroquímica, donde los productos y los intermediarios son más susceptibles a la síntesis biocatalítica (Bull et al., 1999; Rozzell, 1999; Rubin-Pitel y Zhao, 2006). En la actualidad, existen más de 150 procesos biocatalíticos implementados en la industria, y la mayoría pertenecen al sector farmacéutico, debido especialmente a la gran demanda de drogas quirales complejas (Woodley, 2008; Adamzack y Hari Krishna, 2004).

1.5. Aplicaciones de las lipasas

En la actualidad, las lipasas son ampliamente usadas como ingredientes en detergentes y medicinas, como catalizadores para la resolución de compuestos quirales, aditivos alimentarios, producción de aceites y grasas, degradación de acilgliceroles en madera para la producción de papel y remoción de grasas en el curtido de los cueros (Hou y Shimada, 2008). Asimismo, lipasas de origen microbiano se han empleado en la obtención por esterificación de monoacilglicéridos (emulsificantes muy usados en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica) y de ésteres de fitoesteres (aditivos alimentarios para reducir los niveles de colesterol sanguíneo) (Shimada et al., 1999). Productos de transesterificación como fragancias (acetato de geraniol, por ej.) son obtenidos mediante reacciones catalizadas por lipasas con 85% de rendimiento (Morcelle et al., 2009). Otros productos de transesterificación incluyen un sustituto de grasa de leche humana (Ghandi et al., 2001) y biodiesel a partir de aceites y grasas comestibles y no comestibles (Lv et al., 2010). Todas estas aplicaciones hacen de las lipasas las enzimas más empleadas en síntesis orgánica (Woodley, 2008).

1.6. Fuentes de lipasas

Las lipasas son ubicuas en la naturaleza y son producidas por vegetales, animales y microorganismos. Las lipasas de origen microbiano (bacterianas y fúngicas) son las enzimas más utilizadas en aplicaciones biotecnológicas y en química orgánica (Gupta et al., 2004).

1.7.Lipasas comerciales

Las lipasas más utilizadas comercialmente se listan a continuación (Kademi et al., 2006).

Tabla 1		
Fuente	Nombre comercial	Proveedor
Bacterias		
<i>Achromobacter sp.</i>	Lipasa ALC, Lipasa ALG	Meito Sangyo co.
<i>Alcaligenes sp.</i>	Lipasa PLC, Lipasa PLG, lipasa QLC, lipasa QLG	Meito Sangyo co.
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Lipasa PS "Amano"	Amano
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Lipasa AK "Amano"	Amano
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Lipasa TL	Meito Sangyo co.
Hongos		
<i>Aspergillus niger</i>	Lipasa A "Amano" 6	Amano
	Lypolyve AN	Lyven
<i>Mucor miehei</i>	Piccnate	Gist-Brocades
<i>Rhizomucor miehei</i>	Palatase®	Novozymes
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Lipolase®, Lipolase Ultra®	Novozymes
Levaduras		
<i>Candida antarctica</i>	Novozym 435®, Noopazyme®	Novozymes
<i>Candida rugosa</i>	Lipasa AY "Amano" 30	Amano
	Resinase®	Novozymes
	Lipasa AYS "Amano"	Amano
	Lipasa II	Genzyme, Seikagaku, Calzyme Fluka
Animales		
Páncreas porcino	Lypomod 224P-L224P	Biocatalysts Ltd
	Lipasa 30, Lipasa-CE	SPL, Seikagaku Calzyme Worthington
Vegetales		
Germen de trigo		Sigma

En general, las lipasas extracelulares son las de mayor importancia comercial, ya que su producción masiva es mucho más sencilla. Por este motivo, las lipasas más utilizadas en la industria son las de origen microbiano (Sharma et al., 2001).

1.8. Lipasas de origen vegetal

Las lipasas de plantas parecen ser muy atractivas debido a su bajo costo, su facilidad de purificación y el hecho de que están ampliamente disponibles a partir de fuentes naturales sin necesidad de recurrir a la tecnología de la genética molecular para producirlas. Sin embargo, las cosas no suelen ser tan fáciles, ya que las lipasas de semillas oleaginosas vegetales suelen estar presentes en muy baja concentración por lo que los niveles en su fuente nativa representan un inconveniente para su utilización en escala piloto o a gran escala.

Hasta ahora, sus aplicaciones potenciales sólo se realizan a escala de laboratorio. Sin embargo, veremos más adelante que algunas lipasas vegetales obtenidas de otras fuentes, distintas de las semillas oleaginosas, pueden ser consideradas como catalizadores prometedores para los aceites y grasas (Villeneuve, 2003).

1.8.1. Lipasas de semillas y látex

Las lipasas de origen vegetal suelen encontrarse en semillas como en el caso de las semillas de ricino, colza, maní, lino, soja y avena, o también pueden hallarse en plantas productoras de látex tales como las especies Asclepiadáceas, Sapotáceas, Euforbiáceas, Moráceas, Papaveráceas y Asteráceas (Villeneuve, 2003).

1.8.2. Lipasas de látex

El látex se origina a partir de células especializadas llamadas laticíferos. Frente a heridas, los laticíferos exudan látex, que sirve para proteger a la planta de los depredadores (Dhouib et al., 2011). El látex es un fluido tixotrópico con un aspecto lechoso, que contiene alrededor del 15% materia seca, 85% de agua, y una gran variedad de enzimas hidrolíticas. Diferentes composiciones de proteínas han sido reportadas dependiendo de la especie vegetal, así como en la hora del día en la que se lleva a cabo la cosecha. Alrededor del 10% de todas las angiospermas (plantas superiores) exudan látex al ser dañadas. Este látex no tiene una función conocida en el metabolismo primario de las plantas, y se supone que el mismo actúa como defensa frente a predadores herbívoros (Agrawal y Konno, 2009).

La presencia de diferentes enzimas en el látex podría deberse a dicho papel defensivo en la planta (Domínguez de María et al., 2006). Las lipasas están contenidas en la fracción insoluble de látex (Dhouib et al., 2011).

La lipasa de *C. papaya* (CPL) se reportó por primera vez en 1935. Sin embargo, no fue sino hasta la década de 1990 que esta hidrolasa fue caracterizada, mostrando una activación interfacial fuerte cuando diferentes triglicéridos fueron empleados como sustratos (Domínguez de María et al., 2006).

Como sucede con AHL, no hay considerables experimentos en cuanto a su caracterización bioquímica, ya que hasta la fecha, todos los intentos de aislar CPL de la matriz de la materia seca para la purificación han sido infructuosos. En cualquier caso, una CPL parcialmente purificada se puede obtener mediante la disolución de papaína bruta en agua, eliminando así la fase acuosa después de la centrifugación (Domínguez de María et al., 2006).

Actualmente se logró caracterizar una esterasa presente en el látex de *Carica papaya* que se obtuvo luego de un paso de extracción con un detergente zwitteriónico y sonicación, seguida de una cromatografía de exclusión molecular. La proteína no pudo ser purificada en su totalidad debido a la formación de agregados, pero una banda de la proteína principal con una masa molecular aparente de 41 kDa se obtuvo mediante SDS-PAGE. Este material se digirió con tripsina y las secuencias de aminoácidos de los péptidos trípticos se determinaron por LC / ESI / MS / MS. Con las secuencias de aminoácidos se obtuvo un cDNA parcial, lo que permitió identificar el marco de lectura abierto del gen de la esterasa en el genoma de *Carica papaya*. (Abdelkafi et al., 2009).

Por otro lado, pudo obtenerse una lipasa con múltiples isoformas a partir del látex de *Euphorbia characias*. Esta extracción permitió la recuperación selectiva de una única proteína, con un peso molecular de 37 kDa, que correspondería a las diferentes isoformas de la enzima con actividad tanto lipolítica como fosfolipolítica. Estas isoformas, se expresarían de forma pareja durante todo el ciclo biológico de la planta. Sobre la base de los resultados obtenidos, la lipasa de *Euphorbia characias* debería ser considerada como una acilhidrolasa específica con actividad combinada lipasa/fosfolipasa (Fiorillo et al., 2006).

Los ejemplos citados demuestran la dificultad en la obtención de las lipasas de látex de plantas en estado puro, especialmente en el caso de la lipasa de *C. papaya*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos generales:

- 1) Llevar a cabo una búsqueda bibliográfica acerca de lipasas de origen vegetal, especialmente sobre su caracterización y sus aplicaciones en la industria farmacéutica y alimentaria.
- 2) Obtener adiestramiento en el manejo de procedimientos básicos de laboratorio:
 - a) preparación de soluciones *buffer* y otros reactivos de uso común,
 - b) separación de enzimas,
 - c) determinación de la actividad enzimática empleando distintas técnicas según el sustrato y el tipo de reacción catalizada por las lipasas.
- 3) Desarrollo de criterios para analizar y discutir resultados experimentales.
- 4) Integrarse adecuadamente a un grupo de trabajo.

2.2. Objetivos específicos:

- a) Obtención del extractos del látex de frutos de *Araujia hortorum* Fourn (Asclepiadaceae) con actividad lipolítica.
- b) Puesta a punto de un ensayo estándar para la determinación de la actividad lipolítica.
- c) Determinación de los parámetros óptimos de reacción de las lipasas presentes en el látex de *A. hortorum* (temperatura, pH).
- d) Estudio del efecto de la temperatura de almacenamiento en la actividad de las lipasas.
- e) Ensayo de hidrólisis empleando ésteres de *p*-nitrofenilo. Optimización de la reacción (masa de biocatalizador) y determinación de la preferencia de sustrato.
- f) Aplicación de las lipasas obtenidas en ensayos de esterificación de distintos ácidos grasos con *n*-butanol. Determinación de la preferencia por el ácido graso.
- g) Efecto de la temperatura en la reacción de esterificación.
- h) Ensayo de la síntesis de surfactantes catiónicos derivados de arginina catalizada por las lipasas presentes en el látex de *A. hortorum*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal

El látex fue obtenido de frutos inmaduros de *Araujia hortorum* Fourn. (Asclepiadaceae). La familia Asclepiadaceae constituye un amplio grupo de plantas que incluye cerca de 350 géneros y alrededor de 2900 especies. Son hierbas perennes, arbustos, lianas y, ocasionalmente, árboles, caracterizados por tener hojas opuestas, simples y presentar látex. El género *Araujia*, en Argentina, incluye cinco especies nativas: *A. angustifolia*, *A. hortorum*, *A. megapotamica*, *A. plumosa* y *A. sericifera*.

Araujia hortorum es una enredadera que crece envolviendo troncos y ramas de árboles, tejidos de alambrados o apoyándose en paredes o paredones. (Bucciarelli et al. 2007 a).

Es originaria de la zonas cálidas de América del Sur (Brasil, Perú, Paraguay, Uruguay, Argentina) y está distribuida en zonas templadas del mundo como el sur de Europa, las Azores, África del Sur, Nueva Zelanda y el sur de EE.UU. (es decir, California y Georgia). También se encuentra en las zonas templadas cálidas y las regiones subtropicales del este de Australia. En este país, así como en España, suele encontrarse asociada con *Araujia sericifera*, siendo ambas consideradas como plaga que debe ser controlada (Australian Weeds Committee, 2011).

En Argentina se la conoce con los nombres aborígenes de tasi o doca (Priolo, et al. 2000).

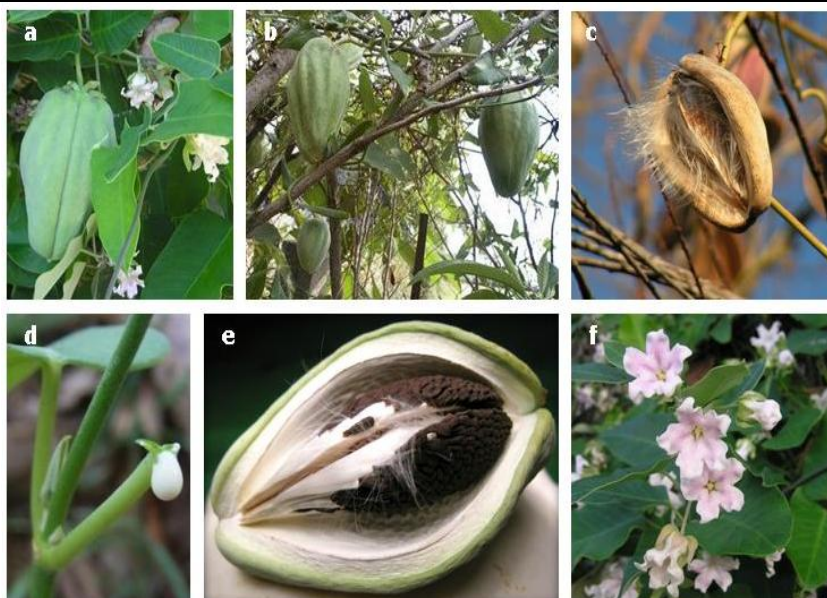


Figura 4. Morfoanatomía de *A. hortorum* (a) Hojas, flores y frutos. (b) Frutos. (c) Fruto seco con semillas. (d) Látex extraído de los tallos. (e) Fruto con semillas. (f) Flores y hojas.

Morfología de la flor: sus flores se caracterizan por ser perfumadas, en forma de corola y de color blanco o rosado, con apéndice membranáceo en la parte superior y el tubo de la corona soldado a la corola; tienen una longitud promedio de 15 mm, siendo la época de

floración desde finales de primavera hasta inicios del otoño pero más abundantemente durante el verano.

Morfología del fruto: son folículos ovoideos, lisos, glabros, con una longitud promedio de 14 cm, son de color verde azulado, tornándose marrones y de textura amaderada a medida que maduran, abriéndose finalmente para liberar las semillas. Estas últimas son de color negro, miden aproximadamente 4 mm de largo y poseen en uno de sus extremos pelos blancos de textura sedosa y 2,5 cm de longitud, los cuales facilitan la dispersión de las mismas por acción del viento (Australian Weeds Committee, 2011).

Morfología de la hoja: Las hojas son simples, simétricas, aovado oblongas o aovado-lanceoladas, acuminadas en el ápice; las juveniles tienen base truncada y las adultas ligeramente lobadas (Fig. 5 B-F). Se disponen de manera opuesta, son pecioladas, de borde entero, blanquecinas en su cara abaxial y miden de 5 a 10 cm de longitud (Fig. 5 B-F). Se observan 1-5 glándulas en la base de la lámina, hacia la cara adaxial. Los tricomas se distribuyen de manera desigual en ambas epidermis: la cara adaxial presenta en general escasa cantidad de pelos, aunque su densidad es mayor a nivel del nervio medio. La cara abaxial, en cambio, es densamente pubescente con distribución uniforme de los pelos en toda la superficie, excepto en las hojas más maduras, en las que la porción más elevada de la costilla central con escasos tricomas, genera una franja de diferente tonalidad a lo largo de la misma. El nervio medio, algunos secundarios mayores y el pecíolo adquieren coloración rojiza a la madurez debido a pigmentos principalmente de células hipodérmicas. Al igual que la superficie abaxial de la hoja, el pecíolo, es densamente pubescente.

Morfología del tallo: El tallo es erecto, ramificado, de contorno algo redondeado y aspecto densamente pubescente en ejemplares jóvenes. En éstos se observa una coloración violácea que se corresponde con pigmentos presentes en las células de la hipodermis.

Morfología de la raíz: La raíz es pivotante y está formada por un eje principal y ramificaciones secundarias (Fig. 5 B). (Bucciarelli et al., 2007 a).

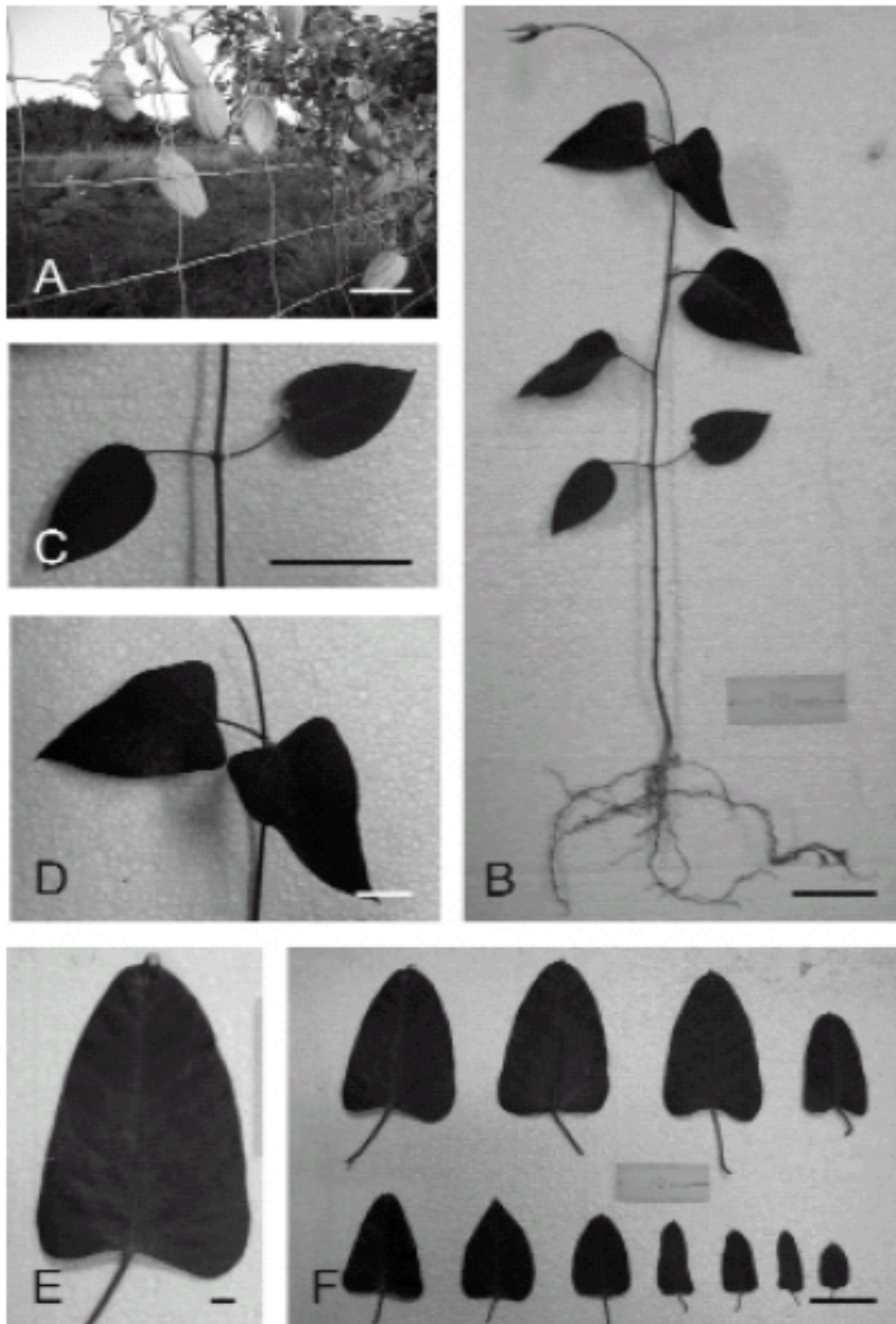


Figura 5 .(a) Vista del hábito trepador y apoyante de *A.Hortorum*. **(b)** Planta joven mostrando sistema radical y diferentes morfotipos foliares. **(c-f)** Morfotipos foliares. **(c)** Morfotipo 1, primer par de nomófilos. **(d)** Morfotipo 2, hojas de base trucada. **(e)** Morfotipo 3, hojas de base cordada. **(f)** Gradación de tamaño y morfología de las hojas durante el desarrollo de la planta. Barras: **(a)** 10 cm; **(b-c), (f)** 5 cm; **(d)** 2 cm; **(e)** 1cm.

3.2. Obtención de las lipasas

Se recolectaron 51 frutos inmaduros (4,92 kg) de plantas de *A. hortorum* crecidas en La Plata, Provincia de Buenos Aires, en febrero de 2010. El látex se obtuvo por remoción de los pecíolos de los frutos. Todos los frutos cosechados contenían látex. De cada fruto se colectaron en promedio 8 gotas de látex, las que fueron reunidas en agua destilada y EDTA 5mM (100 ml) en baño de hielo (figura 6). El volumen final del homogenato fue de 130 ml. Dicho homogenato fue fraccionado y conservado a -20°C para su posterior utilización.

Una de las fracciones del homogenato (40 ml) fue centrifugada a 9600×g (4°C, 30 min). Dado que no se observó una precipitación completa del material insoluble, se procedió a la optimización de las condiciones de separación.

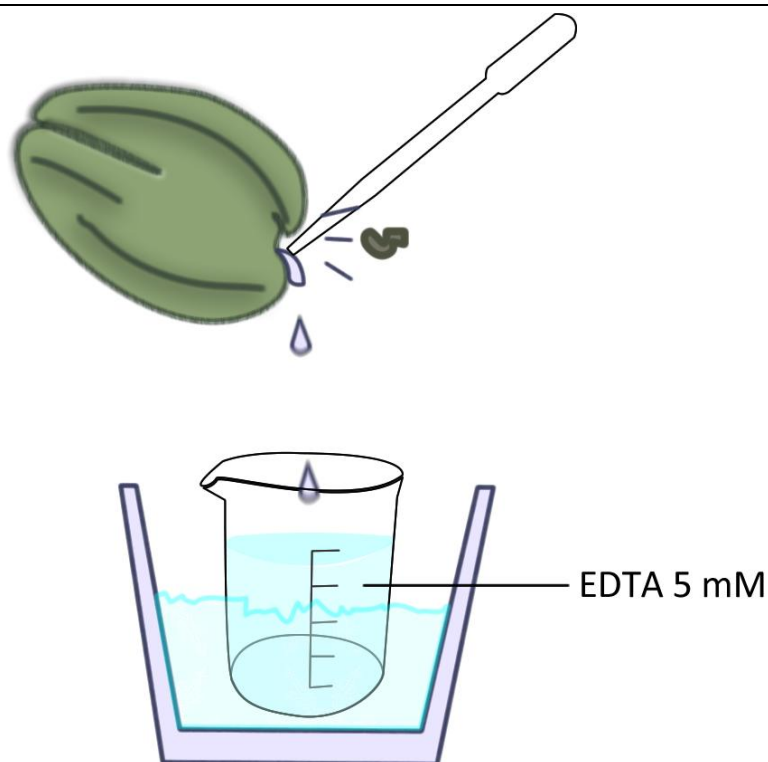


Figura 6: Recolección del látex en EDTA 5 mM, en baño de hielo.

3.2.1. Optimización de la separación de gomas

Con el fin de obtener la mayor cantidad de material insoluble posible, la fracción soluble obtenida en el punto anterior fue sometida a ensayos posteriores de clarificación. Se diluyó una alícuota del sobrenadante (1:10) en solución acuosa de EDTA 5 mM y se centrifugó en las

mismas condiciones descriptas anteriormente 9600xg (4°C, 30 min). Simultáneamente, se centrifugó una alícuota de 10 ml del sobrenadante sin diluir (figura 7).

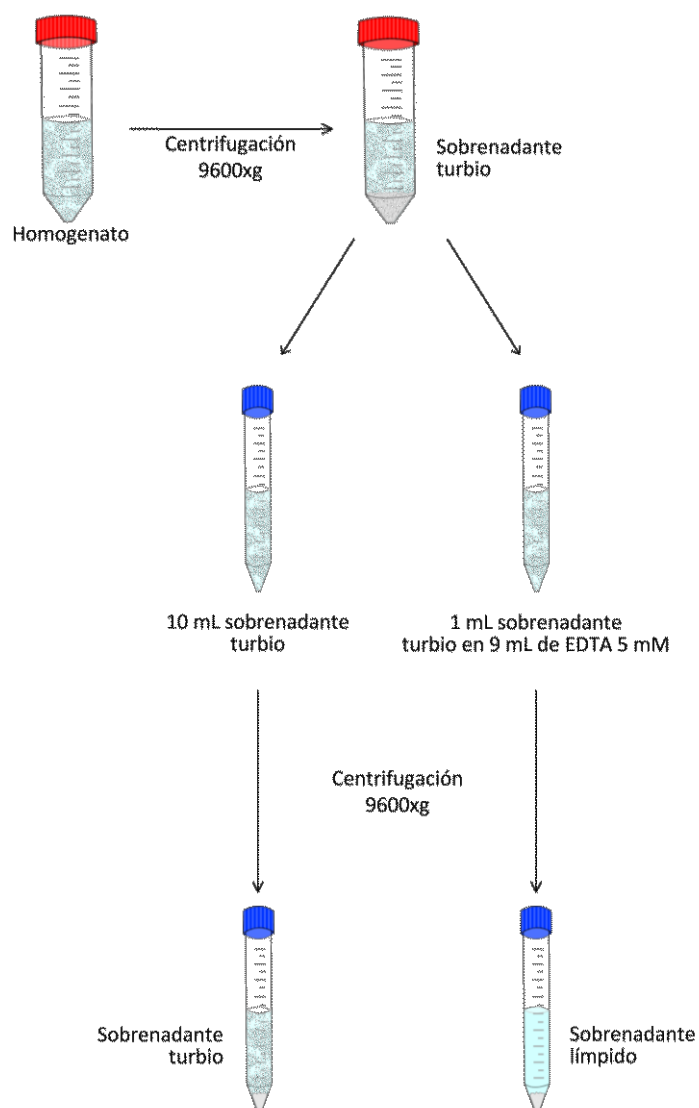


Figura 7: Separación de las gomas: con dilución en EDTA 5 mM o sin dilución del sobrenadante.

Por otro lado, se ensayó la clarificación del sobrenadante obtenido en 3.2., realizando una dilución (1:5) del mismo en *buffer* cítrico- citrato 0,1 M pH 4,4 y centrifugando en las mismas condiciones especificadas anteriormente. Del sobrenadante obtenido, se realizó una segunda dilución en el mismo *buffer* (1:2) y volvió a centrifugarse en idénticas condiciones (figura 8).

Las fracciones obtenidas fueron liofilizadas (40 mm Hg, -52°C, 24 h) para eliminar el agua presente en el medio. Los sólidos resultantes fueron conservados a -20°C.

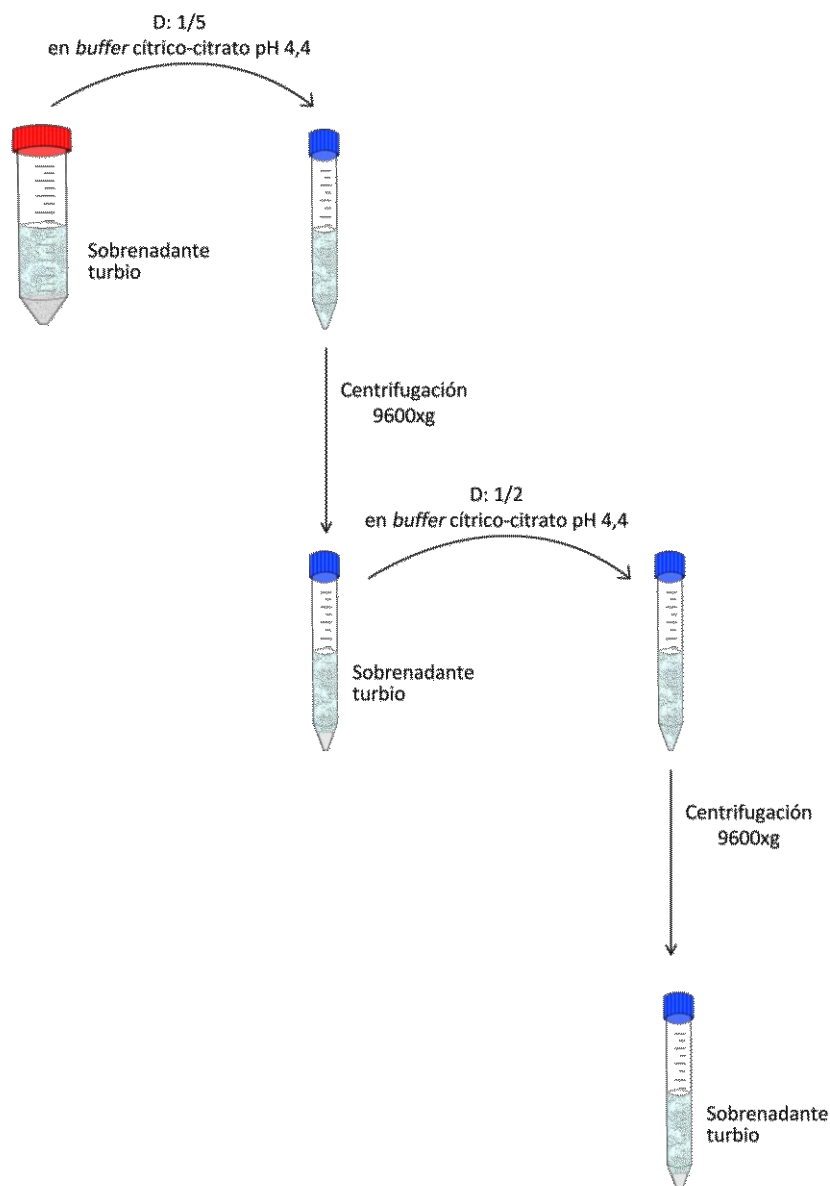


Figura 8: Separación de las gomas empleando *buffer* cítrico-citrato pH 4,4.

3.3. Determinación cualitativa de la actividad lipolítica

Se determinó la presencia de actividad lipolítica en las fracciones obtenidas en 3.2.1. mediante una adaptación del método de Kwon y Rhee (1986) en un sistema bifásico conteniendo iso octano como solvente orgánico. Dicho método se basa en la formación de un complejo de Cu^{2+} del reactivo con los ácidos grasos liberados del sustrato por acción de las lipasas y presente en la fase orgánica. Se midió espectrofotométricamente la absorbancia del complejo resultante a 715 nm. En este caso, se empleó como sustrato aceite de algodón (Sigma).

La reacción de hidrólisis se realizó a 40°C, previa termostatación de los reactivos. Las fracciones liofilizadas en el 3.2.1 fueron pesadas en viales de vidrio (aproximadamente 5 mg en cada caso), se les añadió los reactivos en el siguiente orden:

- *Buffer* Tris-HCl 0,1M pH 8,5 conteniendo 1% v/v Tritón X-100 y EDTA 5 mM (*buffer* de reacción); 0,5 ml
- CaCl₂ 0,15 M, 0,2 ml
- Isooctano, 4,5 ml
- Aceite de algodón, 0,5 ml

La reacción se llevó a cabo con agitación magnética (300 rpm) en estufa a 40°C durante 30 min y se detuvo con el agregado de HCl 6 N (0,5 ml).

Se separaron las fases por decantación y se tomó la fase orgánica (fase superior), a la que se le añadió una solución de CuAc₂ (5% p/v), previamente llevada a pH 6,1 utilizando pHmetro con piridina (py). Se mezcló por agitación vigorosa en vórtex (90 s) y se midió la absorbancia de la fase orgánica a 715 nm en un espectrofotómetro Agilent (8453E).

3.4. Optimización del ensayo de determinación de actividad lipolítica

Con el fin de realizar determinaciones analíticamente aceptables, adecuadas a la instrumentación utilizada y al material disponible, se ajustaron los siguientes parámetros:

- a) tiempo de reacción;
- b) volumen de reactivos;
- c) homogeneidad de la fase orgánica en la cual se realiza la medida de actividad.

Para corroborar que la fase orgánica fuera homogénea en el contenido del complejo ácidos grasos – Cu²⁺, en múltiples ensayos se tomaron muestras de la fase orgánica (figura 9) y luego se llevó a cabo la reacción colorimétrica en cada una de las fracciones recogidas.

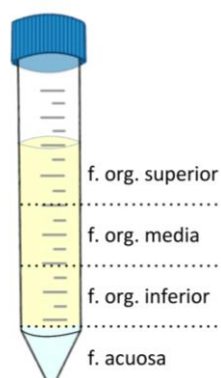


Figura 9: Fases analizadas para conocer la distribución de los AG.

El protocolo final de la reacción de hidrólisis por AHL quedó conformado de la manera indicada en la Tabla 2 (Ver figura 10).

Tabla 2

Compuesto	<i>Buffer</i> de reacción	Solución de CaCl ₂ 0,15M	Isooctano	Sustrato
Volumen final	1 ml	0,4 ml	9,5 ml	0,5 ml

La reacción de hidrólisis se realizó en baño termostático a la temperatura de ensayo, habiendo termostatizado previamente los siguientes reactivos: solución de CaCl₂, *buffer* de reacción, isooctano y el sustrato.

Se pesaron 5 mg de látex liofilizado dentro de viales en la balanza analítica y se les introdujo un buzo magnético. Luego se agregaron los tres primeros reactivos y la reacción fue iniciada mediante el agregado en último lugar el sustrato. La reacción se llevó a cabo en estufa con agitación magnética, durante 2 minutos, y se detuvo mediante el agregado de 1 ml de HCl 6 N en las mismas condiciones. La mezcla fue centrifugada durante 10 min a 9600×g. Se tomó 1 ml de la fase superior (fase orgánica) y se mezcló con 0,2 ml de la solución CuAc₂/Py en un tubo *ependorf* mediante agitación vigorosa en vórtex durante 90 seg. Se volvió a centrifugar 10 min a 9600×g, se separó la fase orgánica y se midió absorbancia en microcubeta de cuarzo a 715 nm.

Se definió una unidad enzimática como la cantidad de enzima que produce un incremento de una unidad de absorbancia por min por mg de sólido liofilizado (Abs/mg×min).

3.5. Determinación del pH óptimo

El pH óptimo se determinó empleando una solución de las sales de sodio de los siguientes *buffers* de Good: MES, CAPS, TAPS, AMPPO y MOPS (Good e Izawa, 1972). La sal sódica de CAPS se disolvió primeramente en una solución de NaOH 0,1 M. Luego se reunieron todas las sales y se llevaron a volumen final con AD, previo agregado de Tritón X-100 1% (v/v) y EDTA 5 mM, siendo la concentración final de cada sal de 50 mM. Los pH finales de los *buffers* se ajustaron con HCl o con NaOH.

Las medidas se realizaron según el protocolo descrito en el ítem 3.4, sustituyendo el *buffer* de reacción por el correspondiente *buffer* de Good. Los valores de pH a los que se evaluó la actividad fueron 4; 6; 7; 8; 8,5; 10; 12 y 13,4.

3.6. Determinación de la temperatura óptima

Para realizar esta determinación, se conservó el protocolo indicado en la sección 3.4. La única variante fueron las temperaturas de reacción a la que fue sometida la enzima. Estas temperaturas fueron 15°C (temperatura ambiente del día del ensayo), 30°C, 40°C, 50°C, 60°C y 70°C.

3.7. Estabilidad al almacenamiento

Se midió la actividad en hidrólisis de tres muestras de lipasas almacenadas bajo diferentes condiciones. Éstas fueron almacenadas durante el mismo lapso de tiempo a temperatura ambiente, en heladera (4°C), y en freezer (-20°C). El protocolo utilizado fue el estandarizado sin ningún tipo de modificación (sección 3.4).

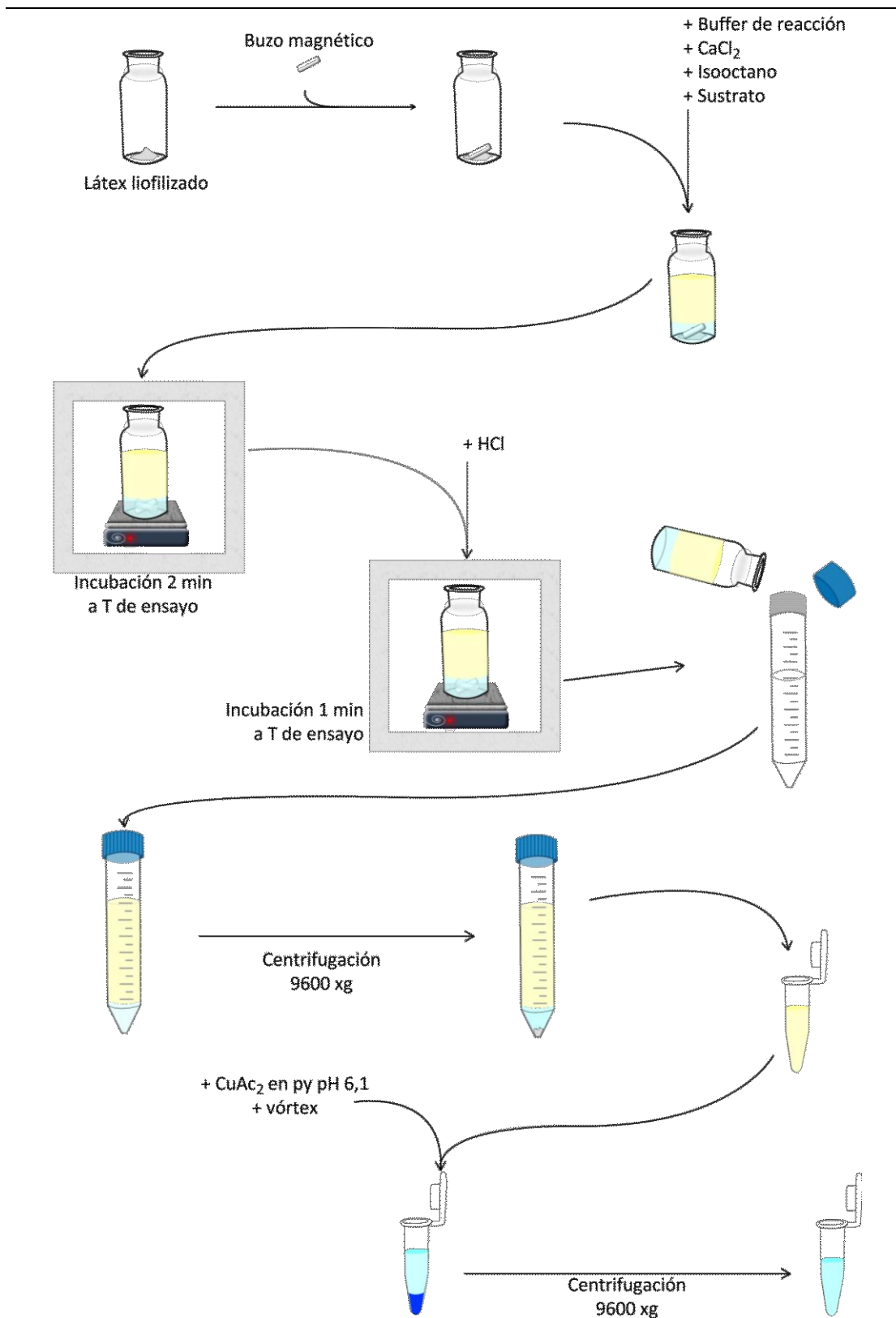


Figura 10: Protocolo de la reacción de hidrólisis del aceite de algodón.

3.8. Reacciones de hidrólisis utilizando sustratos cromogénicos (ésteres de *p*-nitrofenilo)

Se estudió la reacción de hidrólisis de dos ésteres cromogénicos (butirato y laurato de *p*-nitrofenilo, Sigma) adaptando el protocolo descrito por Rashid et al. (2001). El método se basa en la liberación de *p*-nitrofenol y su determinación espectrofotométrica a 410 nm (figura 11).

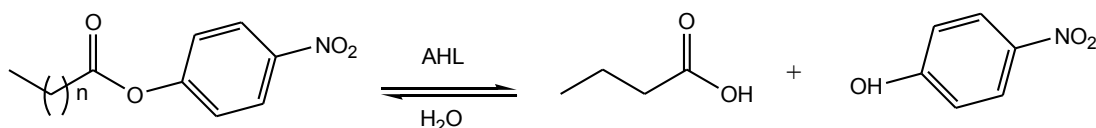


Figura 11: Reacción de hidrólisis de ésteres de *p*-nitrofenilo. n : 3, 11.

La composición de las mezclas de reacción del ensayo estándar se describe en la siguiente tabla (tabla 3).

Tabla 3: Mezcla de reacción

Compuesto	Solución <i>stock</i> de sustrato	Buffer Tris HCl 0.05M pH:8,0 ^(*)	CaCl ₂ 0,5M	Látex liofilizado
Cantidad	300 μ l	5,64 ml	60 μ l	5 mg

(*) Para el caso de laurato de *p*-nitrofenilo como sustrato, se añadió 0,0075% (v/v) de Tritón X-100 (Brocca et al. 2003).

La reacción de hidrólisis enzimática se realizó con agitación magnética utilizando una camisa calefaccionante (37°C). Se tomaron muestras (1 ml) cada 2 min y se midió absorbancia en el espectrofotómetro a 410 nm. Un esquema del protocolo es ilustrado en la figura 12.

En ambos casos, se realizó un ensayo blanco de hidrólisis de los sustratos en ausencia de enzima, midiendo espectrofotométricamente la liberación de *p*-nitrofenol en forma continua a 410 nm durante 15 min (tabla 4). El orden de agregado de reactivos en la cubeta fue: *buffer* de reacción, solución de CaCl₂ y solución *stock* de sustrato, mezclando todo por inversión antes de iniciar las medidas.

Tabla 4: Mezcla para el blanco de reacción

Compuesto	Solución <i>stock</i> de sustrato	Buffer Tris HCl 0.05M pH:8,0 ^(*)	CaCl ₂ 0,5M
Cantidad	50 µl	940 µl	10µ l

^(*) Para el caso de laurato de *p*-nitrofenilo como sustrato, se añadió 0,0075% (v/v) de Tritón X-100.

Tabla 5: Preparación del stock de sustrato

Compuesto	Sustrato (concentración final: 2 mM)	Acetonitrilo	Isopropanol
Cantidad	Butirato de <i>p</i> -nitrofenilo: 2,2 µl (PM:209,20 g/mol; δ:1,19 g/ml)	1,2 ml	4,8 ml
	Laurato de <i>p</i> -nitrofenilo: 3,8 mg (PM:321,41g/mol)	1,2 ml	4,8 ml

Para expresar los resultados en unidades internacionales (UI, siendo 1 UI la cantidad de enzima que libera 1 µmol de *p*-nitrofenol por min en las condiciones del ensayo), se confeccionaron dos rectas de calibración con *p*-nitrofenol (Anedra) utilizando los *buffers* de reacción descritos previamente.

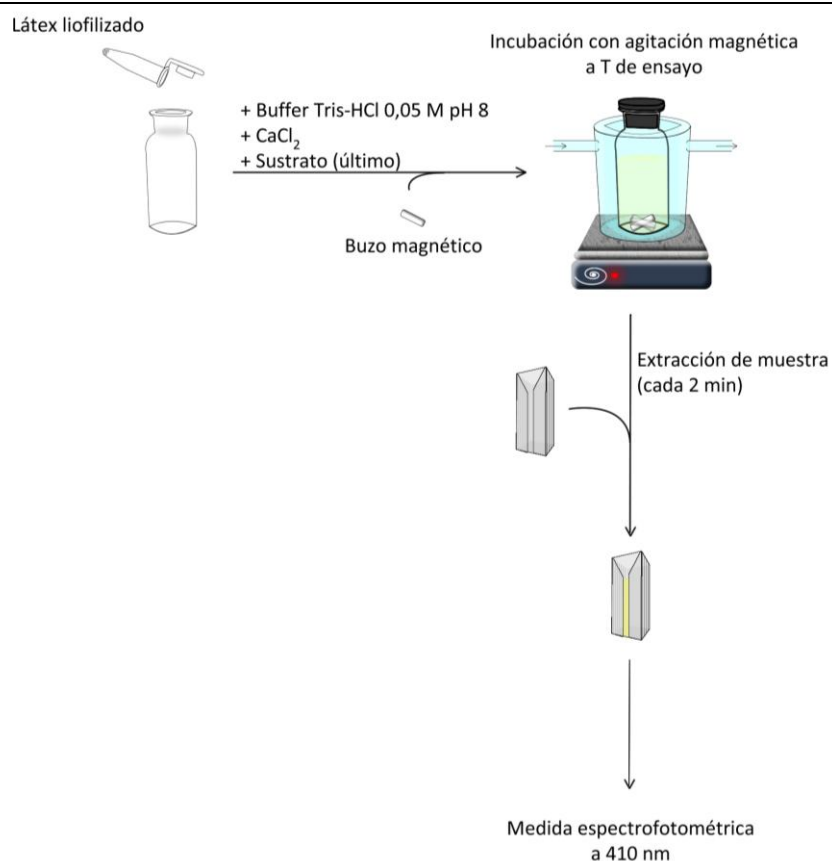


Figura 12: Protocolo de medida de la hidrólisis de un sustrato sintético (ésteres de *p*-nitrofenilo).

3.9. Ensayos de esterificación

3.9.1. Reacción de esterificación. Determinación de la preferencia por el ácido graso

Se ensayó la reacción de esterificación empleando como sustratos ácidos orgánicos de distinta longitud de cadena [butírico, 4 carbonos; hexanoico (caproico), 6 carbonos; dodecanoico (láurico), 12 carbonos] y n-butanol (figura 13), en base al protocolo descrito por Vacek et al (2000). El medio de reacción empleado fue n-hexano. Se preparó una solución stock de sustratos, cuyas concentraciones en ácido orgánico y alcohol fueron 20 y 40 mM respectivamente en el solvente de reacción.

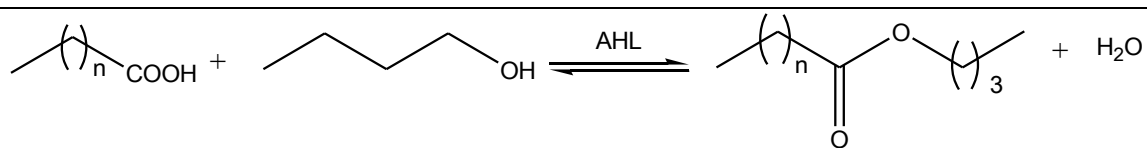


Figura 13: Reacción de esterificación. (n= 2, 4 y 10)

Se pesaron 10 mg de AHL, a la que se le agregó 10 ml la mezcla de sustratos y se llevó a incubar en estufa (40°C) con agitación magnética durante 1 hora en viales de 30 ml cerrados herméticamente. La reacción se detuvo con el agregado de 10 ml de etanol absoluto. Los AG remanentes fueron titulados con una solución etanólica de KOH 0.01 N previamente valorada utilizando biftalato de potasio, y fenolftaleína (solución etanólica 1% p/v) como indicador (figura 14). Se realizó previamente una titulación de un blanco constituido por la mezcla de sustratos sin agregado de enzima en las mismas condiciones descriptas. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. El esquema del procedimiento se muestra en la figura 14.

Los cálculos efectuados fueron:

- Índice de acidez (IA)

$$\text{IA} = \frac{N_{\text{KOH}} \times V_{\text{KOH}} \times P_{\text{equivalente KOH}}}{M_a}$$

Siendo N_{KOH} : normalidad de la solución alcohólica de KOH; V_{KOH} : volumen de la solución de KOH gastado; $P_{\text{equivalente KOH}}$: 56 g, y M_a : masa del ácido en la mezcla.

- Conversión (X%)

$$\text{X\%} = \frac{\text{IA}_{t=0} - \text{IA}_{t=t}}{\text{IA}_{t=0}} \times 100$$

Siendo $\text{IA}_{t=0}$: índice de acidez del blanco; $\text{IA}_{t=t}$: índice de acidez de los AG remanentes una vez finalizada la reacción de esterificación catalizada por AHL.

Se definió la actividad enzimática (AE) como los milimoles de ácido esterificados por min según la siguiente ecuación:

$$\text{AE} = \frac{\text{milimoles AG}_{t=0} \times \text{X\%}}{60\text{min} \times 100}$$

Asimismo, se definió la actividad enzimática específica (AEE) como la actividad enzimática (AE) por mg de AHL.

Valoración del KOH alcohólico. El biftalato de potasio ($\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$) se secó a 110°C en estufa durante una hora. Se disolvieron 15 mg de biftalato de potasio en 20 ml de agua destilada

previamente hervida. Se obtuvo el título de la solución de KOH alcohólico empleando fenolftaleína alcohólica 1% (p/v), realizando el ensayo por quintuplicado.

3.9.2. Temperatura óptima de esterificación

Se realizó el ensayo de esterificación a distintas temperaturas (25°, 30°, 40° y 50° C) durante una hora empleando la misma metodología descrita en el ítem anterior. En este caso, se empleó ácido láurico como sustrato dador de acilo.

3.9.3. Influencia del contenido acuoso en la reacción de esterificación

Para comprobar el efecto del agregado de agua en la reacción de esterificación, se realizó el ensayo en presencia de 0,25; 0,5; 1,0 y 2,0% (v/v) de agua en el medio de reacción. El desarrollo de la misma se realizó siguiendo el protocolo ya descrito.

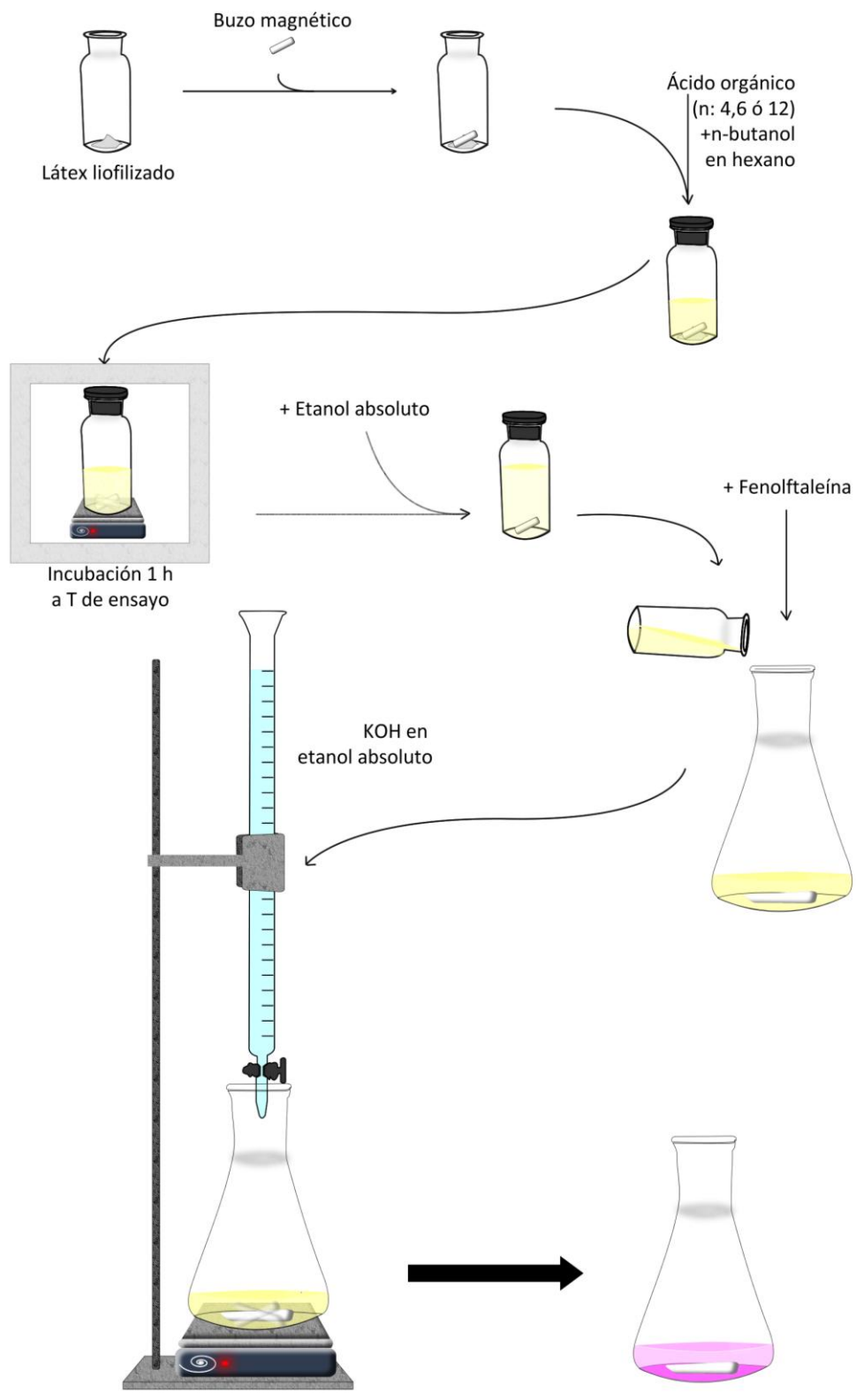


Figura 14: Protocolo de medida de la síntesis de ésteres.

3.10. Síntesis de surfactantes derivados de arginina empleando decilamina y dodecilamina como nucleófilos

Se pesaron 100 mg de látex liofilizado en tubos de ensayo y se les añadió la mezcla de reacción [nucleófilos, decilamina o dodecilamina (Sigma Aldrich) 30 mM y dador de acilo, BAEE (Sigma) 20 mM en acetonitrilo conteniendo 0,25% (v/v) H₂O]. Se preparó un tubo para cada tiempo de reacción. Las mezclas fueron incubadas a 24,48 y 72 horas en estufa a 37 °C con agitación orbital (150 rpm). Una vez transcurrido el tiempo de reacción se le agregó al tubo de ensayo la mezcla de extracción metanol-agua 4:1, se vortereó durante dos minutos. Este paso se realizó 3 veces para extraer el producto adherido al biocatalizador (figura 15). Los extractos obtenidos fueron centrifugados, filtrados a través de membrana de nylon de 0,45 μm (Osmonics) y analizados por HPLC (Agilent 1100 LC). Las condiciones del análisis fueron: columna Lichrosorb 100 propilciano (tamaño de partícula: 5 μm, altura × diámetro del lecho: 250 × 4 mm, Hibar). Las condiciones para las corridas cromatográficas fueron: solvente A, H₂O 0,1% (v/v) TFA; solvente B: ACN/H₂O 80:20 0,1% TFA; velocidad de flujo 1 ml/min; gradiente de elución: 25 a 95% de B en 24 min; longitud de onda de detección: 215 nm (Morcelle et al., 2009).

Tabla 6. Mezcla de sustratos

Compuesto	Nucleófilo 30 mM	BAEE 20mM	Solvente de reacción
Cantidad	Decilamina (C ₁₀ H ₂₃ N) 23,6 mg 157.30 g/mol δ:0,787 g/mL (25°C)	34,3 mg PM:342,8 g/mol	5 ml
	Dodecilamina (C ₁₂ H ₂₇ N) 27,8 mg PM: 185.35 g/mol δ:0,80g/cm ³ (20°C)	34,3 mg PM:342,8 g/mol	5 ml

La identificación de los picos se hizo mediante la inyección de patrones de BAEE y Bz-Arg-OH. La cuantificación relativa de los sustratos, los productos de condensación e hidrólisis fue realizada por comparación de las áreas de los picos respectivos. Los tiempos de retención para cada compuesto fueron: BAEE 5,4 min; Bz-Arg-OH, 4,7 min; Bz-Arg-NHC₁₀, 14,0 min; Bz-Arg-NHC₁₂, 14,8 min.

El patrón de Bz-Arg-OH se preparó por hidrólisis efectuada por papaína de BAEE 30 mM a 37°C en *buffer* fosfatos 0,1 M pH 7,0 durante 30 min. La enzima fue precipitada con metanol y separada por centrifugación. La Bz-Arg-OH fue recuperada por evaporación del solvente y solubilizada en metanol para los análisis por HPLC.

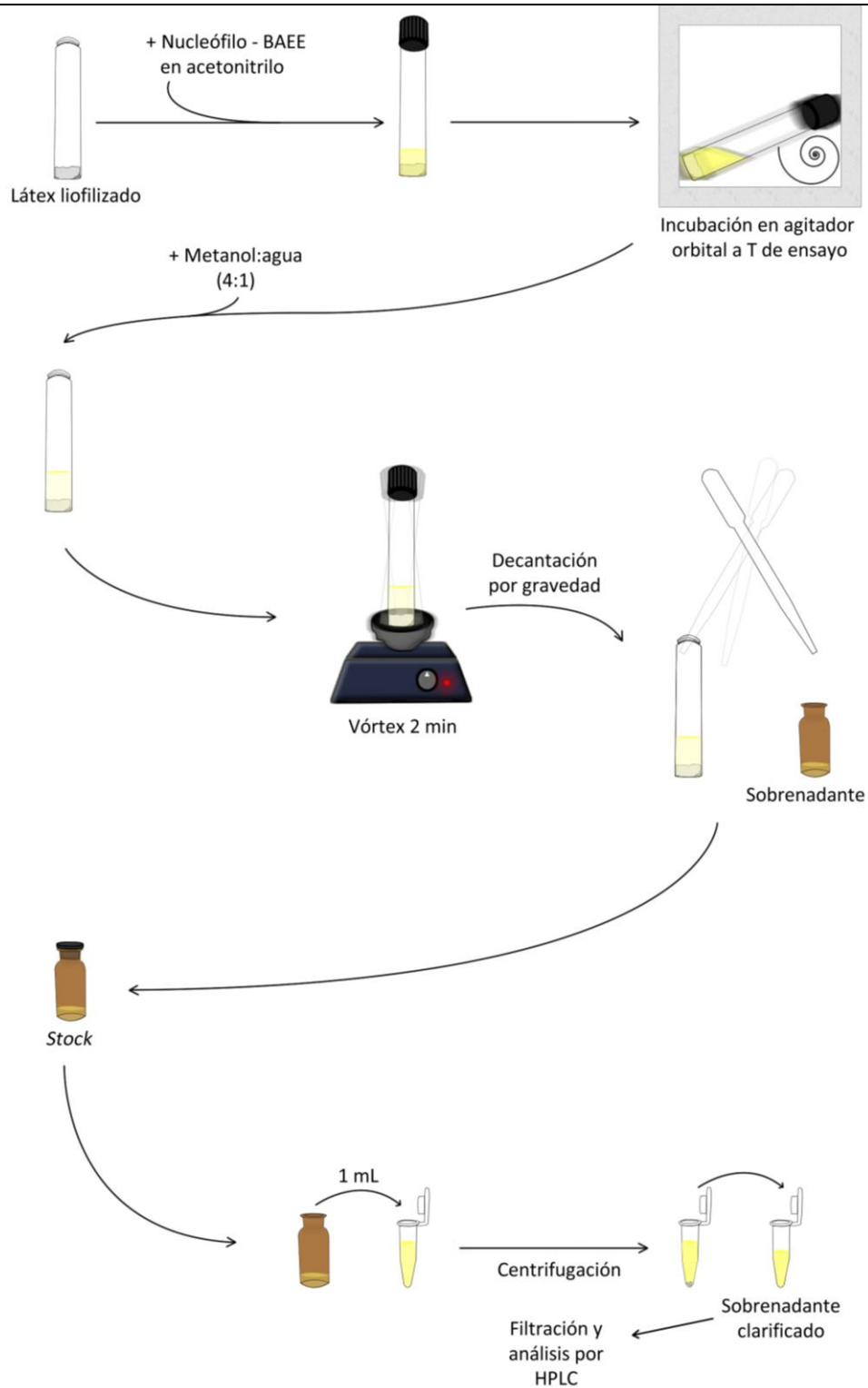


Figura 15: Reacción de síntesis de surfactantes.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Obtención de lipasas del látex de *Araujia hortorum*. Optimización de la separación del material insoluble

A comienzos de los años 1990, se reportó la presencia de enzimas lipolíticas en el látex de algunas especies de Asclepiadaceae, Euphorbiaceae y Caricaceae, hallándose en la fracción insoluble del látex (Giordani, et al., 1991). Para el caso en estudio, se ensayaron distintas condiciones de recolección de látex con el fin de recuperar la mayor cantidad de material insoluble posible. A tal fin, se probaron distintas variables, tales como recuperación de las gomas en suspensión en el sobrenadante obtenido luego de la primera centrifugación [empleando el sobrenadante entero o diluido, (ver materiales y métodos figura 7) y posterior centrifugación, así como dilución del sobrenadante en *buffer* de pH 4,5 y subsiguiente centrifugación (figura 8). Dado que en ninguna de las operaciones demostró una mejoría significativa en el proceso inicial (centrifugación del látex recolectado según se indica en la figura 8) se procedió a hacer todos los ensayos correspondientes a este trabajo con la fracción insoluble obtenida luego de la primera centrifugación.

4.2. Actividad lipolítica presente en el látex de *Araujia hortorum*

4.2.1. Determinación de la presencia de actividad lipolítica

Se ensayó en forma cualitativa la actividad lipásica en las dos fracciones obtenidas luego de centrifugar el látex recogido de los frutos de *A. hortorum*, es decir, en la fracción soluble en agua, el pellet, y el látex sin fraccionar, según el método de Kwon y Rhee (1986). Estas medidas fueron realizadas en forma cualitativa, para poner de manifiesto la presencia de enzimas con actividad lipolítica en dicho látex y determinar en qué fracción se encuentra dicha actividad. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7.

Tabla 7

Muestra	Actividad lipolítica
Látex entero	+++
Fracción insoluble	+++
Fracción soluble	-

De esta manera, se confirma que para *A. hortorum* lo reportado para otras especies vegetales productoras de látex, en las cuales la actividad lipolítica fue hallada en las gomas insolubles (Chen et al., 2005; Ng y Tsai, 2006; Cambon et al., 2009; Palocci et al., 2003).

4.2.2. Optimización del ensayo de actividad lipolítica

Con el fin de ajustar el protocolo al instrumental disponible, se procedió a modificar el tiempo y los volúmenes de reacción, manteniendo constante la masa de biocatalizador (5 mg). Los tiempos ensayados fueron 30, 5 y 2 min, siendo el más adecuado el tiempo de reacción de 2 min, ya que es el tiempo mínimo en el que se puede llevar a cabo el ensayo en una forma operativamente aceptable. Sin embargo, dado que los valores de absorbancia obtenidos fueron superiores a la unidad (tabla 8) sobrepasando los límites analíticamente convenientes, se procedió a ajustar los volúmenes de reacción. En este sentido, se duplicaron todos los volúmenes de reactivos a excepción del volumen del sustrato que se mantuvo en 0,5 ml. Los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8

Tiempo de reacción	Absorbancia a 715 nm
5 min	1,9282
5 min	2,0156
2 min	1,5441
2 min	1,3774

Tabla 9: Medidas de actividad lipolítica con el protocolo estandarizado.

Masa de Biocatalizador (mg)	Absorbancia (715 nm)	Actividad (UE)	Actividad Promedio	Desviación estándar
5,1	0,3070	0,0301	0,02630	± 0,0035
5,5	0,2552	0,0232		
5,3	0,2714	0,0256		
5,4	0,2797	0,0259	0,02500	± 0,0012
5,7	0,2702	0,0237		
5,7	0,2896	0,0254		
5,1	0,2652	0,0260	0,02473	± 0,0016
5,2	0,2382	0,0229		
5,9	0,2985	0,0253		
5,4	0,2894	0,0268	0,02660	± 0,0003
5	0,2670	0,0267		
5,8	0,3051	0,0263		

Una vez ajustados tiempo y volúmenes, se analizó la homogeneidad de la distribución en la fase iso octano de ácidos grasos resultantes de la hidrólisis, se procedió a tomar muestras de tres fracciones diferentes de la fase orgánica (ver figura 9) y a analizar la presencia de los ácidos grasos a partir de la reacción de formación del complejo con el Cu^{2+} . Los resultados obtenidos se presentan en la siguiente tabla (tabla 10).

Tabla 10: Medidas de actividad lipolítica con protocolo estandarizado en tres niveles de fase orgánica.

Masa de biocatalizador (mg)	Nivel	Actividad	Media	Desviación estándar
5	Superior	0,0392	0,0377	±0,0019
	Medio	0,0394		
	Inferior	0,0457		
5	Superior	0,0442		
	Medio	0,0437		
	Inferior	0,0412		
5,1	Superior	0,0429		
	Medio	0,0432		
	Inferior	0,0429		
4,6	Superior	0,055	0,0487	±0,0069
	Medio	0,0572		
	Inferior	0,0531		
4,8	Superior	0,0515		
	Medio	0,0468		
	Inferior	0,0477		
4,5	Superior	0,0369		
	Medio	0,0413		
5	Superior	0,0347		
	Medio	0,0327		
	Inferior	0,0344		
5	Superior	0,0321		
	Medio	0,0334		
	Inferior	0,0334		
5,3	Superior	0,0285		
	Medio	0,0293		
	Inferior	0,0285		
4,9	Superior	0,0367	0,0381	±0,0023
	Medio	0,0367		
	Inferior	0,037		
4,9	Superior	0,0364		
	Medio	0,0368		
	Inferior	0,0364		
4,8	Superior	0,0395		
	Medio	0,0418		
	Inferior	0,0419		

Una rápida inspección de los resultados obtenidos permite concluir que la composición en ácidos grasos de la fase orgánica separada luego de la reacción es homogénea.

4.3. Determinación de pH óptimo

4.3.1 Efecto del pH sobre la actividad enzimática

La mayoría de las enzimas poseen un pH característico al cual su actividad es máxima. Aunque los perfiles de las curvas de actividad en función del pH de muchas enzimas son acampanados, pueden variar considerablemente de forma. La relación entre el pH y la actividad de cualquier enzima depende del comportamiento ácido base de la enzima y del sustrato así como de otros muchos factores que son por lo general difíciles de analizar cuantitativamente. La forma de la curva de actividad-pH varía con la concentración del sustrato, ya que el valor de K_m de muchos enzimas varía con el pH.

El pH óptimo de una enzima no es necesariamente idéntico al pH de su entorno intracelular normal, el cual puede hallarse a su vez en la pendiente ascendente o descendente de su curva de pH-actividad. Este hecho sugiere que la relación pH-actividad de una enzima puede constituir un factor en el control intracelular de su actividad (Seguel 1982).

Se determinó el pH óptimo de AHL según el protocolo de actividad estandarizado en el punto anterior, pero empleando los *buffers* de Good para evitar la influencia de la fuerza iónica sobre la actividad de la enzima. Se vio que el mismo está comprendido entre los pH 8 y 9 siendo el último en el que se observó la mayor actividad (figura 16).

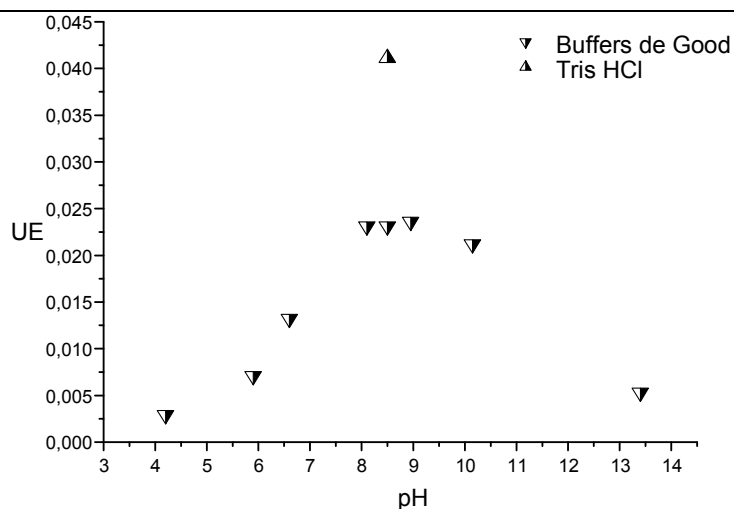


Figura 16: pH óptimo.

Notablemente, se observó que en presencia de *buffer* Tris-HCl 0,1 M de pH 8,5, la actividad fue 87% mayor que para el mismo valor de pH con el *buffer* de Good. Esto se debería al mencionado efecto de la fuerza iónica o del tipo de ión sobre la actividad enzimática.

En este aspecto, AHL ha demostrado tener su actividad óptima en un rango de pH neutro a alcalino, como otras lipasas caracterizadas de otros organismos. Por ejemplo, la lipasa de *Bacillus subtilis* posee un pH óptimo de pH 10,0 (Lesuisse et al. 1993). La lipasa de *Rhizopus oryzae* presentó un pH óptimo de 8,5, siendo prácticamente nula a pH ácido (Essamri et al. 1998). La lipasa de *Yarrowia lipolytica* presentó actividad a pH cercano a la neutralidad, siendo el pH óptimo 7,0 (Destain et al. 1997).

En cuanto a lipasas vegetales, en las semillas de ricino (*Ricinus communis*, Euphorbiaceae), se expresan en diferentes lapsos de tiempo durante la germinación, y se caracterizan por tener distintos pH óptimos. La primera es una lipasa ácida con su pH óptimo de pH 5,0 y la segunda es una lipasa alcalina que presenta su pH óptimo a pH 9,0 (Muto y Beevers, 1974). En la lipasa presente en el aceite del fruto de la palmera (*Elaeis guineensis*, Arecaceae) se reportó un pH óptimo comprendido entre los valores 9 y 10 (Ngando et al., 2006). En el látex de *Euphorbia characias* se halló una lipasa con un pH óptimo de 5,0, en tanto que en *Euphorbia wulfenii* el pH óptimo de la lipasa caracterizada fue de 8,0 (Palocci et al., 2003). Las lipasas presentes en el látex de *Plumeria rubra* presentaron dos pH óptimos (4 y 7) en tanto que la presente en el látex de *Vascocellea x heilbornii* tuvo un pH óptimo de 7 (Cambon et al., 2006).

La lipasa de *Carica papaya* (CPL) demostró tener un pH óptimo en las cercanías de 8,5 para la hidrólisis del aceite de oliva (Ng y Tsai, 2006), un valor muy similar al hallado para AHL.

4.4. Determinación de temperatura óptima

Al igual que ocurre con la mayoría de las reacciones químicas, la velocidad de las reacciones químicas, la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas se incrementa en general con la temperatura, dentro del intervalo en el que la enzima es estable y permanece totalmente activo. La velocidad de muchas reacciones enzimáticas se duplica, aproximadamente, por cada 10°C de aumento de la temperatura ($Q_{10}= 2,0$). Sin embargo, el coeficiente de temperatura Q_{10} varía algo de una enzima a otra según la energía de activación de las reacciones catalizadas.

Aunque las reacciones catalizadas por las enzimas parecen con frecuencia, poseer una temperatura óptima, el pico que se observa al representar la actividad catalítica frente a la

temperatura se produce porque las enzimas, al ser proteínas, se desnaturalizan por acción del calor y se inactivan cuando la elevación de la temperatura sobrepasa un cierto punto.

La aparente temperatura óptima es, por tanto, la resultante de dos procesos: 1) el incremento habitual de la velocidad de reacción con la temperatura, y 2) el incremento en la velocidad de desnaturalización térmica de la enzima al sobrepasar una temperatura crítica. Aunque la mayoría de enzimas se inactivan a temperaturas comprendidas entre 55 y 60 °C, algunas de ellas son completamente estables y conservan su actividad a temperaturas muy superiores (Seguel 1982).

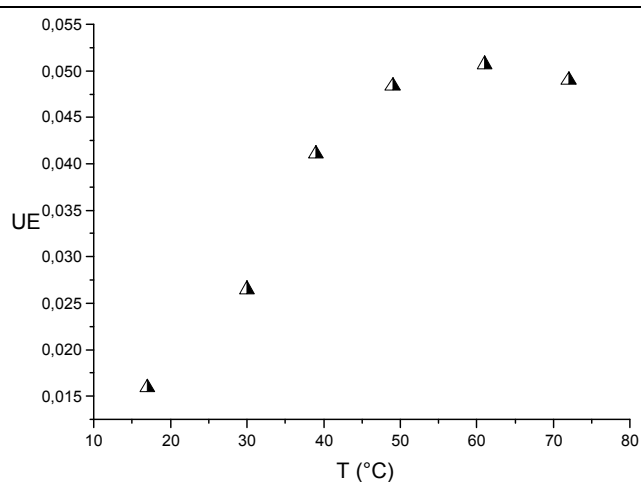


Figura 17: Temperatura óptima.

La temperatura óptima se realizó utilizando siempre el *buffer* de reacción (Tris HCl pH 8,5 0,1M). Se observó una actividad creciente con un máximo de actividad en torno a los 60°C (figura 17). En los ensayos de actividad lipolítica se tomó como temperatura de ensayo 40°C, ya que a ésta la enzima presentó una elevada actividad y además se encuentra alejada del punto de ebullición del isooctano.

En otros ejemplos de lipasas la temperatura óptima de actividad suele ser menor que la que presenta la lipasa de *Araujia hortorum*. La lipasa de *B. subtilis*, por ejemplo, presenta una temperatura óptima de 35°C (Lesuisse et al., 1993). La lipasa de *Rhizopus oryzae* tiene una temperatura óptima de 30 °C (Essamri et al., 1998), en tanto que la de *Yarrowia lipolytica* es de 37°C (Destain et al., 1997).

En cuanto a lipasas vegetales, la lipasa presente en el aceite del fruto de la palmera (*Elaeis guineensis*, Arecaceae) presenta una temperatura óptima de 45°C (Ngando et al., 2006). Una

lipasa purificada de arroz (*Oriza sativa*) presentó una temperatura óptima de 80°C (Bhardwaj et al., 2001). Las lipasas de látex de *Plumeria rubra* y *Vascocellea heilbornii* tienen temperaturas óptimas de 55°C y 50°C respectivamente (Cambon et al., 2006), valores cercanos a los obtenidos para AHL.

4.5. Estabilidad al almacenamiento

Se ensayó la estabilidad de la enzima al almacenamiento en diferentes condiciones (-20°C; 4°C y temperatura ambiente) en el lapso de tiempo de 15 meses.

En el gráfico (figura 18) se puede ver una tendencia a la disminución de la actividad frente a un almacenamiento a temperatura ambiente. La actividad disminuye un 41,8% con respecto a la actividad inicial. Para el caso del almacenamiento a -20°C y 4°C no se observó una diferencia significativa en la actividad enzimática. Ambas actividades se redujeron de manera similar, disminuyendo a 4°C un 15% y a -20°C un 9,9 % con respecto a la actividad inicial.

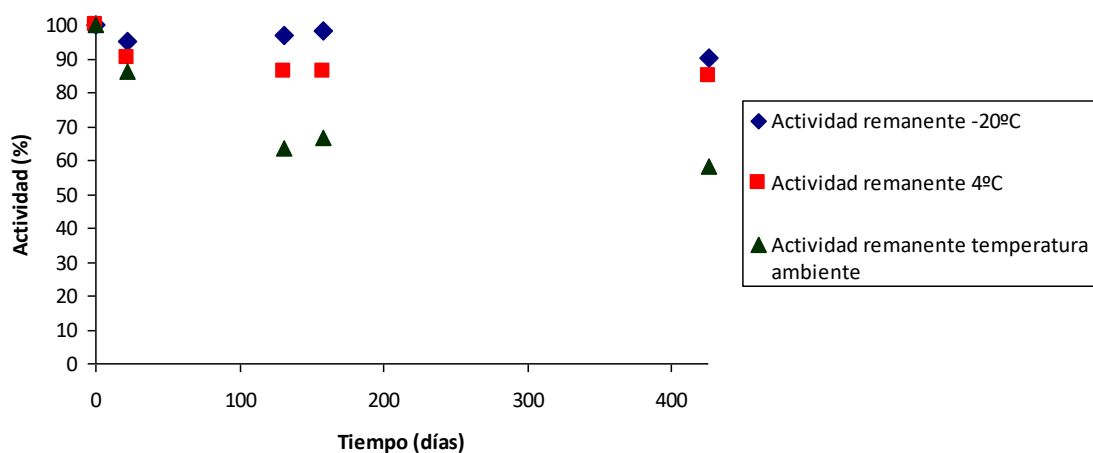


Figura 18: Estabilidad al almacenamiento.

4.6. Hidrólisis utilizado sustratos cromogénicos (ésteres de *p*-nitrofenilo)

Se estudió la actividad de AHL utilizando butirato y laurato de *p*-nitrofenilo. Debido a que se encontró que las partículas de látex en las que se está inmersa AHL flotaban en la mezcla de reacción y esto hacía imposible la realización de la misma directamente en la cubeta espectrofotométrica, se estandarizó la técnica empleando camisa calefactora con agitación magnética, se tomó una alícuota del sobrenadante cada 2 min durante 12 min y se determinó

la absorbancia a 410 nm. En el caso de la reacción blanco, se determinaron lecturas continuas en el espectrofotómetro. Se calculó la actividad enzimática en unidades internacionales (UI) utilizando las curvas de calibración de *p*-nitrofenol previamente definidas.

4.6.1. Efecto de la masa de biocatalizador sobre la velocidad de hidrólisis de los sustratos cromogénicos

Se realizó la determinación del efecto de la masa de biocatalizador en las reacciones de hidrólisis de los sustratos cromogénicos, a fin de determinar la masa más apropiada de los mismos para realizar cada una de las reacciones propuestas.

Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 19 y 20.

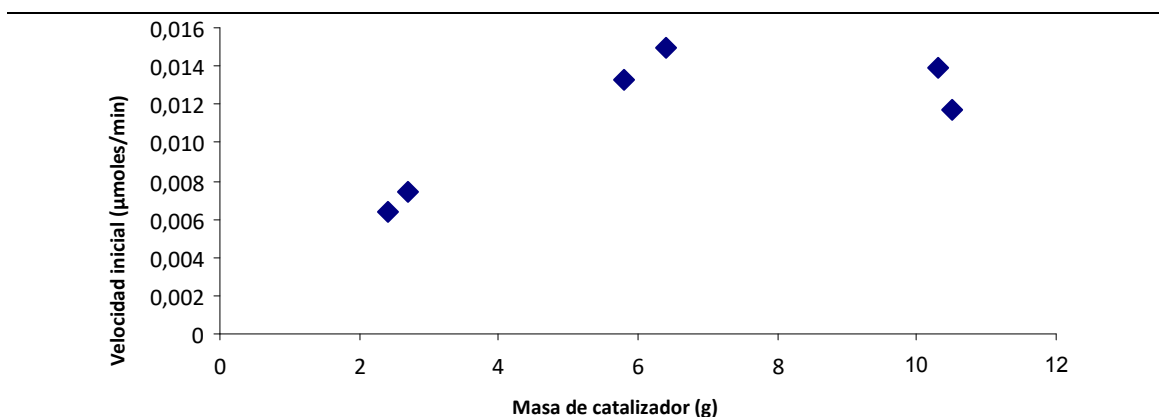


Figura 19: Efecto de la masa de biocatalizador sobre la velocidad de hidrólisis de butirato de *p*-nitrofenilo.

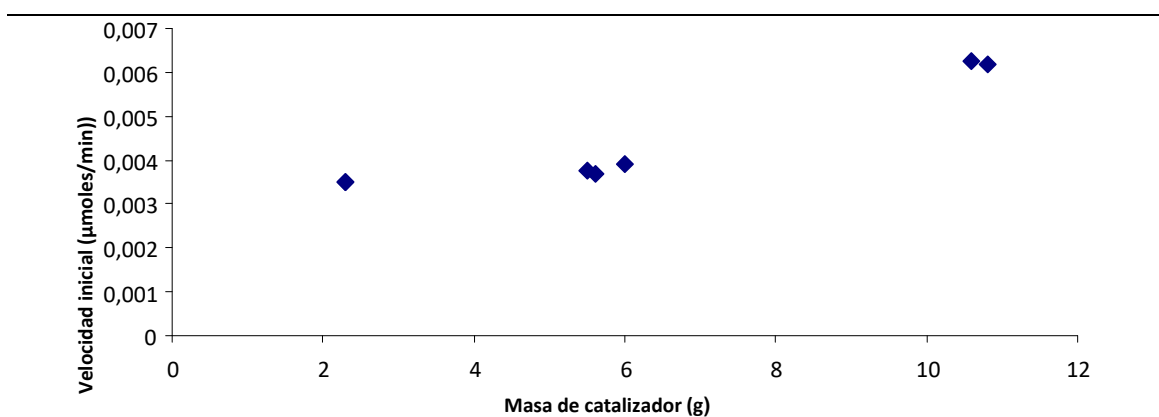


Figura 20: Efecto de la masa de biocatalizador sobre la velocidad de hidrólisis de laurato de *p*-nitrofenilo.

De las gráficas puede concluirse que, en el caso de butirato de *p*-nitrofenilo como sustrato, la masa óptima de AHL para realizar los ensayos está comprendida entre 2,5 y 5 mg de biocatalizador, ya que se puede apreciar que con masas mayores del mismo no hay un aumento en la velocidad de hidrólisis de dicho sustrato (figura 19). Por el contrario, la velocidad de hidrólisis de laurato de *p*-nitrofenilo fue siempre creciente para las masas de biocatalizador ensayadas, con lo cual se concluyó que 2,5 mg sería masa óptima de biocatalizador para este ensayo (figura 20).

4.6.2. Especificidad de sustrato

En el caso de AHL se observa una mayor preferencia por el butirato de *p*-nitrofenilo frente a laurato de *p*-nitrofenilo. Esta observación queda evidenciada en las velocidades iniciales calculadas para 2,5 gramos de biocatalizador (tabla 11).

Tabla 11: Velocidades iniciales de hidrólisis.

Sustrato	Velocidad inicial (µmoles/min)
Laurato de <i>p</i> -nitrofenilo	0,0035
Butirato de <i>p</i> -nitrofenilo	0,0069

En este sentido, se ha reportado actividad relativa de la lipasa KB-Lip (lipasa de *Pseudomonas sp.*) frente a diversos ésteres *p*-nitrofenilo a 30°C a pH 8,0. La lipasa mostró la mayor actividad con caprato de *p*-nitrofenilo (grupo acilo de 10 C). Ésteres *p*-nitrofenilo con grupos acilo de cadena media parecen ser buenos sustratos para KB-Lip, mientras que los ésteres de *p*-nitrofenilo con grupos acilo mas cortos de 6 C son sustratos pobres (Rashid et al., 2001).

4.7. Ensayos de esterificación

En los métodos convencionales de producción de ésteres, el ácido sulfúrico se utiliza comúnmente debido a sus altas conversiones, pero presenta varios problemas, tales como la formación de subproductos o productos de polimerización. Ácidos sulfónicos tales como ácido benceno sulfónico, ácido *p*-toluenosulfónico o ácido metsulfónico, son menos corrosivos que

los ácidos fuertes, pero necesitan temperaturas más altas de operación y además promueven reacciones de oxidación. El uso de estos catalizadores homogéneos presenta algunos problemas en la separación éster-catalizador. El aumento de los pasos de operación implica un aumento en los costos de producción (Aracil et al., 2006).

A principios de 1980, fueron estudiados nuevos procesos catalíticos heterogéneos, y los mismos fueron desarrollados para evitar los problemas generados por los métodos tradicionales. La aplicación de enzimas como catalizadores para reacciones de esterificación se ha investigado seriamente. En la naturaleza las lipasas catalizan la hidrólisis de grasas. En aplicaciones industriales las lipasas se utilizan para catalizar tanto la reacción de hidrólisis, como la de síntesis de ésteres, dependiendo de las condiciones de reacción seleccionadas. Las lipasas catalizan la reacción de esterificación en condiciones de operación suaves, alcanzan altas conversiones y alta especificidad (Aracil et al., 2006).

4.7.1. Determinación de la preferencia por el ácido graso

Se realizó el ensayo de esterificación de distintos ácidos (butírico, caproico y láurico) utilizando n-butanol como nucleófilo utilizando hexano como solvente de reacción (Mukherjee y Kiewitt, 1996). Los resultados se muestran en la tabla 12:

Tabla 12

Ácido graso	Actividad enzimática específica (AEE, moles ácido consumidos/h x mg biocatalizador)	% Conversión de sustrato
Ác. butírico (4C)	0,0042	26±5
Ác. caproico (6C)	0,0025	15±1
Ác. láurico (12C)	0,0045	28±5

Puede observarse una leve preferencia por el ácido láurico frente al resto de los ácidos ensayados. En este aspecto, CPL (lipasa de *C. papaya*) también demostró tener una preferencia mayor por el ácido láurico frente a ácidos de menor número de carbonos, siendo máxima dicha preferencia para los ácidos palmítico y esteárico en diversos ensayos de esterificación (Gandhi y Mukherjee, 2000; Gandhi y Mukherjee, 2001; You et al., 2011).

4.7.2. Temperatura óptima de esterificación

Se ensayó la esterificación de n-butanol con ácido láurico (12 C) a 25°, 30°, 40° y 50° C. (figura 21). Se observó que la temperatura óptima de reacción fue de 50°C, aunque el valor hallado fue apenas levemente superior a los del rango comprendido entre 30 y 50°C. Un resultado similar se observó para la lipasa de *Candida rugosa* en la esterificación de fitoesteroles de canola (Villeneuve et al., 2005). Por otro lado, para la lipasa de *C. papaya* se observó un máximo de actividad comprendido entre los 45 y 60°C en la reacción de esterificación del ácido (R)-2-(4-clorofenoxi)-propiónico con trimetilsililmetanol en ciclohexano anhidro (Cheng y Tsai, 2004).

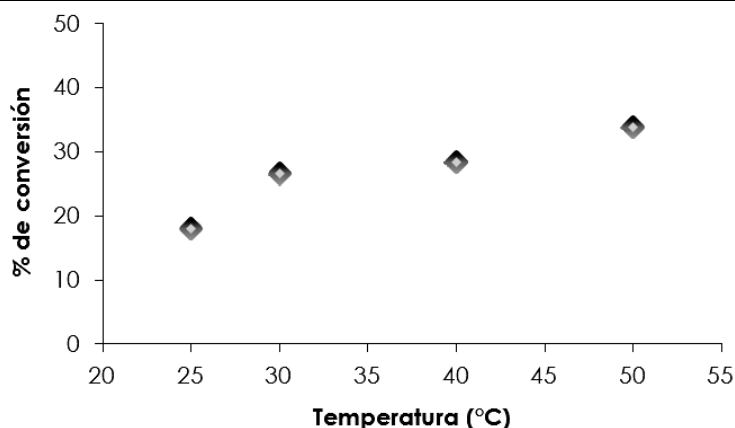


Figura 21: Temperatura óptima de esterificación.

4.7.3. Influencia del contenido acuoso en la reacción de esterificación

En medio acuoso, la mayoría de las lipasas se activan por la presencia de una interfase agua / lípido, un fenómeno conocido como activación interfacial, que implica el desplazamiento de una estructura de superficie llamada *lid* (tapa). Aunque ni la presencia de una estructura de tapa ni la aparición de activación interfacial es un requisito estricto para que una enzima sea clasificada dentro de esta familia, este motivo estructural y el mecanismo de activación son comunes a la mayoría de las lipasas descritas hasta la fecha. Las lipasas activadas por la interfase pueden encontrarse en estados conformacionales alternativos, dotados con actividades diferentes: en la conformación cerrada la tapa cubre el sitio activo de la enzima, volviéndolo inaccesible para las moléculas de sustrato, mientras que su transición a

la conformación abierta, permite la entrada al túnel catalítico. Las tapas son estructuras anfipáticas; en la estructura de enzima cerrada, el lado hidrofílico está expuesto al solvente, mientras que el hidrofóbico se dirige hacia el núcleo de la proteína. A medida que la enzima cambia a la conformación abierta, el lado hidrofóbico queda expuesto y contribuye a la región de unión al sustrato (Brocca et al., 2003).

Se ensayó la reacción de síntesis añadiendo distintas proporciones de agua [0,25; 0,5; 1,0 y 2,0% (v/v)] en el medio de reacción (hexano). En ninguno de los casos ensayados se observó formación de producto, con lo cual AHL no presentaría activación interfacial.

4.8. Síntesis de surfactantes derivados de arginina empleando distintas aminas grasas como nucleófilos

Los surfactantes representan un conjunto de productos químicos que son consumidos en grandes cantidades diariamente a escala mundial. Por esta razón, es importante que sean compuestos biocompatibles y biodegradables, ya que pueden afectar de manera adversa los ecosistemas acuáticos (Morán et al., 2004). Teniendo en cuenta este aspecto, y haciendo uso de la biocatálisis, se han desarrollado moléculas basadas en estructuras naturales anfífilas, como aquellas que mimetizan los lipoaminoácidos naturales. Además de sus excelentes propiedades tensioactivas, y debido a su estructura simple y similar a los de origen natural (biosurfactantes), este tipo de compuestos ha demostrado baja toxicidad y buena biodegradabilidad. Los aminoácidos son una materia prima valiosa para la preparación de surfactantes. Inicialmente, se aplicaron como conservantes con aplicaciones medicinales y cosméticas. Luego se halló que tenían actividad contra bacterias, virus, tumores, etc. Los surfactantes derivados de arginina consisten en una clase de compuestos con actividad antimicrobiana contra un amplio espectro de bacterias, buena biodegradabilidad y baja toxicidad (Moran et al., 2001a; Moran et al., 2002; Clapes et al., 1999; Castillo et al., 2006a; Moran et al., 2001b; Castillo et al., 2006b).

Se ha demostrado que el derivado N^α -benzoil arginina dodecilamida (Bz-Arg-NHC₁₂) presenta una muy buena actividad bacteriostática y bactericida frente a microorganismos tales como *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* (Fait, 2011). Por otro lado, dos derivados de Bz-Arg-alquilamidas (Bz-Arg-NHC₁₀ y Bz-Arg-NHC₁₂) fueron sintetizados exitosamente empleando diversos extractos proteolíticos de origen vegetal (Morcelle et al., 2009). Las lipasas presentan el fenómeno de promiscuidad (poseen una especificidad de

sustrato relajada) (Hult y Berglund 2007) y por lo tanto son capaces de aceptar como sustratos derivados de aminoácidos en reacciones de esterificación o amidación (Morán et al., 2001). En este aspecto, se evaluó el desempeño de AHL como biocatalizador en la síntesis de Bz-Arg-NHC₁₀ y Bz-Arg-NHC₁₂ y se comparó con los resultados obtenidos empleando peptidasas vegetales como catalizadores en dichas reacciones en iguales condiciones (Morcelle et al., 2009; Fait, 2011).

En la Tabla 13, se muestran los valores de conversión de sustrato (es decir, cantidad de sustrato que fue convertido en producto), así como y las proporciones de Bz-Arg-alquilamida obtenida (porcentaje de aminólisis, figura 22) y de producto de hidrólisis formado (porcentaje de hidrólisis, figura 23). La máxima conversión de sustrato se produjo a las 48 h de reacción. Los perfiles cromatográficos de los ensayos pueden apreciarse en las figuras 24 y 25.

Tabla 13

Producto	Tiempo de reacción	% Conversión del sustrato	% Aminólisis	% Hidrólisis
Bz-Arg-NHC ₁₀	48 h	82	36	64
Bz-Arg-NHC ₁₂	48 h	82	19	81

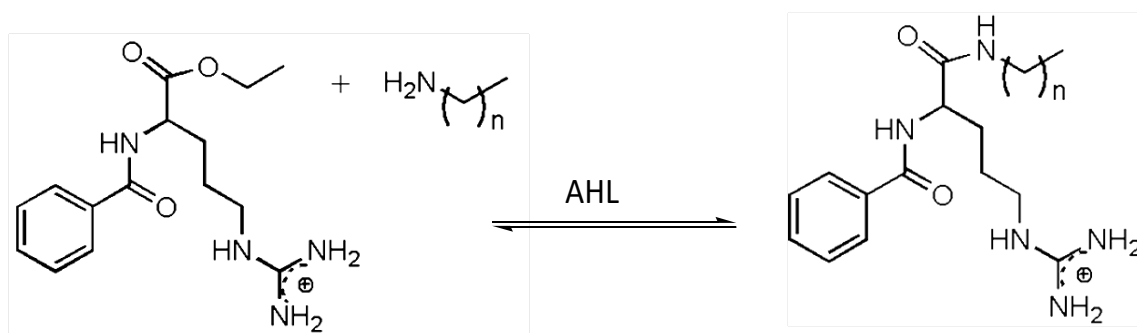


Figura 22: Reacción de formación de Bz-Arg-alquilamidas. n: 9 (decilamina); 11 (dodecilamina).

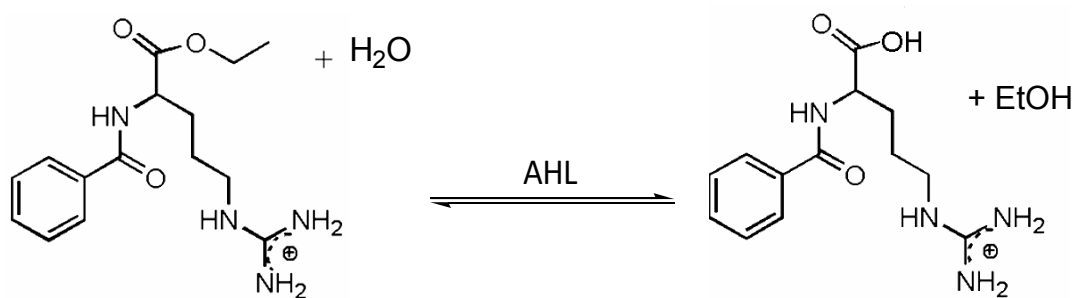


Figura 23: Reacción de hidrólisis de BAEE.

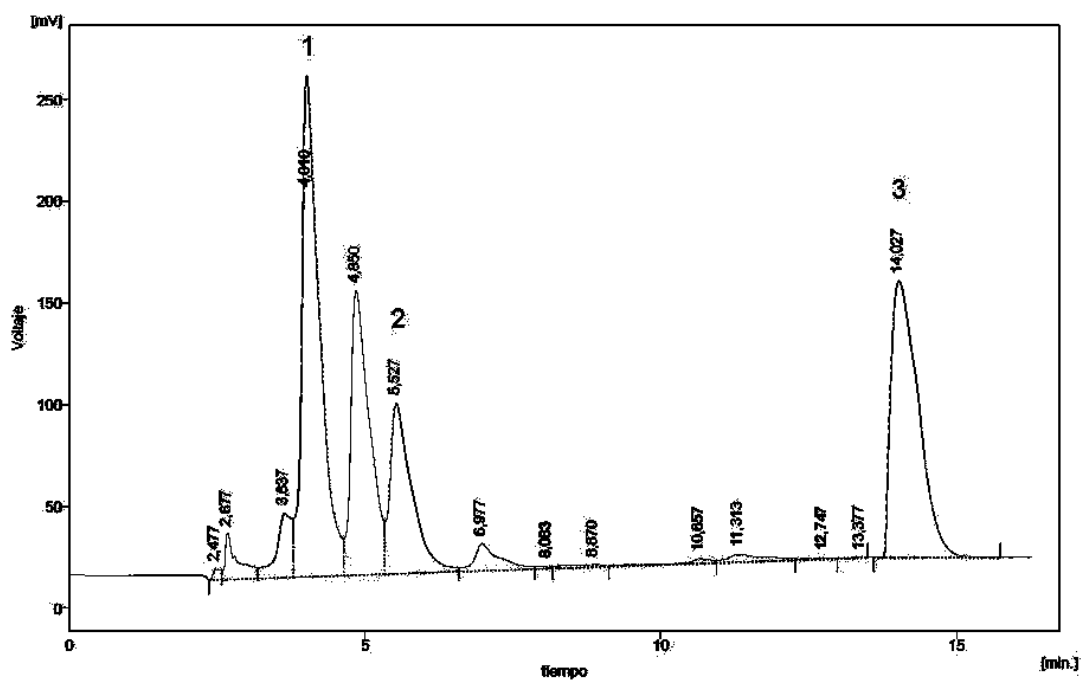


Figura 24: Síntesis de Bz-Arg-NHC₁₀ empleando AHL como biocatalizador. 1 Bz-Arg-OH;
2 BAEE; 3 Bz-Arg-NHC₁₀.

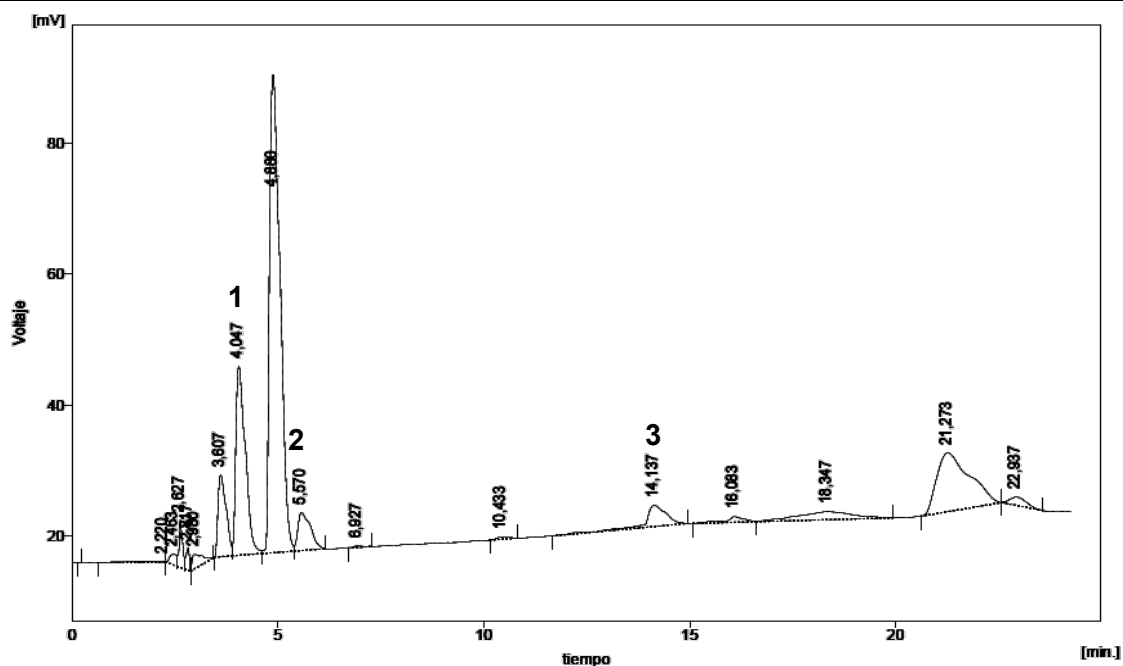


Figura 25: Síntesis de Bz-Arg-NHC₁₂ empleando AHL como biocatalizador. 1 Bz-Arg-OH; 2 BAEE; 3 Bz-Arg-NHC₁₂.

En general, AHL demostró tener una mayor preferencia para catalizar la reacción de hidrólisis (formación de Bz-Arg-OH) que la de aminólisis (síntesis de Bz-Arg-alquilamidas) en las condiciones ensayadas, al contrario que lo que acontece con la misma reacción catalizada por peptidasas (Morcelle et al., 2009). Esto se debería, probablemente, a la presencia de agua en el medio de reacción que, aunque muy poca, sería suficiente para favorecer dicha reacción de hidrólisis. Esto se puede correlacionar con lo visto para el efecto del agregado de agua al medio de reacción en los ensayos de esterificación, en los cuales no se observó la formación del producto esperado.

Por otro lado, pudo comprobarse que AHL mostró una mayor preferencia por la alquilamina de menor número de carbonos (decilamina).

5. CONCLUSIONES

Por medio de los resultados alcanzados en este trabajo, se pudo arribar a las siguientes conclusiones:

- Se encontró actividad lipolítica en el látex extraído de los frutos de *Araujia hortorum* Fourn.
- Dicha actividad se halló en la fracción insoluble del mismo.
- Se logró estandarizar un método de medida colorimétrico de la actividad hidrolítica, utilizando aceite de algodón como sustrato.
- Se encontró que el pH óptimo de la lipasa estudiada ronda entre los valores de pH 8,0 y 9,0.
- Se determinó que la temperatura óptima de la enzima se encuentra entre los valores 55 y 60 °C.
- La lipasa resultó presentar una buena estabilidad frente a distintas temperaturas de almacenamiento, especialmente a 4 y a -20 °C.
- En cuanto a la hidrólisis de compuestos *p*-nitrofenilados, se vio una preferencia de la enzima por el butirato de *p*-nitrofenilo como sustrato.
- En cuanto a la síntesis de ésteres, se vio una preferencia similar para el ácido butírico y el ácido láurico y una menor para el ácido caproico.
- La temperatura óptima hallada para la reacción de esterificación fue de 50 °C empleando hexano como medio de reacción.
- La esterificación no ocurre en presencia de agua en el medio de reacción (hexano).
- En cuanto a la reacción de síntesis de surfactantes, se observó que el principal producto fue el de hidrólisis (Bz-Arg-OH) del sustrato dador de acilo. Esto tal vez se deba a la presencia de agua en el medio de reacción. Además, la enzima presentó un mayor rendimiento de producto esperado cuando el nucleófilo utilizado fue decilamina.

6. PERSPECTIVAS

- Determinación de la estabilidad de AHL a distintas temperaturas y pH de incubación.
- Repetición del ensayo de hidrólisis de butirato de *p*-nitrofenilo agregando el tensioactivo Tritón X-100 al *buffer* de reacción, a fin de observar el efecto del mismo sobre la velocidad de hidrólisis de dicho sustrato en presencia de AHL.
- Realización del ensayo de síntesis de los surfactantes derivados de arginina en ausencia de agua en el medio de reacción, con el fin de minimizar la formación del producto de hidrólisis.
- Estudio del efecto del agregado de cantidades crecientes de Tritón X-100 en el *buffer* de reacción en el ensayo de hidrólisis del aceite de algodón.
- Ensayo de otros solventes orgánicos como medios de reacción de síntesis de ésteres.
- Ensayo de hidrólisis de triacilgliceroles sintéticos (tales como tributirina, triestearina, tripalmitina, trioleína, etc.) para determinar la preferencia de AHL.
- Síntesis de triacilgliceroles estructurados (triglicéridos cuya composición en ácidos grasos y localización en la molécula de glicerol han sido predeterminados mediante rutas sintéticas inequívocas), de gran aplicación en la industria de los alimentos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelkafi, S; Ogata, H; Barouh, N; Fouquet, B; Lebrun, R; Pina, M; Scheirlinckx, F; Villeneuve, P; Carrière, F (2009). "*Identification and biochemical characterization of a GDSL-motif carboxylester hydrolase from Carica papaya latex*". Biochim. Biophys. Acta 1791:1048–1056.
- Adamzack; M; Hari Krishna, S (2004). "*Strategies for improving enzymes for efficient biocatalysis*". Food Technol. Biotechnol. **42**:251-264.
- Agrawal, A; Konno, K (2009). "*Latex: A Model for Understanding Mechanisms, Ecology, and Evolution of Plant Defense Against Herbivory*". Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. **40**:311-331.
- Anastas, PC; Warner, JC (1998). "*Green chemistry: Theory and practice*". Oxford University Press, New York.
- Aracil, J; Vicente, M; Martinez, M; Poulina, M (2006). "*Biocatalytic processes for the production of fatty acid esters*". J. Biotechnol. **124**: 213–223.
- Bhardwaj, K; Raju, A; Rajasekharan, R (2001). "*Identification, Purification, and Characterization of a Thermally Stable Lipase from Rice Bran. A New Member of the (Phospho) Lipase Family*". Plant Physiol. **127**:1728–1738.
- Brocca, S; Secundo, F; Ossola, M; Alberghina, L; Carrea, G; Lotti, M. (2003). "*Sequence of the lid affects activity and specificity of Candida rugosa lipase isoenzymes*". Protein Science, **12**:2312–2319.
- Bucciarelli, A; Cambi, VN; Villamil, CB (2007)a. "*Anatomía vegetativa de Araujia hortorum E. Fourn. (Asclepiadaceae)*". Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, **6**: 185-186.
- Bull, AT; Bunch, AW; Robinson, GK (1999). "*Biocatalysis for clean industrial products and processes*". Curr. Op. Microb. **2**:246-251.
- Cambon, E; Bourlieu, C; Salum, TFC; Piombo, G; Dubreug, E; Villeneuve, P (2009). "*Ability of Vasconcellea x heilbornii lipase to catalyse the synthesis of alkyl esters from vegetable oils*". Process Biochem., **44**: 1265–1269.

- Cambon, E; Gouzou, F; Pina, M; Barea, B; Barouh, N; Lago, R; Ruales, J; Tsai, S; Villeneuve, P (2006). "Comparison of the Lipase Activity in Hydrolysis and Acyl Transfer Reactions of Two Latex Plant Extracts from Babaco (*Vasconcellea Heilbornii* Cv.) and *Plumeria rubra*: Effect of the Aqueous Microenvironment". *J. Agric. Food Chem.* **54**: 2726-2731.
- Castillo, J; Clapes, P; Infante, M; Comas, J; Manresa, A. (2006a). "Comparative study of the antimicrobial activity of bis(*N* α -caproyl-L-arginine)-1,3-propanediamine dihydrochloride and chlorhexidine dihydrochloride against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*". *J. Antimicrob. Chem.* **57**:691-698.
- Castillo, J; Infante, M; Manresa, A; Vinardell, M; Mitjans, M; Clapes P. (2006b). "Chemoenzymatic synthesis and antimicrobial and haemolytic activities of amphiphilic bis(phenylacetylarginine) derivatives". *Chem. Med. Chem.* **1**:1091-1098.
- Chen, C-C; Tsai, S-W; Villeneuve, P (2005). "Enantioselective hydrolysis of (*R,S*)-naproxen 2,2,2-trifluoroethyl ester in water-saturated solvents via lipases from *Carica pentagona* Heilborn and *Carica papaya*". *J. Mol. Catal. B: enzymatic* **34**:51-57.
- Cheng, Y; Tsai, S (2004). "Enantioselective esterification of (*RS*)-2-(4-chlorophenoxy)- propionic acid via *Carica papaya* lipase in organic solvents". *Tetrahedron: Asymm.* **15**: 2917-2920.
- Clapes, P; Moran, C; Infante, M (1999). "Enzymatic synthesis of arginine-based cationic surfactants". *Biotechnol. Bioeng.* **63**:333-343.
- Destain, J; Roblain D; Thonart; P. (1997) "Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*". *Biotechnol. Lett.*, **19**:105-107.
- Dhouib, R; Laroche-Traineau, J; Shaha, R; Lapaillerie, D; Solier, E; Rualès, J; Pina, M; Villeneuve, P; Carrière, F; Bonneau, M; Arondel, V (2011). "Identification of a putative triacylglycerol lipase from papaya latex by functional proteomics". *FEBS J.* **278** 97-110.
- Domínguez de María, P; Sinisterra, J V; Tsai, S-W; Alcántara, A R (2006). "*Carica papaya* lipase (CPL): An emerging and versatile biocatalyst". *Biotechnol. Adv.* **24**:493-499.
- Essamri, M; Deyris, V; Comeau, L (1998). "Optimization of lipase production by *Rhizopus oryzae* and study on the stability of lipase activity in organic solvents". *J. Biotechnol.* **60**:97-103.
- Fait, M.E. (2011) "Obtención semipreparativa de surfactantes biocompatibles catalizada por fitopeptidasas. Evaluación de sus propiedades antimicrobianas y biodegradabilidad". LIPROVE, Depto. Cs. Biológicas, Fac. Cs. Exactas, UNLP, Argentina.

- Fiorillo, F; Palocci, C; Soro, S; Pasqua, G (2006). "*Latex lipase of Euphorbia characias L.: An aspecific acylhydrolase with several isoforms.*" Plant Sci. **172**: 722–727.
- Gandhi, N; Mukherjee, K (2000). "*Specificity of Papaya Lipase in Esterification with Respect to the Chemical Structure of Substrates.*" J. Agric. Food Chem. **48**:566-570.
- Gandhi, N; Mukherjee, K. (2001). "*Synthesis of designer lipids using papaya (Carica papaya) latex lipase*". J. Mol. Catal. B: Enzymatic **11**: 271–277.
- Gardossi, L; Poulsen, PB; Ballesteros, A; Hult, K; Švedas, VK; Vasic-Racki, D; Carrea, G; Magnusson, A; Schmid, A; Wohlgemuth, R; Halling, PJ (2010). "*Guidelines for reporting of biocatalytic reactions*". Trends Biotech. **28**:171-180.
- Giordani, R.; Moulin, A.; Verger, R. (1991) "*Tryburryrolyglycerol hydrolase activity in Carica papaya and other latices*". Phytochemistry, **30**:1069-1072.
- Good, NE, Izawa, S (1972). "*Hydrogen ion buffers*". Meth. Enzymol. **24**:53-68.
- Gupta, R; Gupta N; Rathi P (2004). "*Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties*". Appl. Microbiol. Biotechnol. **64**: 763–781.
- Hou, C.T.; Shimada, Y. (2008). "*Lipases, industrial uses*". In: Hou, C.T., Shaw, J-F., editors. Biocatalysis and Bioenergy. Hoboken, NJ:John Wiley & Sons, Inc.
- Hult, K; Berglund, P. (2007). "*Enzyme promiscuity: mechanism and applications*". Trends Biotech. **25**:231-238.
- Jaeger, K-E; Dijkstra, BW; Reetz, MT (1999) "*Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases*". Annu. Rev. Microbiol. **53**:315-351.
- Kademi, A; Leblanc, D; Houde, A (2006). *Lipases*. En: Enzyme Technology. Editores: Pandey, A; Webb, C; Soccol, CR; Larroche, C. Springer, Delhi, pp 299-300.
- Kwon, DY; Rhee, JS (1986) "*A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assays*" J. Am. Oil. Chem. Soc. **63**:89-92.
- Lesuisse, E; Schanck, K; Coloson C. (1993). "*Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of Bacillus subtilis 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme*" Eur. J. Biochem. **216**:155-160.

- Lv, D; Du, W; Zhang, G; Liu, D (2010). "Mechanism study on NS81006-mediated methanolysis of triglyceride in oil/water biphasic system for biodiesel production". *Process Biochem.* **45**:446-450.
- Moran, C; Clapes, P; Comelles, F; Garcia, T; Perez, L; Vinardell, P; Mitjans M; Infante M. (2001a). "Chemical structure/property relationship in single-chain arginine surfactants". *Langmuir* **17**:5071-5075.
- Morán, C; Infante, M; Clapés, P. (2001b). "Synthesis of glycerol amino acid-based surfactants. Part 1. Enzymatic preparation of rac-1-O-(N^α-acetyl-L-aminoacyl)glycerol derivatives". *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1**: 2063–2070.
- Moran, C; Infante, M; Clapes, P. (2002). "Synthesis of glycerol amino acid-based surfactants. Part 2. Lipase-catalysed synthesis of 1-O-lauroyl-rac-glycerol-3-O-(N^α-acetyl-L-amino acid) and 1,2-di-O-lauroyl-rac-glycerol-3-O-(N^α-acetyl-L-amino acid) derivatives". *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1**:1124-1134.
- Morán, M; Pinazo, A; Pérez, L; Clapés, P; Angelet, M; García, M; Vinardell, M; Infante, M. (2004). "Green amino acid-based surfactants". *Green Chem.* **6**:233-240.
- Morcelle, S. R., Liggieri, C. S., Bruno, M. A., Priolo, N. and Clapés, P. (2009). "Screening of plant peptidases for the synthesis of arginine-based surfactants". *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* **57**:177-182.
- Mukherjee, K; Kiewitt, I (1996). "Specificity of *Carica papaya* Latex as Biocatalyst in the Esterification of Fatty Acids with 1-Butanol". *J. Agric. Food Chem.* **44**: 1948-1952.
- Muto, S; Beevers, H (1974). "Lipase Activities in Castor Bean Endosperm during Germination". *Plant Physiol.* **54**, 23-28.
- Ng, I-S; Tsai, S-W (2006). "Investigation of lipases from various *Carica papaya* varieties for hydrolysis of olive oil and kinetic resolution of (R,S)-profen 2,2,2-trifluoroethyl thioesters". *Process Biochem.* **41**:540-546.
- Ngando Ebongue, GF; Dhouib, R; Carrière F; Amvam Zollo, P-H; Arondel, V (2006). "Assaying lipase activity from oil palm fruit (*Elaeis guineensis* Jacq.) mesocarp". *Plant Physiol. Biochem.* **44**:611–617.
- Palocci, C; Soro, S; Cernia, E; Fiorillo, F; Belsito, CMA; Monacelli, M; Delle Monache, G; Pasqua, G (2003). "Lipolytic isoenzymes from *Euphorbia latex*". *Plant Sci.* **165**:577-582.

- Priolo, N; Morcelle del Valle, S; Arribére, MC; López, L; Caffini, N (2000). *“Isolation and Characterization of a Cysteine Protease from the Latex of Araujia hortorum Fruits”*. J. Protein Chem. **19**:39-49.
- Priolo, NS; Arribére, MC; Caffini, NO (1997). *“Isolation and partial characterization of a cotton root lipase”*. Acta Alimentaria **26**:23-33.
- Rashid, N, Shimada; Y; Ezaki, S; Atomi, H; Imanaka,T. (2001) *“Low-Temperature Lipase from Psychrotrophic Pseudomonas sp. Strain KB700A”*. Appl. Environ. Microb. 4064–4069.
- Rozzell, JD (1999). *“Commercial scale biocatalysis: myths and realities”*. Bioorg. Med. Chem. **7**: 2253-2261.
- Rubin-Pitel, SB; Zhao, H (2006) *“Recent advances in biocatalysis by directed enzyme evolution”*. Comb. Chem. & High Through. Screen. **9**:247-257.
- Seguel, I (1982). *“Enzimas” en: “Cálculos en bioquímica: cinética e inhibición”, 2da edición, Ed. Acribia, Zaragoza, España, Cap 8 pp. 201-203.*
- Sharma, R; Chisti, Y; Chand Banerjee, U. (2001). *“Production, purification, characterization, and applications of lipases”*. Biotechnol. Adv. **19**:627 – 662.
- Shimada Y, Hirota Y, Baba T, Sugihara A, Moriyama S, Tominaga Y; Terai, T (1999). *“Enzymatic synthesis of steryl esters of polyunsaturated fatty acids”*. J. Am. Oil Chem. Soc. **76**:713–716.
- U.S. Environmental Protection Agency. What is green engineering. http://www.epa.gov/oppt/greenengineering/pubs/whats_ge.html. Acceso on line 20/08/2009
- Uligh, H. (1998). *“Industrial Enzymes and their Applications”*. Ed. John Wiley & Sons, Inc., New York Pág. 180.
- Vacek, M; Zarevúcka, M; Wimmer, Z; Stránský, K; Demnerova, K; Legoy, M-D (2000) *“Selective enzymic esterification of free fatty acids with n-butanol under microwave irradiation and under classical heating”*. Biotech. Lett. **22**:1565-1570.
- Villeneuve, P (2003). *“Plant lipases and their applications in oils and fats modification”* Eur. J. Lipid Sci. Technol. **105**:308–317.

- Villeneuve, P; Carrière, F; Bonneu, M; Arondel, V. (2011). "*Identification of a putative triacylglycerol lipase from papaya latex by functional proteomics*". FEBS J. **278** 97–110.
- Villeneuve, P; Muderhwa, JM; Graille, J;. Haas, MJ. (2000). "*Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches*". J. Mol. Catal. B: Enzymatic **9** 113–148.
- Villeneuve, P; Turon, F; Caro, Y; Escoffier, R; Baréa, B; Barouh, B; Lagoa, R; Piombo, G; Pina, M (2005). "*Lipase-catalyzed synthesis of canola phytosterols oleate esters as cholesterol lowering agents*". Enzyme Microb. Technol. **37**: 150–155.
- Weeds of Australia. Moth vine, *Araujia sericifera*. Biosecurity Queensland Edition. http://keyserver.lucidcentral.org/weeds/data/03030800-0b07-490a-8d04-0605030c0f01/media/Html/Araujia_sericifera.htm. Accedido online: 17/09/2012.
- Wiermann Paques,F; Alves Macedo,G (2006). "*Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais*". Quim. Nova, **29**:93-99.
- Woodley, JM (2008). "*New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener*". Trends Biotech. **26**:321-327.
- You, P; Su, E;Yang, X; Mao, D; Wei, D. (2011). "*Carica papaya lipase-catalyzed synthesis of terpene esters*". J. Mol. Catal. B: Enzymatic **71**: 152–158.

Fe de erratas

Donde dice: "Estudio de la actividad de catálisis y síntesis de una lipasa presente en el látex de *Araujia hortorum*", debe decir: "Estudio de la actividad de hidrólisis y síntesis de una lipasa presente en el látex de *Araujia hortorum*".

Figura 11: Reacción de hidrólisis de ésteres de *p*-nitrofenilo (n 3,11).

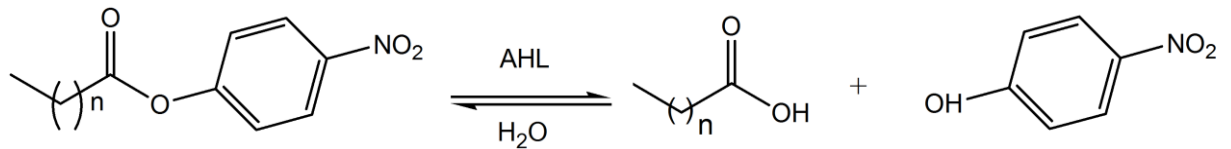


Tabla 10: Medidas de actividad lipolítica con protocolo estandarizado en tres niveles de fase orgánica

Masa de biocatalizador (mg)	Nivel	Actividad	Media	Desviación estándar		
5	Superior	0,0392	<u>0.0425</u>	<u>±0,0019</u>		
	Medio	0,0394				
	Inferior	0,0457				
5	Superior	0,0442				
	Medio	0,0437				
	Inferior	0,0412				
5,1	Superior	0,0429				
	Medio	0,0432				
	Inferior	0,0429				
4,6	Superior	0,055			0,0487	±0,0069
	Medio	0,0572				
	Inferior	0,0531				
4,8	Superior	0,0515				
	Medio	0,0468				
	Inferior	0,0477				
4,5	Superior	0,0369				
	Medio	0,0413				
5	Superior	0,0347	0,0319	±0,0025		
	Medio	0,0327				
	Inferior	0,0344				
5	Superior	0,0321				
	Medio	0,0334				
	Inferior	0,0334				
5,3	Superior	0,0285				
	Medio	0,0293				
	Inferior	0,0285				
4,9	Superior	0,0367			0,0381	±0,0023
	Medio	0,0367				
	Inferior	0,037				
4,9	Superior	0,0364				
	Medio	0,0368				
	Inferior	0,0364				
4,8	Superior	0,0395				
	Medio	0,0418				
	Inferior	0,0419				