



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA

HIDRÓLISIS DE CERAS NATURALES POR MEDIO DE
CARBOXILESTERASAS DE *Bacillus sp* PARA LA OBTENCIÓN DE
ALCOHOLES DE ALTO PESO MOLECULAR

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA

PRESENTA:
CARLOS ALBERTO CRUZ IPATZI

DIRECTORES DE TESIS:
DR. VÍCTOR ERIC LÓPEZ Y LÓPEZ
DR. ERIK OCARANZA SÁNCHEZ

TEPETITLA, TLAX. 2016

COMITÉ TUTORIAL:

DRA. MARIA DEL CARMEN CRUZ LÓPEZ

DRA. SILVIA LUNA SUÁREZ

M.C. LILIA TAPIA LÓPEZ

DR. FERNANDO GARCÍA HERNÁNDEZ

DR. VICTOR ERIC LÓPEZ Y LÓPEZ

DR. ERIK OCARANZA SÁNCHEZ



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Tepetitla siendo las 11:00 horas del día 02 del mes de Diciembre del 2016 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA-Tlaxcala para examinar la tesis titulada:

Hidrolisis enzimática de ceras naturales por medio de carboxilesterasas de *Bacillus sp* para la obtención De alcoholes de alto peso molecular.

Presentada por el alumno:

| | | | | | | | | | |
|---|------------------|-----------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| <u>Cruz</u> | <u>Ipatzi</u> | <u>Carlos Alberto</u> | | | | | | | |
| Apellido paterno | Apellido materno | Nombre(s) | | | | | | | |
| Con registro: | | | | | | | | | |
| <table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px 5px;">B</td> <td style="padding: 2px 5px;">1</td> <td style="padding: 2px 5px;">4</td> <td style="padding: 2px 5px;">0</td> <td style="padding: 2px 5px;">1</td> <td style="padding: 2px 5px;">9</td> <td style="padding: 2px 5px;">7</td> </tr> </table> | | | B | 1 | 4 | 0 | 1 | 9 | 7 |
| B | 1 | 4 | 0 | 1 | 9 | 7 | | | |

aspirante de:

Maestro en Ciencias en Biotecnología Aplicada

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Víctor Eric López y López

Dr. Erik Ocaranza Sánchez

Dra. María del Carmen Cruz López

Dra. Silvia Luna Suárez

M. en C. Lilia Tapia López

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dra. María Myrna Solís Oba



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada
Unidad Tlaxcala
Dirección



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Tepetila, Tlaxcala el día 29 del mes Noviembre del año 2017, el (la) que suscribe Carlos Alberto Cruz Ipatzi alumno (a) del Programa de Maestría en Biotecnología Aplicada con número de registro B140197, adscrito a CIBA-IPN Tlaxcala, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Victo Eric López y López y cede los derechos del trabajo intitulado Hidrolisis enzimática de ceras naturales por medio de carboxilesterasas de *Bacillus sp* para la obtención de alcoholes de alto peso molecular, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección vlopezyl@ipn.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Carlos Alberto Cruz Ipatzi

AGRADECIMIENTOS

A los compañeros y profesores por las aportaciones y aportaciones realizadas.

A mi familia y amigos por el apoyo y los consejos dados.

DEDICATORIA

Al Dr. Víctor Eric López y López y su grupo de trabajo, por su disponibilidad, paciencia y consejos durante la realización de este proyecto de investigación.

Al Dr. Eric Ocaranza Sánchez por el apoyo recibido y comentarios para llevar a cabo la investigación.

A los miembros del comité tutorial por las observaciones realizadas a lo largo del desarrollo del proyecto: Dr. Víctor Eric López y López, Dra. María del Carmen Cruz López, Dr. Erik Ocaranza Sánchez, y M. en C Lilia Tapia López.

Al Dr. Marlon Rojas López por proporcionar el equipo de espectroscopia de FT-IR.

Contenido

| | | |
|-------|---|----|
| 1. | RESUMEN | 14 |
| 2. | SUMMARY | 15 |
| 3. | INTRODUCCIÓN | 16 |
| 4. | ANTECEDENTES | 18 |
| 4.1 | Policosanol | 18 |
| 4.1.2 | Métodos de obtención de APAs | 18 |
| 4.1.3 | Aplicaciones de APAs | 21 |
| 4.1.4 | Técnicas de análisis para APAs..... | 24 |
| 4.1.5 | Fuentes de obtención de APAs | 25 |
| 4.2 | Ceras..... | 28 |
| 4.2.1 | Cera de abeja | 28 |
| 4.2.2 | Coccerina..... | 30 |
| 4.3 | Enzimas lipolíticas | 30 |
| 4.3.1 | Esterasas y lipasas | 31 |
| 4.3.2 | Estructura y mecanismo de acción de esterasas y lipasas | 32 |
| 4.3.3 | Aplicaciones de esterasas y lipasas | 34 |
| 4.3.4 | Producción y fuentes de obtención de esterasas y lipasas..... | 36 |
| 4.3.5 | Métodos para evaluar la actividad Esterasa/lipasa | 37 |
| 4.4 | <i>Bacillus subtilis</i> | 40 |
| 5 | JUSTIFICACIÓN | 41 |
| 6 | OBJETIVOS | 42 |
| 6.2 | OBJETIVO GENERAL | 42 |
| 6.3 | OBJETIVOS ESPECIFICOS | 42 |
| 7 | MATERIALES Y MÉTODOS | 43 |
| 7.1 | Obtención de ceras..... | 43 |

| | |
|---|-----------|
| 7.2 Saponificación de cera de abeja y coccerina para la obtención de policosanol. | 43 |
| 7.3 Microorganismos y preservación..... | 44 |
| 7.4 Medios de cultivo. | 44 |
| 7.5 Análisis cualitativo para la producción de enzimas lipolíticas..... | 45 |
| 7.6 Cinéticas de germinación y propagación | 45 |
| 7.7 Determinación de la actividad enzimática mediante el ensayo con esteres de <i>p</i> -Nitrofenol. . | 46 |
| 7.8 Análisis de ceras y productos obtenidos de su saponificación por cromatografía en capa fina. | 47 |
| 7.9 Análisis de ceras y productos obtenidos de su saponificación por espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier. | 47 |
| 8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 49 |
| 8.1 Análisis de ceras | 49 |
| 8.1.1 Análisis fisicoquímico de cera de abeja y coccerina..... | 49 |
| 8.1.2 Análisis de cera de abeja y coccerina por FT-IR..... | 50 |
| 8.1.3 Análisis de cera de abeja y coccerina por TLC | 52 |
| 8.2 Análisis de los cambios estructurales en la cera de abeja y coccerina debido a la saponificación por espectroscopia de infrarrojo..... | 55 |
| 8.3 Obtención de policosanol por saponificación de cera de abeja y coccerina | 59 |
| 8.3.1 Análisis de los productos obtenidos por TLC y FT-IR..... | 61 |
| 8.2 Análisis cualitativo para la producción de enzimas lipolíticas..... | 65 |
| 8.4 Caracterización del crecimiento de <i>Bs-1</i> en medio líquido a diferentes condiciones de cultivo | 68 |
| 8.4.1 Cuantificación de actividad esterasa/lipasa de <i>Bs-1</i> por medio del ensayo con <i>p</i> -NPA/ <i>p</i> - NPP | 73 |
| 8.4.2 Análisis por FT-IR de la cera de abeja empleada como inductor en MM y MN | 78 |
| 8.5 Caracterización del crecimiento de <i>Bs-1</i> , <i>Bs-2</i> y <i>Bs-3</i> en medio mineral modificado (MM-1).. | 80 |
| 8.5.1 Cuantificación de actividad esterasa/lipasa de <i>Bs-1</i> , <i>Bs-2</i> y <i>Bs-3</i> por medio del ensayo con <i>p</i> -NPA/ <i>p</i> -NPP | 86 |
| 8.5.2 Análisis por FT-IR de la cera de abeja empleada como inductor en MM-1..... | 89 |
| 8.6 Análisis preliminar de crecimiento y producción de esterasas/lipasas de <i>Bs-1</i> , <i>Bs-2</i> y <i>Bs-3</i> en medio mineral modificado (MM-2) | 91 |
| 8 CONCLUSIONES..... | 95 |
| 9 PERSPECTIVAS..... | 96 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 10 | BIBLIOGRAFIA | 97 |
| 11 | ANEXOS..... | 102 |
| | Anexo 11.1 Espectros de FT-IR de las cinéticas de saponificación de cera de abeja a 80 y 130 °C | 102 |
| | Anexo 11.2 Espectros de FT-IR de las cinéticas de saponificación de coccerina a 80 y 130 °C..... | 103 |
| | Anexo 11.3 Espectros de FT-IR del policosanol obtenido a partir de cera de abeja a 80 y 130 °C | 104 |
| | Anexo 11.4 Espectros de FT-IR del policosanol obtenido a partir de coccerina a 80 y 130 °C..... | 105 |
| | Anexo 11.5 Espectro de UV-Vis dep-NP..... | 106 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Reacción de hidrolisis de un éster. | 18 |
| Figura 2. Mecanismo de hidrolisis de esteres en solución básica. | 19 |
| Figura 3. Representación esquemática de la hidrolasa α/β plegada..... | 32 |
| Figura 4. Conformación de la triada catalítica y mecanismo de acción propuesto para estererasas y lipasas..... | 33 |
| Figura 5. Formación del complejo Cobre-ácido graso ejemplificado con tripalmitina..... | 39 |
| Figura 6. Espectro de FT-IR de cera de abeja de la especie <i>Apis mellifera</i> | 51 |
| Figura 7. Espectro de FT-IR de coccerina de la grana cochinilla. | 52 |
| Figura 8. TLC de ceras. | 53 |
| Figura 9. Espectros de FT-IR del monitoreo de la hidrolisis de cera de abeja a 80 °C durante 8 h de reacción..... | 56 |
| Figura 10. Espectros de FT-IR del monitoreo de la hidrolisis de coccerina a 80 °C durante 8 h de reacción..... | 57 |
| Figura 11. Estructura de la coccerina de <i>Dactylopius confusus</i> | 58 |
| Figura 12. Comparación del rendimiento de policosanol obtenido por saponificación de cera de abeja y coccerina a diferentes temperaturas y tiempos de reacción. | 59 |
| Figura 13. TLC de policosanol obtenido de cera de abeja a diferentes temperaturas y tiempos de reacción..... | 61 |
| Figura 14. TLC de policosanol obtenido de coccerina a diferentes temperaturas | 62 |
| Figura 15. Espectros de FT-IR de policosanol obtenido de cera de abeja a diferentes tiempos de reacción a 200 °C y de estándares comerciales 1-Octacosanol y 1-Triacontanol..... | 63 |
| Figura 16. Espectros de FT-IR de policosanol obtenido de coccerina a diferentes tiempos de reacción a 200 °C y de estándares comerciales 1-Octacosanol y 1-Triacontanol. | 64 |
| Figura 17. Historial de crecimiento a 72 h de Bs-1 durante pruebas cualitativas de actividad lipolítica utilizando cera de abeja como inductor. | 66 |
| Figura 18. Perfiles de crecimiento celular de Bs-1 en cultivos de germinación en MM y MN. | 68 |
| Figura 19. Perfiles de pH de Bs-1 en cultivos de germinación utilizando MM y MN..... | 69 |
| Figura 20. Perfiles de crecimiento celular de Bs-1 en cultivos de propagación en MM y MN. | 71 |
| Figura 21. Perfiles de pH de Bs-1 en cultivos de propagación utilizando MM y MN..... | 72 |
| Figura 22. Curva de calibración de p-Nitrofenol a 403 nm..... | 74 |
| Figura 23 Actividad esterasa/lipasa de completas de Bs-1 obtenidas en cultivos de germinación | 75 |

| | |
|--|-----|
| Figura 24. Actividad esterasa/lipasa de células de Bs-1 obtenidas en cinéticas de propagaciónl. | 77 |
| Figura 25. Espectros de FT-IR de cera de abeja empleada como inductor de actividad lipolítica en cultivos de germinación y propagación de Bs-1 utilizando MM y MN. | 79 |
| Figura 26. Perfiles de crecimiento celular de Bs-1, Bs-2 y Bs-3 en cultivos de germinación con MM-1. | 81 |
| Figura 27. Morfología celular de las cepas (A) Bs-1, (B) Bs-2 y (C) Bs-3 entre 24 y 72 h de cultivo en MM-1..... | 82 |
| Figura 28. Perfiles de crecimiento celular de Bs-1, Bs-2 y Bs-3 en cultivos de propagación con MM-1. | 83 |
| Figura 29. Perfiles de pH de Bs-1, Bs-2 y Bs-3 en cultivos de propagación empleando MM-1. | 84 |
| Figura 30. Actividad esterasa/lipasa de células completas de Bs-1, Bs-2 y Bs-3 obtenidas en cultivos de germinación en MM-1. | 86 |
| Figura 31. Actividad lipasa en U/ml de células completas de Bs-1, Bs-2 y Bs 3 obtenidas en cultivos de propagación en MM-1. | 88 |
| Figura 32. Espectros FT-IR de cera de abeja empleada como fuente de carbono alternativa e inductor de actividad lipolítica en cultivos de propagación de Bs-1, Bs-2 y Bs-3 en MM-1 a 72 h. | 90 |
| Figura 33. Actividad lipasa en U/ml de células completas de Bs-1, Bs-2 y Bs 3 obtenidas en cultivos de propagación en MM-2. | 92 |
| Figura 34. Espectros FT-IR de cera de abeja empleada como única fuente de carbono en cultivos de propagación de Bs-1, Bs-2 y Bs-3 en MM-2 a 72 h. | 93 |
| Figura 35. Seguimiento de la hidrolisis de cera de abeja a 130 °C por FT-IR a diferentes tiempos de reacción..... | 102 |
| Figura 36. Seguimiento de la hidrolisis de cera de abeja a 200 °C por FT-IR a diferentes tiempos de reacción..... | 102 |
| Figura 37. Seguimiento de la hidrolisis de coccerina a 130 °C por FT-IR a diferentes tiempos de reacción..... | 103 |
| Figura 38. Seguimiento de la hidrolisis de coccerina a 200 °C por FT-IR a diferentes tiempos de reacción..... | 103 |
| Figura 39. Espectros de FT-IR de policosanol obtenido de cera de abeja a diferentes tiempos de reacción a 80 °C y estándares comerciales 1-Octacosanol y 1-Triacontanol..... | 104 |
| Figura 40. Espectros de FT-IR de policosanol obtenido de cera de abeja a diferentes tiempos de reacción a 130 °C y estándares comerciales 1-Octacosanol y 1-Triacontanol..... | 104 |

| | |
|--|-----|
| Figura 41. Espectros de FT-IR de policosanol obtenido de coccerina a diferentes tiempos de reacción a 80 °C y de estándares comerciales 1-Octacosanol y 1-Triacontanol. | 105 |
| Figura 42. Espectros de FT-IR de policosanol obtenido de coccerina a diferentes tiempos de reacción a 130 °C y de estándares comerciales 1-Octacosanol y 1-Triacontanol. | 105 |
| Figura 43. Espectro de UV de pNP | 106 |

Índice de Tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Comparación de la eficiencia de extracción de varios métodos de obtención de policosanol de cera de salvado de arroz. | 20 |
| Tabla 2. Efectos farmacológicos asociados al consumo de policosanol. | 22 |
| Tabla 3. Composición de policosanol de diferentes fuentes analizado por GC-MS. | 26 |
| Tabla 4. Compuestos principales presentes en la cera de abeja. | 29 |
| Tabla 5. Diferencias generales entre lipasas y estererasas. | 31 |
| Tabla 6. Aplicaciones de Lipasas en base a la reacción de bioconversión que desempeñan. | 35 |
| Tabla 7. Fuentes de obtención de estererasas y lipasas. | 36 |
| Tabla 8. Comparación de diferentes métodos de evaluación de actividad lipasa/esterasa. | 38 |
| Tabla 9. Tiempos y temperaturas de reacción evaluados en la saponificación de las ceras. | 43 |
| Tabla 10. Configuraciones utilizadas del Medio Mineral. | 44 |
| Tabla 11. Resultados obtenidos del análisis fisicoquímico de cera de abeja y coccerina. | 49 |
| Tabla 12. Comparación entre los valores de Rf de TLC obtenidos. | 54 |
| Tabla 13. Resultados de la evaluación cualitativa en placa para la detección de actividad lipolítica. ... | 67 |
| Tabla 14. Comparación de las velocidades de crecimiento específicas de Bs-1 en diferentes condiciones de cultivo. | 73 |
| Tabla 15. Comparación de las velocidades de crecimiento específicas de Bs-1, Bs-2 y Bs-3 con MM-1. | 85 |

1. RESUMEN

Las ceras de origen animal y vegetal son materiales constituidos principalmente de mono, di y triésteres de ácidos grasos y alcoholes, en los que de manera natural puede encontrarse policosanol, que es una mezcla de alcoholes primarios alifáticos de cadena larga conformada principalmente por 1-octacosanol y 1-triacontanol. El policosanol se obtiene por medio de saponificación o extracción con solventes, no obstante estos métodos presenta algunas desventajas como la generación de productos indeseados debido a reacciones secundarias. Por lo que es importante la búsqueda de estrategias de producción más eficientes. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un método de hidrólisis enzimático de ceras de origen animal para la producción de alcoholes de alto peso molecular. Tres cepas de *Bacillus subtilis* (*Bs-1*, *Bs-2* y *Bs-3*) fueron evaluadas en la producción de enzimas lipolíticas en medio líquido, utilizando una composición minera (MM) y un medio nutriente (MN), encontrando que la producción de lipasas de *Bs-1* es mayor durante la germinación utilizando MM y MN con una actividad de 1.16 U/ml, en comparación a los cultivos de propagación donde la expresión de esterases fue mayor utilizando los mismos medios de cultivo, obteniendo un actividad de 1.3 U/ml. Por otro lado, al emplear el medio MM-1 carente de glucosa, se promovió la síntesis de lipasas de en las tres cepas de *Bacillus*, obteniendo una mayor expresión de la enzima durante las primeras 12 h de cultivo, donde la actividad enzimática fue de 1.16, 0.9 y 3.13 U/ml en *Bs-1*, *Bs-2* y *Bs-3* respectivamente. La hidrólisis química de la cera de abeja y coccerina también fue llevada a cabo, de lo cual se puede concluir que es posible obtener policosanol mediante saponificación, lo cual se favorece a altas temperaturas y tiempos de reacción, sin embargo por la naturaleza de la coccerina la implementación de esta técnica no es muy recomendable, ya que de acuerdo al análisis por espectroscopia FT-IR, la hidrólisis no se completa en su totalidad, por lo que se recomienda explorar alternativas como la hidrólisis ácida.

2. SUMMARY

Animal and vegetable waxes are materials principally consisting of mono, di- and tri-esters of fatty acids and alcohols, where in natural way policosanol can be contained. Policosanol is a long chain aliphatic primary alcohols mixture mainly consisting of 1-octacosanol and 1-triacontanol. It's obtained by saponification or solvent extractions, however, these methods present some disadvantages as the unwanted products generation due secondary reactions. Therefore, it's important to search efficient production strategies. The aim of this work was to develop a method of enzymatic hydrolysis of animal waxes for the production of high molecular weight alcohols. Three strains of *Bacillus subtilis* (*Bs-1*, *Bs-2* and *Bs-3*) were evaluated on production of lipolytic enzymes in liquid media, using a mineral composition (MM) and nutrient medium (MN). It was found the lipases production from *Bs-1* it's high on the germination in MM and MN getting 1.16 U / ml, in comparison to propagation cultures where the esterases expression was increased using the same media, obtaining an activity of 1.3 U / ml. On the other hand, using MM-1 glucose-free medium, the lipase synthesis in three *Bacillus* strains was promoted, obtaining a higher expression of the enzyme before 12 h of culture, where the enzymatic activity was 1, 16, 0.9 and 3.13 U / ml in *Bs-1*, *Bs-2* and *Bs-3*, respectively. The chemical hydrolysis of beeswax and coccerin was also carried out, from which it can be concluded it's possible to obtain policosanol by saponification to high temperatures and reaction times, however by the nature of the coccerin, the implementation of this technique isn't recommendable, inasmuch as according to the FT-IR spectroscopy analysis, the hydrolysis isn't completely finished, so it's recommended to explore alternatives such as acid hydrolysis.

3. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la demanda de productos alimenticios ha incrementado las actividades agrícolas, por lo que se percibe la necesidad de implementar métodos que permitan aumentar el rendimiento de los cultivos y mitigar efectos adversos sobre el suelo por el uso de agroquímicos, ya que preferentemente antes de recurrir a dichos productos todas las fuentes disponibles de nutrientes deberían ser utilizadas. Por ello se ha explorado el uso de composta, dado que la materia orgánica mejora la estructura del suelo, reduce la erosión del mismo y retiene mayor cantidad de agua. No obstante el abono orgánico por sí solo, no es suficiente para lograr los niveles de producción deseados por los agricultores, esto sin mencionar que no se dispone de la cantidad suficiente para cubrir las áreas de cultivo, por lo que la aplicación de fertilizantes minerales es indispensable.

La vía por la cual se administran los nutrientes también juega un papel importante, ya que la fertilización foliar para ciertos nutrimentos y cultivos en determinadas etapas de crecimiento es ventajosa y más eficiente que la edáfica, por lo que es utilizada para respaldar o complementar los requerimientos nutricionales de un cultivo que no se pueden abastecer mediante la fertilización común en el suelo (Trinidad & Aguilar, 2000).

Algunos trabajos de fertilización foliar han mostrado una respuesta positiva. Sin embargo los rendimientos obtenidos por el uso de esta práctica son muy variables. En un estudio realizado por Trinidad & Aguilar (2000) se determinó un aumento en el rendimiento de frijol de 8.5 veces, ya que al aplicar 30 kg de urea al suelo, por cada kg de nitrógeno se produjeron 2.9 kg de grano, mientras que aplicando vía foliar la misma cantidad de urea al 4 %, se registró un rendimiento de 24.5 kg de grano por cada kg de nitrógeno aplicado. Por otro lado se han investigado productos naturales como el alginato de sodio y policosanol como promotores de crecimiento para una serie de cultivos agrícolas. Naeem et al., (2014) compararon el efecto en las propiedades fisicoquímicas por la aspersión de alginato de sodio, triacontanol y homobrassinolide en *Mentha arvensis*, encontrando que la altura de la planta, el área, rendimiento de la hoja, peso fresco y peso seco aumentaron hasta en un 50 % en comparación al grupo control.

Investigaciones sobre la conformación de las ceras naturales han evidenciado la presencia de policosanol que es una mezcla de alcoholes primarios alifáticos de cadena larga o alcoholes de alto peso molecular, conformada en su mayoría por 1-octacosanol y 1-triacontanol. Estos productos se

obtienen principalmente de la cera de caña de azúcar y cera de abeja. Sin embargo debido a su creciente demanda es necesaria la búsqueda de nuevas fuentes.

Por otro lado, la coccerina que es un residuo de naturaleza cerosa generado del procesamiento de la grana cochinilla para la obtención de ácido carmínico es una opción, debido que en dicho proceso una problemática es la acumulación de este material el cual no tiene ninguna aplicación, por lo que su uso como materia prima para la obtención de alcoholes de alto peso molecular y valor agregado representa una alternativa.

No obstante a pesar de la existencia de procesos establecidos como la hidrólisis o extracción con disolventes para la obtención de policosanol, es necesario desarrollar métodos más eficientes ya que los empleados en la actualidad tienen como desventaja la generación de subproductos indeseados y tratamientos a altas temperaturas que afectan la pureza y estabilidad del producto final. Considerando que en las ceras naturales ya sea se origen animal o vegetal, la mayor parte de alcoholes de cadena larga se encuentran en forma esterificada con ácidos grasos, surge la necesidad obtener policosanol por métodos que favorezcan la especificidad de la reacción de hidrólisis para obtener un producto con mejores características, tal es el caso de los procesos enzimáticos.

4. ANTECENETES

La investigación sobre productos naturales que puedan ser empleados para mejorar la calidad y rendimiento de cultivos agrícolas es cada vez más importante, por ello el mercado de los alcoholes de alto peso molecular va en aumento. Esto debido a su respuesta positiva como promotores de crecimiento en plantas (Viola et al., 2008; Harrabi et al., 2009). Por otra parte, estudios farmacológicos han demostrado su efecto hipolipemiante, antiaterosclerótico, antiisquémico, antiagregante plaquetario y antioxidante careciendo de toxicidad (Martínez, 2000).

4.1 Policosanol

Policosanol es el nombre común que se refiere a una mezcla de alcoholes de alto peso molecular también llamados alcoholes grasos o primarios alifáticos (APAs por sus siglas en inglés), que contiene principalmente: 1-tetracosanol (C_{24} , 0.01-2%), 1-hexacosanol (C_{26} , 3-10%), 1-heptacosanol (C_{27} , 0.1-3%), 1-octacosanol (C_{28} , 60-70%), 1-nonacosanol (C_{29} , 0.1-2%), 1-triacontanol (C_{30} , 10-15%), 1-dotriacontanol (C_{32} , 5-10%) y 1-tetratriacontanol (C_{34} , 0.1-5%), los porcentajes de abundancia de cada alcohol varían entre fuentes y métodos de obtención (Irmak et al., 2006; González et al., 2007; Viola et al., 2008; Harrabi et al.; 2009, Cherif et al., 2010).

4.1.2 Métodos de obtención de APAs

En ceras animales y vegetales la mayoría de los alcoholes de alto peso molecular se encuentra de forma esterificada con ácidos grasos, formando ésteres de C_{30} a C_{60} (Mahadevan, 1978), es por ello que de forma convencional la obtención de policosanol a partir de ceras naturales se lleva a cabo mediante reacciones de hidrolisis bajo calentamiento en presencia de soluciones ácidas o básicas fuertes (Figura 1).

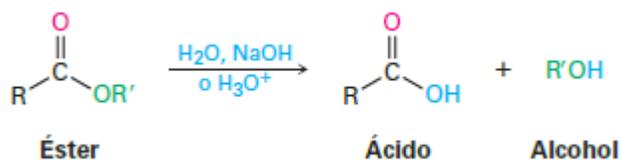


Figura 1. Reacción de hidrolisis de un éster.

La hidrolisis básica o saponificación es la mayormente utilizada y a diferencia de su contraparte catalizada por ácidos, esta irreversible debido a la conversión de los ácidos carboxílicos en sus aniones carboxilato que son estables bajo las condiciones de reacción (Carey, 2006). La saponificación ocurre

por un mecanismo de sustitución nucleofílica. El ion hidróxido ataca el grupo carbonilo del éster formando un intermediario tetraédrico, cuando se regenera el grupo carbonilo se produce la eliminación de ion alcóxido y se forma un ácido carboxílico, una rápida transferencia de protón forma el carboxilato y el alcohol (Figura 2).

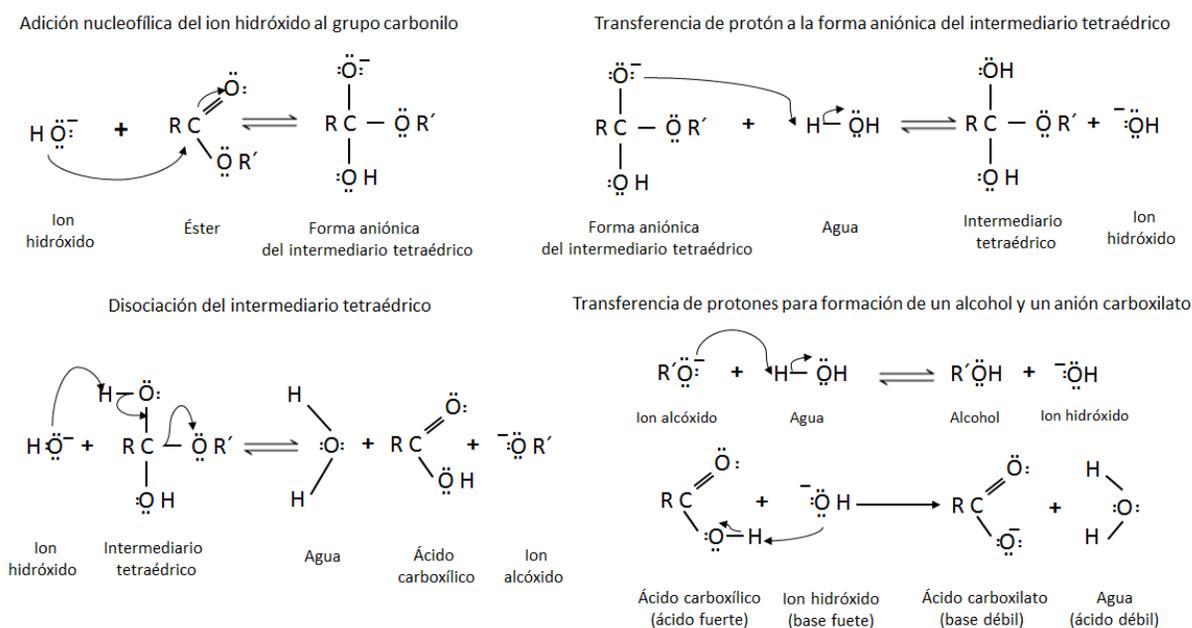


Figura 2. Mecanismo de hidrólisis de ésteres en solución básica.

Wang et al. (2007) realizaron un estudio comparativo del rendimiento de policosanol obtenido a partir de cera de salvado de arroz mediante cinco métodos de extracción y analizaron las muestras obtenidas de cada proceso por cromatografía de gases (GC) y cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS). Los autores reportan que independientemente del método utilizado la cantidad de octacosanol es menor a la de triacontanol (Tabla 1). El mayor contenido de dichos alcoholes se obtuvo bajo los métodos A y D en comparación con B y C pese a que en estos últimos se alcanzaron mejores rendimientos, indicando que la cera de salvado de arroz tiene baja eficiencia de hidrolización por saponificación en agua, por otro lado utilizando el método E el contenido de octacosanol y triacontanol fue el más bajo, probablemente por una sustitución incompleta de alquilos de cadena larga de la cera por *n*-butilo en *n*-butanol.

Tabla 1. Comparación de la eficiencia de extracción de varios métodos de obtención de policosanol de cera de salvado de arroz.

| Método | Rx (%) | Contenido (%) | Contenido (%) | *OC/TC |
|---|-------------|---------------|---------------|--------|
| | policosanol | Octacosanol | Triacosanol | |
| A. Saponificación en alcohol | 20.2 | 9.72 ± 1.36 | 15.16 ± 2.64 | 0.64 |
| B. Saponificación en agua no neutralizada | 21.0 | 4.95 ± 0.37 | 7.94 ± 0.58 | 0.62 |
| C. Saponificación en agua neutralizada | 28.0 | 3.85 ± 0.45 | 5.79 ± 0.92 | 0.66 |
| D. Saponificación seca | 18.1 | 10.53 ± 0.72 | 15.94 ± 1.51 | 0.66 |
| E. Transesterificación | 21.0 | 0.22 ± 0.02 | 0.33 ± 0.09 | 0.67 |

Wang et al, 2007. Nota: *OC/TC: Relación octacosanol/triacosanol

Otros métodos de obtención alcohólicos es mediante síntesis a partir de ácidos grasos o sus derivados, los cuales se mencionan a continuación según Mahadevan (1978).

➤ **Reacción de sales de plata con halógenos**

Esta reacción consiste en tratar sales de plata de ácidos grasos con yodo. El éster resultante es saponificado para obtener el alcohol con un átomo de carbono menos que el ácido graso original. El proceso de bromación degradativa de sales de plata de ácidos grasos es mejor conocido como reacción de Hunsdiecker, en la cual los bromuros de alquilo obtenidos por este método son convertidos a acetatos y después se hidrolizan para dar el alcohol correspondiente.

➤ **Reducción de ésteres de ácidos grasos mediante el uso de metales alcalinos**

La reducción de ésteres a alcoholes primarios empleando sodio y etanol anhidro fue propuesta por Bouveault y Blanc. El método es aplicable para la reducción de grasas y aceites por el uso de cantidades teóricas de sodio y alcohol así como de un solvente inerte como tolueno o xileno.

➤ **Reducción de ésteres con hidruros metálicos**

Ésteres son reducidos por hidruro de litio y aluminio, mientras que compuestos de carbono solo son reducidos por borohidruro sódico. La reducción de ácidos grasos a los alcoholes correspondientes ha sido examinada con varios hidruros metálicos complejos como: hidruro de tri-(tert-butoxi)-aluminio y litio.

➤ **Hidrogenación catalítica**

La reducción catalítica de ácidos grasos o ésteres a alcoholes primarios ha sido lograda con una amplia gama de catalizadores. En general se consigue con hidrogeno a temperaturas de 50 a 350 °C y presiones de 10 a 200 atm. La mayoría de los catalizadores usados para la hidrogenación catalítica a alta presión de ácidos grasos insaturados a alcoholes grasos insaturados contiene Cu y/o Cd para oxidar o saponificar.

➤ **Reducción de aldehídos**

Uno de los primeros métodos para la preparación de alcoholes grasos consiste en la reducción de los aldehídos correspondientes mediante el uso de borano, reacción en la cual dos moles de aldehído reaccionan con un mol de borano para formar un borano di-alquilo, que mediante hidrólisis produce un alcohol.

➤ **Hidratación de olefinas**

La hidratación de olefinas es empleada para la fabricación de alcoholes a partir de alquenos obtenidos en el craqueo del petróleo. La reacción toma lugar en presencia de ácido sulfúrico y otros catalizadores. El ácido fórmico mezclado con cantidades de catalizador y un ácido fuerte, se ha utilizado como un medio de hidratación de olefinas terminales.

4.1.3 Aplicaciones de APAs

Las aplicaciones se han centrado en el área farmacéutica y en su actividad biológica como regulador de crecimiento en plantas.

➤ **Propiedades farmacológicas**

Según Martínez (2000), estudios farmacológicos han demostrado que el policosanol tiene efectos hipocolesterolemiantes, antiagregante plaquetario, antiateromatosos, antioxidantes y ergonéticos en individuos sanos, pacientes con hipercolesterolemia tipo II, en grupos de riesgo: hipertensos, diabéticos y con riesgo vascular grave (Tabla 2). Dichas propiedades farmacológicas están relacionadas con la capacidad del policosanol de inhibir la biosíntesis del colesterol por la regulación indirecta en la actividad de la 3-hidroxi-3metilglutaril Coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa) según lo descrito por Viola et al., (2008).

Méndez et al. (2001) explican que la formación de mevalonato a partir de HMG-CoA es una reacción catalizada por HMG-CoA reductasa. Dado que el mevalonato constituye el metabolito clave en la biosíntesis del colesterol, la HMG-CoA reductasa es la principal etapa de regulación de esta vía metabólica. Entonces, considerando que más del 70% del colesterol total de un individuo es de origen endógeno, una forma atractiva de mantener niveles bajos de colesterol en el plasma es controlar su biosíntesis *de novo* por la inhibición selectiva de esta vía metabólica, mediante la regulación de dicha enzima.

Tabla 2. Efectos farmacológicos asociados al consumo de policosanol.

| Efecto farmacológico | Descripción |
|---------------------------------|--|
| Hipocolesterolemia | En cultivos de fibroblastos de intestino humano se ha comprobado que el mecanismo de acción del policosanol sobre la biosíntesis del colesterol es semejante al de las estatinas. El policosanol produce más que una inhibición, una regulación de la HMG-CoA. |
| Antiagregante y antiateromatoso | En pacientes hipercolesterolémicos tipo II se ha evidenciado una disminución de la progresión ateromatosa y un aumento en la regresión de la enfermedad aterosclerótica, atribuible tanto a la variación del perfil lipídico como a la propiedad antiagregante y el efecto protector que ejerce sobre el endotelio arterial. |
| Antioxidante | El policosanol ha demostrado en voluntarios sanos que inhibe la peroxidación lipídica y disminuye la susceptibilidad de las LDL a ser oxidadas. Las LDL oxidadas son rápidamente fagocitadas por los macrófagos del endotelio arterial, transformándose en células espumosas, uno de los estadios tempranos del desarrollo de la aterosclerosis. |
| Ergogenético | El policosanol mejora la circulación sanguínea, incrementa la circulación colateral coronaria, mejora los rendimientos tisulares de oxígeno e induce un aumento en la resistencia física, es decir produce una mejoría ergogenética. |

Martínez, 2000.

En cuanto a la toxicidad, dado que el policosanol solo es efectivo al consumirse de forma recurrente, se han realizado estudios para determinar posibles efectos secundarios, los cuales se han llevado a cabo en tres áreas clave: toxicidad crónica, carcinogenicidad y mutagenicidad, encontrando que al ser utilizado en tratamientos a largo plazo no presenta efectos colaterales. Sin embargo investigaciones futuras deberían centrarse en determinar un perfil de tolerabilidad en humanos a dosis mayores que 10 mg/día y periodos que excedan 12 meses (Varady et al., 2006).

➤ **Efecto en la regulación de crecimiento en plantas**

El constituyente del policosanol mas estudiado en este aspecto es el 1-triacontanol, se ha reportado que este alcohol y formulaciones basadas en el mismo mejoran el crecimiento y rendimiento de varios cultivos de cereales, vegetales y oleaginosas, asociando estos efectos al incremento del contenido proteico, captación de agua, número de tallos, área de hoja, minerales y CO₂ en la fotosíntesis (Harrabi et al., 2009; Misra & Srivastava, 1991; Naeem et al., 2014).

En este sentido, Hangarter & Ries (1978) estudiaron el efecto del triacontanol y octacosanol en cultivos celulares *in vitro* de: tabaco (*Nicotiana tabacum*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), papa (*Solanum tuberosum*), frijol (*Phaseolus vulgaris*) y cebada (*Hordeum vulgare x H. jubatum*) adicionando discos impregnados con los compuestos bajo estudio a diferentes concentraciones en cultivos en placa, encontrando que el triacontanol promueve el crecimiento en tabaco a concentraciones tan bajas como 0.01 µg/disco, mientras que las plantas restantes mostraron respuesta a 10 µg/disco. También reportan que el tratamiento se ve afectado por el estado de crecimiento de los tejidos, ya que se observó una mejor respuesta al triacontanol en la fase logarítmica con respecto a la fase estacionaria, además la adición de octacosanol no produjo efectos en el crecimiento de ningún cultivo, lo que sugiere que la especificidad de cadena puede ser requerida para desempeñar dicha actividad independientemente de la línea celular tratada.

Además de potenciar el crecimiento en plantas, también se ha estudiado el efecto del triacontanol en la producción de algunos metabolitos de interés. Misra & Srivastava (1991), analizaron el efecto de una formulación a base de triacontanol a concentraciones de 0.1 a 0.6 µg/ml (aplicada por aspersion foliar) en la acumulación de aceites esenciales de *Cymbopogon flexuosus* y su relación en procesos metabólicos asociados a la producción de clorofila, consumo de iones y producción de biomasa, bajo condiciones controladas. Reportan que a excepción del número de hojas, la altura de la planta, número de tallos, biomasa, aceites esenciales y sus constituyentes geraniol, citral A y citral B, se incrementaron

significativamente en todas las concentraciones utilizadas. No obstante bajo los tratamientos de 0.1 a 0.4 $\mu\text{g/ml}$ se encontró una mayor acumulación de citral A, citral B y de los minerales Fe, Mn y Cu, mientras que a concentraciones superiores a 0.5 $\mu\text{g/ml}$ se observó una tendencia decreciente en dichos parámetros así como en el crecimiento. Además hubo una correlación positiva entre el rendimiento de biomasa y cantidad de aceites esenciales, por lo que concluyen que la acumulación de estos fue debido al aumento del forraje más que por el incremento de la capacidad biosintética de la planta.

4.1.4 Técnicas de análisis para APAs

Dado que el policosanol es una mezcla de alcoholes alifáticos de cadena larga de C_{24} a C_{32} , su caracterización se realiza mediante métodos de separación en conjunto con técnicas de análisis instrumental. Algunos métodos aplicados a su análisis según Mahadevan (1978) son:

Espectroscopia de infrarrojo (IR). Los espectros de IR de alcoholes primarios, secundarios y terciarios alifáticos de cadena larga en estado sólido han sido examinados. Los alcoholes primarios muestran un doblete en la región de 720 cm^{-1} , mientras que los secundarios solo muestran una banda. El enlace de O–H de alcoholes se encuentran en frecuencias de 3650 a 3590 cm^{-1} , mientras que a regiones bajas del espectro hay vibraciones de tensión de C–O a 1050 cm^{-1} y de deformación entre 1350 y 1260 cm^{-1} de O–H

Resonancia magnética nuclear (RMN). Cuatro señales reconocibles pueden observarse en un espectro de RMN de alta resolución de un alcohol graso saturado. (1) El protón del hidroxilo, (2) El triplete para los protones del metileno próximos al grupo hidroxilo, (3) Los metilos restantes en la cadena y (4) el grupo metilo.

Cromatografía en capa fina (TLC). Se ha reportado la separación de varios alcoholes grasos y otros compuestos oxigenados de diferente longitud de cadena en placas de gel de sílice, utilizando diferentes sistemas de solventes que generalmente se componen de éter, éter de petróleo, dietiléter, ácido acético, hexano y xileno.

Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS). En la literatura es la técnica más reportada para la separación y análisis de mezclas de alcoholes de alto peso molecular. Se basa en la volatilización e inyección de la muestra en una columna cromatográfica, la elución se produce por el flujo de una fase móvil constituida por un gas inerte, que a diferencia de otros tipos de cromatografía,

esta no interacciona con las moléculas del analito, su función es únicamente el transporte a través de la columna (Skoog et al. 2001). Para este análisis debe realizarse una derivatización, que consiste en modificar químicamente el analito para producir un derivado con nuevas propiedades como: volatilidad y estabilidad térmica que facilite su análisis, lo cual se lleva a cabo por sililación, acilación o alquilación.

4.1.5 Fuentes de obtención de APAs

Las ceras de origen animal o vegetal son la principal fuente natural de estos compuestos. En plantas los alcoholes alifáticos de cadena larga están presentes en la cera de superficies de frutas, hojas, tallos y semillas (Harrabi et al., 2009) dado que su función es preservar el balance hídrico, minimizar el daño mecánico a las células así como proteger ante el ataque de hongos e insectos (Irmak & Dunford, 2005). En diversas plantas los compuestos más importantes son los alcoholes primarios con cadena de C₂₆ a C₂₈, aunque en algunos sistemas son de C₃₀ a C₃₂. Se encuentran frecuentemente en forma libre o esterificada a diversos grupos acilos, incluyendo alcoholes aromáticos con número par de carbonos de cadena corta y cadena larga o ácidos alifáticos de cadenas muy largas (Tallofa et al., 2013).

El policosanol fue aislado originalmente de la cera de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), esta mezcla contenía 1-tetracosanol (0.001-2%), 1-hexacosanol (3-10%), 1-heptacosanol (0.1-3%), 1-octacosanol (60-70%), 1-nonacosanol (0.1-2%), 1-triacontanol (10-15%), 1-dotriacontanol (5-10%) y 1-tetratriacontanol (0.1-5%) (Viola et al., 2008). De igual forma se ha encontrado en cera de abeja, germen y salvado de trigo de los cuales se obtiene comúnmente por extracción con disolventes y/o saponificación (Qun et al., 2011; Harrabi et al., 2009; Dunford et al., 2010).

La proporción y composición del policosanol en ceras vegetales es muy variable, ya que su síntesis depende del tipo de ambiente en el cual se desarrolle la planta así como del metabolismo. Irmak & Dunford (2005), mencionan que en un estudio de *triticum* y especies relacionadas alcanos (5-10%), ésteres (10-30 %), aldehídos (≤ 5 %), alcoholes (15-55 %) y ácidos grasos (≤ 5 %) estaban presentes en la cera epicuticular. Por otro lado Adhikari et al. (2006), señalan que el grano de sorgo tiene un rendimiento alto de materiales cerosos (223 mg/100 g de peso seco) y contenido de alcoholes grasos libres. Un análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de la materia cerosa mostró que aldehídos (46-55%), ácidos grasos (4-7%) y policosanol (37-41%) fueron los mayores componentes. Este último al ser analizado se encontró que estaba constituido de 6-8% de hexacosanol, 43-47% de octacosanol y 40-43% de triacontanol principalmente.

En la tabla 3 se resumen algunos trabajos en los cuales se analizó por GC-MS la composición del policosanol extraído de diferentes fuentes.

Tabla 3. Composición de policosanol de diferentes fuentes analizado por GC-MS.

| Fuente de obtención de policosanol | Características | Referencia |
|------------------------------------|---|--------------------|
| <i>Agave fourcroydes</i> | Se examinó el policosanol obtenido derivatizando la muestra mediante sililación, se separaron y cuantificaron once alcoholes de longitud de cadena: C ₂₆ (0.64%), C ₂₇ (0.41%), C ₂₈ (24.6%), C ₂₉ (2.45%), C ₃₀ (24.39%), C ₃₁ (9.25%), C ₃₂ (20.82%), C ₃₃ (4.85%), C ₃₄ (8.9%), C ₃₅ (2.1%) y C ₃₆ (1.56%). Por efecto de la sililación hubo un incremento de en la relación m/z 57 unidades en el peso molecular de cada uno de ellos (correspondiente al ion molecular). En todos los alcoholes se encontraron fragmentos de m/z = 125, 103, 83 y 75. | Méndez et al. 2003 |
| <i>Arachis hypogaea</i> L. | Se estudió el contenido y composición del policosanol de tres variedades de cacahuates (Ara A, Ara C y Ara T) recolectados en diferentes regiones de Túnez. En las tres variedades se identificaron 21 alcoholes alifáticos con un intervalo de longitud de cadena de C ₁₄ a C ₃₀ , de los cuales 16 fueron saturados y 5 insaturados. Aproximadamente > 90% del policosanol total se constituyó de alcoholes con longitud mayor a C ₂₀ , mientras que los de C ₁₄ , C ₁₅ y C ₁₆ representaron < 5%. En Ara A el componente más abundante fue 1-hexadecanol (23 %), en Ara C fue 1-docosanol (37.26%) y en Ara T 1-eicosanol (22.21%). El contenido total de policosanol en muestras enteras de cacahuates vario de 11.18 a 54.19 mg/100 g de aceite. | Cherif et al. 2010 |

| Continuación | | |
|--|--|--------------------|
| Fuente de obtención de policosanol | Características | Referencia |
| <ul style="list-style-type: none"> ➤ Cera de abeja ➤ Caña de azúcar ➤ Extracto de Trigo | <p>Se analizó por sililación estándares de nueve alcoholes grasos y las muestras de policosanol obtenidas de cada fuente de estudio. Hubo un aumento de 57 u en el peso molecular de cada estándar (debido a la sililación), valor que correspondió con el respectivo ion molecular. Se encontró un contenido de policosanol en la cera de abeja de 12 g/kg, caña de azúcar 270 mg/kg y en extracto de trigo de 164 mg/kg) constituido por alcoholes de C₂₂, C₂₄, C₂₆, C₂₈ y C₃₀. La proporción de cada alcohol varió significativamente entre fuentes. Sin embargo los de mayor abundancia fueron el tetracosanol, octacosanol y triacontanol.</p> | Irmak et al. 2006 |
| <i>Saccharum officinarum</i> L | <p>Se investigó el contenido de policosanol en la cáscara de siete variedades de caña de azúcar. Comparando con los perfiles cromatográficos y espectros de MS de estándares de alcoholes alifáticos de longitudes cadena pares de C₂₂ a C₃₀, se cuantificó el contenido de policosanol en mg por cada 100 g muestra, resultando para la variedad NCo (59.68 mg), F161 (68.69 mg), F177 (85.08 mg), NiF8 (88.42 mg), Ni13 (71.17 mg), Ni 15 (79.39 mg) y Ni 17 (123.65 mg). En todas las variedades el alcohol más abundante fue el octacosanol oscilando entre el 81 y 87% del contenido total, seguido del triacontanol. Los alcoholes de menor abundancia fueron los de longitud de cadena C₂₂ y C₂₄.</p> | Asikin et al. 2012 |

4.2 Ceras

Químicamente las ceras son mezclas de sustancias orgánicas de elevado peso molecular compuestas por monoésteres, diésteres, y triésteres de ácidos grasos de cadena media y alcoholes de alto peso molecular, hidrocarburos pesados, alcoholes libres, ácidos grasos libres, aldehídos, cetonas, dicetonas, éteres y en menor proporción esteroides, flavonoides y ácidos terpénicos (Peris, 2008). Físicamente se describen como partículas altamente insolubles en medios acuosos las cuales a temperatura ambiente son sólidos con dureza intermedia (Cabello et al., 2013). Se clasifican de acuerdo a varios criterios. No obstante la diferenciación primaria se hace según su origen el cual puede ser mineral, sintético o natural (Madrigal, 2007).

Las ceras de origen mineral se encuentran en yacimientos por ejemplo la cera montana y ozoquerita (Madrigal, 2007). La cera montana se forma a partir de la descomposición de vegetales y se emplea en pulidos o pintura, se obtiene de depósitos de carbón, turba y lignita. La ozocerita está constituida por una mezcla de hidrocarburos saturados, se forma a partir del carbón animal y es soluble en la mayoría de disolventes orgánicos, a partir de esta se obtienen otras ceras como la vaselina y parafina (Peris 2008).

Las ceras de origen sintético son productos derivados de la refinación del petróleo desarrolladas con el fin de reproducir las propiedades físicas de las ceras naturales, las más comunes incluyen ésteres de alquilo o de alcohol polihídrico (Madrigal, 2007).

Las ceras naturales son formadas a través de procesos bioquímicos como producto del metabolismo (Madrigal, 2007). En animales su producción está asociada a las glándulas sebáceas cuya función principal es impedir el movimiento del agua por la cutícula y evitar la deshidratación, su composición química depende de la especie y edad del animal (Peris 2008). En plantas las ceras recubren la epidermis de frutos, hojas y tallos lo cual evita la pérdida de agua por evaporación además de actuar como defensa contra insectos (Cabello et al., 2013). Su composición química es variable y depende de la especie, lugar de deposición, clima, entre otros factores (Peris, 2008).

4.2.1 Cera de abeja

La cera de abeja se produce de manera endógena por órganos especializados de abejas adultas (Buchwald et al., 2009). Es un producto graso en forma de pequeñas escamas redondeadas segregado por las glándulas ventrales, la cera recién producida es blanca sin embargo adquiere un color

amarillento a medida que entra en contacto con la miel, polen y propóleos (León et al., 2014). Es producida por todas las especies de abejas melíferas, no obstante existen diferencias en sus características químicas y físicas lo cual depende de las subespecies de abejas, edad de la cera y condiciones climáticas de su producción (Bradbear, 2005; Bonvehi & Bermejo, 2012).

La cera de abeja consiste principalmente en una mezcla compleja de hidrocarburos parafínicos, ácidos grasos y alcoholes de cadena larga libres y esterificados (Jiménez et al., 2003). Bonvehi & Bermejo, (2012), mencionan que dentro de su composición sobresalen cinco grupos de compuestos los cuales se describen en la tabla 4.

Tabla 4. Compuestos principales presentes en la cera de abeja.

| Compuesto | Longitud de cadena | Porcentaje aprox. | Características |
|---|-------------------------------------|-------------------|---|
| Hidrocarburos de cadena lineal impar | C ₂₇ a C ₃₃ , | 12 - 16 | Cuando la longitud de la cadena es mayor el porcentaje de compuestos insaturados aumenta, por arriba de cadenas de C ₃₃ solo especies insaturadas están presentes. |
| Ácidos grasos libres | C ₂₄ a C ₃₂ | 12 - 14 | La mayor parte son saturados (aprox. el 85%). |
| Alcoholes grasos libres | C ₂₈ a C ₃₅ | ≥ 1 | |
| Monoésteres lineales e hidroximonoésteres | C ₄₀ a C ₄₈ | 35 - 45 | Derivados fundamentalmente de los ácidos palmítico, 15-hidroxi-palmítico y oleico. La longitud de cadena total del éster depende principalmente de la fracción de alcohol (C ₂₄ a C ₃₄). |
| Esteres complejos | | 15 - 27 | Contienen ácido 15-hidroxi-palmítico o dioles ligados por medio de su grupo hidroxilo a otros ácidos grasos. |

Bonvehi & Bermejo, 2012.

4.2.2 Coccерina

Los insectos pertenecientes al género *Dactylopius* poseen glándulas las cuales secretan un material ceroso que al producirse en gran cantidad se acumula en su superficie (Meinwald et al., 1975). A este material se le dio el nombre de coccерina, la cual se presenta en forma de laminillas brillantes o polvo fino color blanco (Cortés, 2004). El insecto *Dactylopius coccus* Costa o grana cochinilla produce dicho material en su estado de desarrollo ninfa I (Tovar, 2008).

Chibnall et al., (1934) analizaron la coccерina del insecto *D. coccus cacti* por saponificación con potasa alcohólica y separación de los ácidos como sales de calcio, obteniendo un alcohol (alcohol cocceryl) y un ácido (ácido coccerínico). Posteriormente Liebermann & Bergami (1887) investigaron la estructura de estos compuestos sugiriendo que se trataba de un alcohol di-hídrico de fórmula $C_{32}H_{66}O_2$, mientras que el análisis del ácido coccerínico y sus sales sugirió que era un hidroxiaácido de fórmula $C_{31}H_{62}O_3$.

4.3 Enzimas lipolíticas

Las enzimas lipolíticas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza tanto en animales, plantas y microorganismos. Las producidas por bacterias han recibido un gran protagonismo debido a que son activas en un amplio intervalo de sustratos, realizan reacciones de hidrólisis, síntesis e intercambio de grupos funcionales con alta especificidad, además son estables en amplios intervalos de temperatura, pH y disolventes orgánicos (Navarro & Periago, 2012). García (2005), menciona que la hidrólisis de lípidos para la obtención de ácido grasos y alcoholes, o bien para la descomposición de la grasa en sí, llevada a cabo por enzimas lipolíticas, presenta claras ventajas respecto de la hidrólisis química, ya que esta no emplea altas temperaturas lo que permite la obtención de productos más termolábiles además de no presentar reacciones secundarias. Por ello surge el interés de emplear este sistema en la hidrólisis de ceras naturales para la obtención de policosanol.

Las enzimas lipolíticas se dividen en distintos grupos, entre ellos destacan: (I) esterases o carboxilesterasas (EC 3.1.1.1) que actúan sobre ésteres carboxílicos de cadena corta liberando los ácidos correspondientes, (II) lipasas (EC 3.1.1.3) que catalizan la hidrólisis de triglicéridos a ácidos grasos, diglicéridos, monoglicéridos y glicerol y (III) esterol esterases (EC 3.1.1.13) que hidrolizan ésteres de esterol (Calero, 2006), siendo esterases y lipasas las enzimas de mayor importancia comercial.

4.3.1 Esterasas y lipasas

Las lipasas son enzimas específicas para reacciones con acilglicerolos con ácidos grasos de cadena larga (>10 átomos de carbono) siendo la trioleína un sustrato de referencia. Mientras que las esterazas actúan específicamente sobre acilglicerolos de cadena corta (<10 átomos de carbono) y otros ésteres simples, siendo la tributirina su sustrato estándar (Navarro & Periago, 2012). Los sustratos propios de las lipasas son ésteres insolubles en agua, de esta forma cuando la enzima actúa en una interfaz orgánico-acuosa se habla de actividad lipolítica y su cinética no puede ser descrita por el modelo clásico de Michaelis-Menten. En el caso de la actividad esterasa la situación es distinta ya que estas catalizan la hidrólisis de ésteres solubles trabajando sin interfaz. Es necesario señalar que la mayoría de las lipasas también son esterazas. Sin embargo una esterasa no puede catalizar reacciones con sustratos propios de lipasas (Sánchez, 1998). Por otro lado se ha demostrado que esterazas y lipasas son estables y activas en disolventes orgánicos, pero esta característica es más pronunciada en las lipasas, enzimas en las cuales la enantioselectividad por lo general es más alta (Bornscheuer, 2002).

El fenómeno de activación interfacial es otro punto que caracteriza a una lipasa. Al obtener por primera vez la estructura tridimensional de esta enzima se descubrió la presencia de un bucle anfifílico (denominado *lid*) en la superficie de la proteína que cubre el sitio activo cuando esta se encuentra en solución acuosa, impidiendo de esta forma el acceso al mismo (García, 2005). La elucidación estructural revela que la activación interfacial es debida a un dominio hidrofóbico del *lid* que cubre el sitio activo de lipasas solo en presencia de una concentración mínima de sustrato (Bornscheuer, 2002). En la tabla 5 se resumen las diferencias más significativas entre lipasas y esterazas.

Tabla 5.Diferencias generales entre lipasas y esterazas

| Propiedad | Lipasa | Esterasa |
|-----------------------------|---------------------------------|--|
| Sustrato preferido | Triglicéridos (de cadena larga) | Esteres simples, triglicéridos (de cadena corta) |
| Activación interfacial | Si | No |
| Hidrofobicidad del sustrato | Alta | Alta a baja |
| Enantioselectividad | Usualmente alta | Alta a baja a nula |
| Estabilidad en solventes | Alta | Alta a baja |

Bornscheuer, 2002.

4.3.2 Estructura y mecanismo de acción de esterasas y lipasas

La estructura tridimensional tanto de lipasas y esterasas muestra características de α/β -hidrolasa (Figura 3). Consiste en una estructura central formada por 8 láminas β interconectadas por α hélices, donde los elementos de estructura secundaria se unen entre sí a través de *loops* cuya longitud difiere de una proteína a otra (Calero, 2006;). La triada catalítica es compuesta por Ser-Asp-His (Glu es sustituido por Asp para algunas lipasas), su orientación y ubicación en la parte inferior del sitio activo ofrece un entorno hidrofóbico ideal para la hidrólisis, además alrededor este también se encuentra una secuencia conservada de Gly-x-Ser-x-Gly (Bornscheuer 2002; Calero 2006; García 2005; Satoh & Hosokawa 2006). Este péptido forma un giro entre la lámina β_5 y la siguiente hélice α siendo su función estabilizar y orientar la serina nucleofílica (conocido como *nucleophilic elbow*), además el sitio activo contiene otras estructuras que intervienen en la estabilización de los intermediarios producidos por la catálisis o que se encargan de acomodar el ácido a escindir y cuyas características condiciona la especificidad y selectividad de estas enzimas (Navarro & Periago, 2012).

Cabe destacar que las lipasas muestran un mayor número de aminoácidos no polares localizados en las zonas expuestas al disolvente y en la región del sitio activo en comparación con las esterasas.

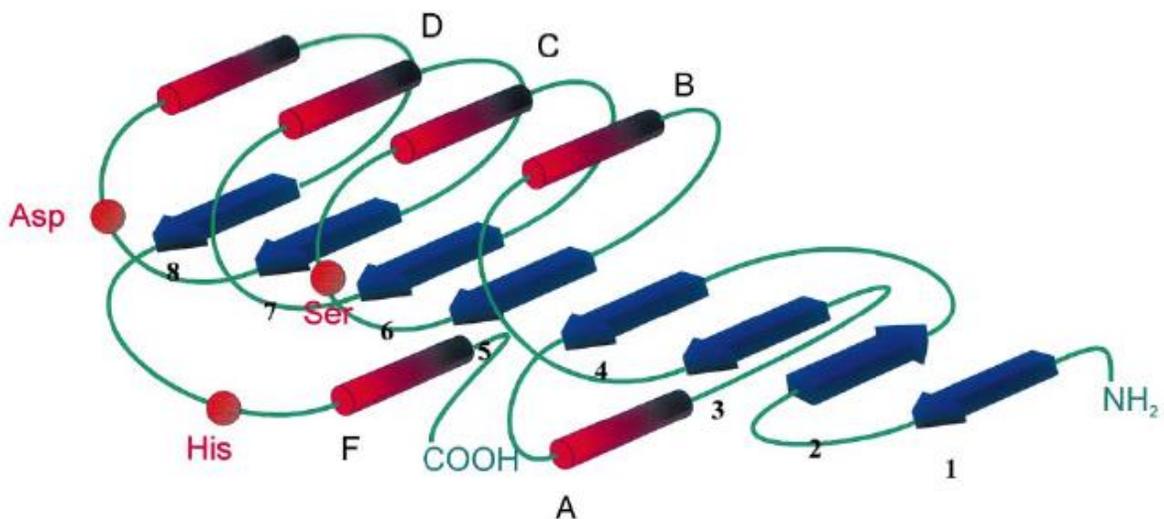


Figura 3. Representación esquemática de la hidrolasa α/β plegada. Láminas β (flechas 1 a 8), α -hélices (A-F), los círculos indican la posición relativa de los aminoácidos de la triada catalítica.

Lipasas y esterasas comparten el mismo mecanismo de acción, este se basa en un sistema de intercambio de cargas que ha sido estudiado mediante el uso de inhibidores y análisis estructural (Navarro & Periago, 2012). En la figura 4 se muestra el mecanismo de acción, el cual puede dividirse en cuatro etapas que constan de lo siguiente (Calero, 2006; Hosokawa, 2010; Navarro & Periago, 2012):

(I). La formación del complejo enzima-sustrato. En donde se posiciona al sustrato en la orientación correcta para la reacción, esta unión es muy específica pues debe acoplarse perfectamente al sitio de unión el cual no solo define la posición del corte, sino también la estereoespecificidad y en cuya entrada se localiza la triada catalítica, donde la serina activa se sitúa próxima al grupo carbonilo del enlace a romper para comenzar la hidrólisis.

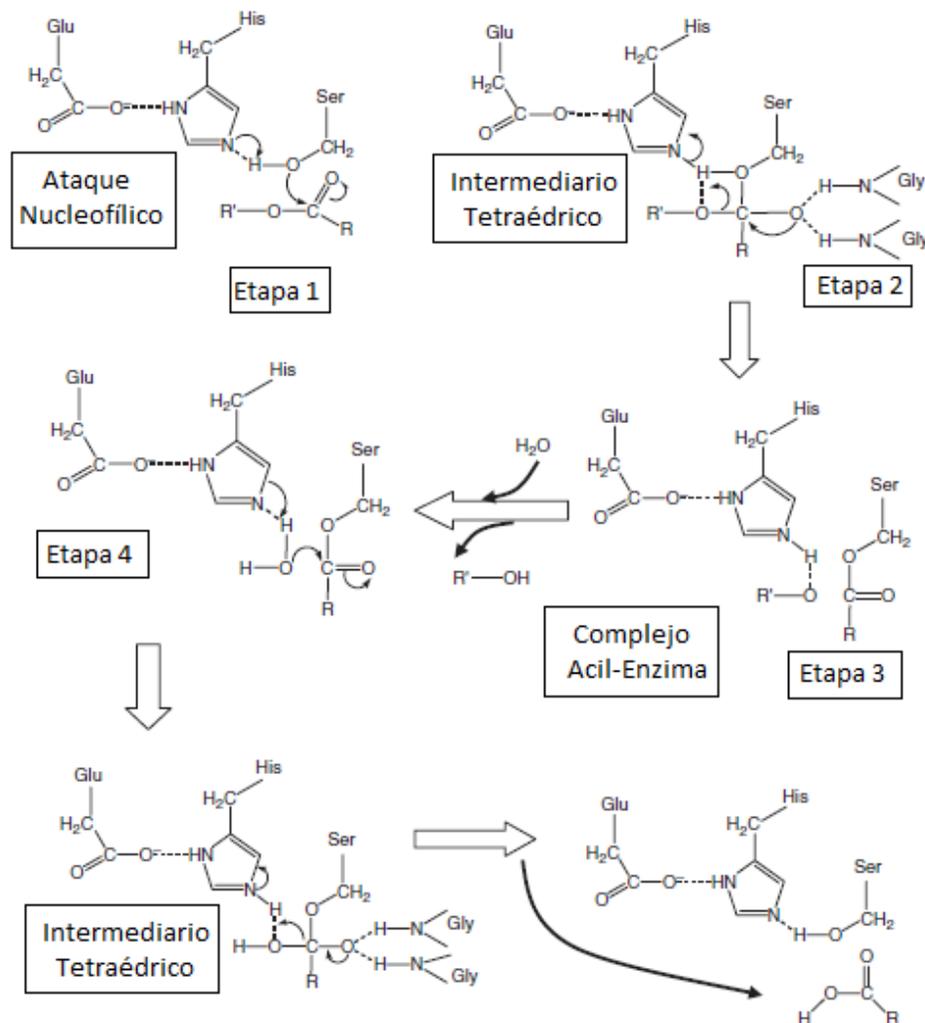


Figura 4. Conformación de la triada catalítica y mecanismo de acción propuesto para esterasas y lipasas

(II). Se produce el ataque nucleofílico por parte del grupo hidroxilo de la serina catalítica sobre el enlace éster del sustrato, formando un estado de transición tetraédrico que es estabilizado por dos glicinas cercanas al sitio activo. La serina es capaz de atacar al sustrato por la protonación de la histidina, y esta a su vez es estabilizada gracias al puente de hidrogeno que forma con el ácido glutámico. La acción de los aminoácidos histidina y ácido glutámico se conoce como sistema de relevo de cargas (*charge relay*) porque gracias a las interacciones químicas que se producen entre ambos se lleva a cabo la activación de la serina.

(III) Los enlaces de hidrógeno entre el oxígeno cargado negativamente del intermediario tetraédrico y los grupos N-H de las glicinas, estabilizan la carga negativa del oxígeno. Esta configuración es llamada agujero de oxoanión. La ruptura del enlace éster se produce en este estado activado dando un intermediario acilo-enzima.

(IV) Una molécula de agua ataca el complejo acilo-enzima para dar un segundo intermediario tetraédrico. El componente alcohólico se difunde completando el estado de acilación de la reacción hidrolítica. Por último la histidina dona el protón del átomo de oxígeno a la serina, que luego libera el componente ácido del sustrato el cual se difunde, volviendo la enzima a su estado original.

4.3.3 Aplicaciones de esterasas y lipasas

Aunque un número considerable de esterasas microbianas han sido sobreexpresadas en diferentes sistemas de expresión de proteínas recombinantes, pocas han sido usadas para la síntesis de compuestos ópticamente puros debido a su moderada enantioselectividad (Bornscheuer, 2002). No obstante las esterasas son empleadas en la industria lechera y en la producción de vinos, jugos y alcohol para transformar productos de bajo valor en otros más valiosos (Panda & Gowrishankar, 2005).

Por ejemplo los ácidos fenólicos y flavonoides son un grupo importante de compuestos naturales que poseen propiedades apreciadas en medicina y farmacología, como antimicrobianos, anticancerígenos, antibacterianos, estimulantes del sistema inmunitario, antivirales, anticancerígenos, antialérgicos, etc. Su uso en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica es limitado por su baja solubilidad y estabilidad en soluciones lipofílicas, por lo que la acilación enzimática de estos compuestos por esterasas aumenta no solo su solubilidad, sino su estabilidad y poder antioxidante (Navarro & Periago, 2012).

Dentro de las enzimas lipolíticas las que poseen mayor aplicación industrial son las lipasas, que son consideradas como uno de los biocatalizadores más versátiles ya que pueden llevar a cabo un amplio espectro de reacciones de bioconversión. La razón de su potencial biotecnológico se explica por el hecho de su estabilidad en disolventes orgánicos, no requerir cofactores, amplia especificidad por sustrato y enantioselectividad (Calero, 2006). En la tabla 6 se muestran algunas aplicaciones de las lipasas en relación al tipo de reacción que pueden desempeñar.

Tabla 6. Aplicaciones de Lipasas en base a la reacción de bioconversión que desempeñan.

| Tipo de Reacción | Aplicaciones |
|-------------------------|---|
| Hidrólisis | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Hidrólisis de aceites vegetales en la industria oleoquímica. ➤ Producción de aromas y sabores en la industria alimentaria. ➤ Inclusión de detergentes para la eliminación de grasas. ➤ Finalidades analíticas para la determinación de estructuras de triglicéridos. ➤ Resolución de mezclas quirales. |
| Síntesis | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Síntesis de triglicéridos ➤ Síntesis de precursores de péptidos ➤ Producción de esteroides para la industria farmacéutica ➤ Resolución de mezclas racémicas de alcoholes en la industria farmacéutica. ➤ Síntesis de alcoholes terpénicos como saborizantes. ➤ Síntesis de ésteres glucídicos para la industria cosmética. |
| Interesterificación | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Variación de la composición de ácidos grasos en mezclas de triglicéridos. Eliminación de ácidos grasos responsables de causar inestabilidad en el sabor de ciertos aceites y mantequillas. |
| Transesterificación | <ul style="list-style-type: none"> Preparación de compuestos enantioméricamente puros. Transesterificaciones enantioselectivas dobles. |

Sánchez, 1998.

4.3.4 Producción y fuentes de obtención de esterasas y lipasas

Las esterasas pueden desempeñar diferentes tipos de reacciones, por ello hallazgos experimentales en conjunto con el conocimiento específico de los microorganismos, sugieren que para la producción de una esterasa específica se debe elegir una técnica de fermentación apropiada para su producción, ya que en estos procesos otras enzimas hidrolíticas son expresadas lo que implica un aumento en los costos de separación y purificación (Panda & Gowrishankar, 2005). En la tabla 7 se muestran algunos microorganismos productores de enzimas lipolíticas.

Tabla 7. Fuentes de obtención de esterasas y lipasas.

| Enzima | Genero | Especies |
|---------------------------------------|-----------------------|--|
| Lipasas Bacterianas ¹ | <i>Bacillus</i> | <i>B. subtilis</i> , <i>B. sp.</i> J 33, <i>B. brevis</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. sp.</i> RS-12, <i>B. subtilis</i> 168, <i>B. thermocatenulatus</i> , <i>B. sp.</i> IHI-91, <i>B. acidocaldarius</i> <i>B. thermoleovorans</i> |
| | <i>Staphylococcus</i> | <i>S. canosus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. hyicus</i> , <i>S. epidermidis</i> <i>S. warneri</i> |
| | <i>Lactobacillus</i> | <i>L. delbrueckii</i> |
| | <i>Pseudomonas</i> | <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. mendocina</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. putida</i> 3SK, <i>P. glumae</i> , <i>P. cepacia</i> |
| Lipasas fúngicas ¹ | <i>Rhizopus</i> | <i>Rhizop. delemar</i> , <i>Rhizop. oryzae</i> , <i>Rhizop. arrhizus</i> , <i>Rhizop. nigricans</i> , <i>Rhizop. nodosus</i> , <i>Rhizop. chinensis</i> |
| | <i>Aspergillus</i> | <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. japonicus</i> , <i>A. awamori</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. carneus</i> , <i>A. repens</i> |
| | <i>Fusarium</i> | <i>F. heterosporum</i> , <i>F. oxysporum</i> |
| Esterasas bacterianas ² | <i>Bacillus</i> | <i>B. coagulans</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> <i>B. ciculans</i> |
| | <i>Pseudomonas</i> | <i>P. fragi</i> , <i>P. chlororophis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. putida</i> <i>P. monteilli</i> |
| Esterasas fúngicas ² | <i>Aspergillus</i> | <i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> |
| | <i>Trichoderma</i> | <i>T. reesei</i> , <i>T. sp</i> |

¹Sharma et al., 2001; ²Panda & Gowrishankar, 2005.

Al igual que las esterasas, las lipasas son producidas por animales, plantas y microorganismos. Sin embargo las de origen microbiano son las de mayor importancia en aplicaciones biotecnológicas. Las lipasas bacterianas en su mayoría son extracelulares y su producción está fuertemente influenciada por factores nutricionales y fisicoquímicos, sin embargo el factor principal para su expresión en la fuente de carbono debido a que son inducibles. Por lo tanto se producen en presencia de fuentes de lípidos como aceites, triacilgliceroles, ácidos grasos, esteres hidrolizables, tweens, sales biliares y glicerol (Gupta et al., 2004).

4.3.5 Métodos para evaluar la actividad Esterasa/lipasa

Se han desarrollado varios métodos para la medición de la actividad esterasa y lipasa en preparaciones enzimáticas crudas o purificadas. Para su cuantificación, estrategias emergentes han utilizado técnicas espectrometrías, volumétricas, inmunoensayos, conductimetría, cromatografía y por medio de biosensores (Stoycheva et al., 2012), siendo un aspecto importante la determinación de la velocidad de reacción, que puede estimarse por (a) la velocidad de desaparición del sustrato, (b) la velocidad de producción de ácidos grasos y (c) la velocidad de aclaración de una emulsión (Hasan et al., 2009.).

En la tabla 8 se muestran algunos métodos para la determinación de actividad lipasa/esterasa. Sin embargo sobresalen el método cualitativo del ensayo en placa con Rodamina B y el método cuantitativo para el ensayo con esteres de *p*-Nitrofenol.

Tabla 8. Comparación de diferentes métodos de evaluación de actividad lipasa/esterasa.

| Método | Principio |
|--|---|
| ¹ En placa | |
| Basados en el cambio de la opacidad del sustrato | Incorporación de tribiturina, trioleína o tween (20 u 80) a placas de agar, produciendo zonas o halos clarificados alrededor de colonias bacterianas. |
| Basados en indicadores | Incorporación de colorantes como Azul Victoria B, Azul de Nilo Sulfato o Rodamina B en placas de agar, produciendo la formación de complejos entre los ácidos grasos liberados y el colorante, lo cuales son visualizados por cambios de color o bajo luz UV. |
| ² Espectrométricos | |
| Colorimétrico | Cuantificación de ácidos grasos liberados por medio de la formación de complejos con sales de cobre. |
| Espectrometría UV-Visible | Hidrolisis de sustratos sintéticos catalizada por enzimas lipolíticas, principalmente de esteres de <i>p</i> -Nitrofenol y β -Naftol medidos entre 405 y 410 nm. |
| Espectroscopia de IR | Análisis del espectro de infrarrojo de monitoreando la hidrolisis de triglicéridos catalizada por lipasas en frecuencias específicas de vibración del carbonilo entre 1730 y 1750 cm^{-1} . |
| Fluorimetría | Cuantificación de los ácidos grasos liberados después la reacción de bioconversión, por lo general esteres de ácidos grasos derivados de fluoreceína y resazurina son usados como sustratos cromogénicos. |
| ¹ Cromatográficos | |
| HPLC y GC | Estas técnicas han sido usadas para medir la cantidad de ácidos grasos liberados de triacilgliceroles por la acción de lipasas, mediante la incubación de la enzima con una emulsión del sustrato a en columna y condiciones específicas. |
| ³ Titrimétricos | |
| | Monitoreo de lo ácidos grasos liberados en la reacción y medición del pH y su regulación con NaOH en función del tiempo, para generar una relación lineal entre la concentración de lipasa/sustrato expresada en mol/superficie. |
| ⁴ Kits | |
| | El uso de kits para estimar la actividad lipolítica se basa usualmente en la clarificación enzimática de una emulsión, donde los valores de absorbancia en UV-Vis a 340 nm decrecen. |
| ⁴ Microscopia de electrón | |
| | Detección de ácidos grasos liberados en tejidos animales. Esta técnica implica la incubación de tejidos con trioleína y su posterior exposición con sales de plomo para la formación cuerpos insolubles. |

¹Thomson et al., 1999; ²Stoycheva et al., 2012; ³Lizano 2012; ⁴Hasan et al., 2009.

4.3.5.1 Ensayo con rodamina B

La rodamina B es un fluorocromo utilizado para la tinción directa de células o en ensayos enzimáticos. La asociación entre este colorante y ácidos grasos ha fomentado su uso en investigaciones sobre microorganismos con actividad lipolítica (Carissimi et al., 2007). El principio de este ensayo se basa en la hidrólisis de los triglicéridos, de esta manera los ácidos grasos forman un complejo con la rodamina B que al ser irradiado con luz UV, se puede apreciar la pérdida de fluorescencia del colorante y de esta manera observar y determinar las colonias de microorganismos que producen enzimas lipolíticas. Cabe recalcar que una ventaja de este ensayo es que la rodamina B es insensible a cambios de pH del medio (Dinorín, 2009).

4.3.5.2 Ensayo con CuSO₄

El uso de sales de cobre para la detección en placa de enzimas lipolíticas microbianas puede ser factible. Cuando se inoculan microorganismos en un medio adicionado con acilglicéridos, si estos disponen de la maquinaria enzimática para hidrolizarlos, se producirán ácidos grasos libres los cuales reaccionan con el CuSO₄ para formar complejos insolubles color azul-verdoso brillante (Willis, 1960). La formación del complejo puede ser explicada con el caso particular de la tripalmitina cuyas reacciones pueden explicarse de acuerdo a la figura 5 (Berry, 1933).

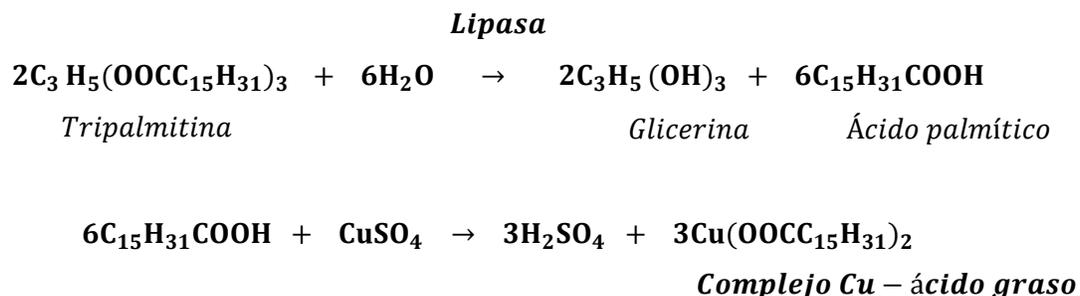


Figura 5. Formación del complejo Cobre-ácido graso ejemplificado con tripalmitina.

4.3.5.3 Ensayo con esteres de *p*-nitrofenol

El ensayo con esteres de *p*-nitrofenol es un método práctico mediante el cual se determina la actividad esterasa o lipasa en medio acuoso u orgánico por medio de la reacción de hidrólisis del *p*-nitrofenil acetato (*p*-NPA) o *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP) a *p*-nitrofenol (*p*-NP) respectivamente, que puede ser detectado por un método espectrofotométrico simple (Jassen et al. 1994; Dinorín 2009).

4.4 *Bacillus subtilis*

De acuerdo al manual de Berguey, *Bacillus subtilis* es una bacteria aeróbica, Gram positiva, formadora de esporas. El tamaño celular varia de 0.7-0.8 por 0.2-0.3 μm encontrándose solo, en pares pero raramente en cadenas. La morfología colonial es muy variable dentro y entre cepas lo cual puede dar la apariencia de una mezcla de cultivos. Las colonias son redondas (2-4 mm de diámetro) a irregulares, de color blanco y marrón con apariencia cremosa o mucóide. Su temperatura de crecimiento óptima va de 28-30 °C, con un mínimo de 5-20 °C y un máximo de 45-55 °C. El crecimiento ocurre en el intervalo de pH de 5.5 a 8.5.

B. subtilis es uno de los microorganismos más empleados en fermentaciones industriales para la obtención de diversos productos entre ellos las enzimas, por lo que la producción de esterasas y lipasas inducida por diversas sustancias de naturaleza lipídica ha sido ampliamente estudiada. Takac & Marul (2008), realizaron un estudio en el cual indujeron la actividad lipolítica extracelular de *B. subtilis* mediante la incorporación de diferentes ácidos grasos saturados e insaturados de diferente longitud de cadena así como aceites vegetales en el medio de cultivo. Los autores reportan una máxima actividad lipolítica de 0.032 U/ml a 24 h por la adición de ácido linoleo. Señalan que los ácidos grasos insaturados inducen una mayor actividad en comparación con los saturados. El uso de aceites vegetales también indujo actividad lipolítica obteniendo para aceite de sésamo 0.155 U/ml, girasol 0.45 U/ml, oliva 0.36 U/ml, maíz 0.33 U/ml y soya 0.21 U/ml. Analizaron la composición de los aceites vegetales utilizados y concluyen que la actividad enzimática parece estar estrechamente relacionada con el porcentaje de ácido linoléico y oleico en los aceites, además que altos porcentajes de ácidos grasos de cadena larga favorecen la expresión de lipasas.

Por lo anteriormente expuesto surge el interés de emplear *B. subtilis* para la hidrólisis de cera de abeja y coccerina es una opción atractiva considerando que este microorganismo tiene la capacidad crecer a partir de fuentes de carbono no convencionales.

5 JUSTIFICACIÓN

En la actualidad el interés por los alcoholes alifáticos de cadena larga obtenidos de ceras de origen animal y vegetal ha aumentado significativamente, esto como respuesta a sus propiedades farmacológicas y reguladoras de crecimiento en plantas.

Dichos productos se obtienen principalmente de la cera de caña de azúcar y abeja. Sin embargo es necesario encontrar nuevas fuentes de obtención, tal es el caso de la coccerina que es un residuo del procesamiento de la grana cochinilla el cual hasta la fecha no tiene aplicación. Por lo que se plantea utilizarla en conjunto con la cera de abeja como materias primas para generar alcoholes primarios alifáticos mediante saponificación.

No obstante se requieren procesos de producción alternos, ya que los actualmente empleados se llevan a cabo por métodos químicos en los cuales a pesar de ofrecer buenos rendimientos, también generan compuestos indeseados debido a reacciones secundarias, por lo que se propone un método de hidrólisis mediado por enzimas lipolíticas de *Bacillus subtilis* con el propósito de aumentar la especificidad de la reacción y tener mejor control en el perfil del producto.

6 OBJETIVOS

6.2 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un método de hidrólisis enzimático de ceras de origen animal para la producción de alcoholes de alto peso molecular.

6.3 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Analizar el rendimiento del policosanol obtenido a partir de cera de abeja y coccerina mediante diferentes condiciones de hidrólisis química.
2. Evaluar la hidrólisis enzimática de esteres de cera de abeja para la obtención de policosanol, mediante lipasas/esterasas de *B. subtilis* a diferentes condiciones de cultivo.
3. Analizar los productos obtenidos vía química y por cultivo celular mediante espectroscopia de infrarrojo.

7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Obtención de ceras.

Para la realización de este trabajo se utilizaron dos tipos de cera de origen animal: (1) coccerina del insecto *Dactylopius coccus* Costa recolectada en la localidad de Toluca de Guadalupe, Tlaxcala, de la cosecha Septiembre-Diciembre de 2015 y (2) cera de abeja producida por la especie *Apis mellifera*, recolectada en el municipio de Papantla de Olarte, Veracruz, la muestra obtenida correspondió a la cosecha Mayo-Junio del 2015. Dichas ceras se analizaron el espectro de infrarrojo de las ceras así como algunos parámetros fisicoquímicos que incluyen su índice de saponificación (Bonvehi & Bermejo, 2012; NMX-F-174-s-1981), índice de acidez (NMX-F-101-1987) e índice éster (NMX-K-395-1972), los cuales se realizaron bajo procedimientos establecidos por Normas Oficiales.

7.2 Saponificación de cera de abeja y coccerina para la obtención de policosanol.

La obtención de alcoholes alifáticos de cadena larga mediante la saponificación en etanol de cera de abeja y coccerina se llevó a cabo por el método reportado por Wang et al. (2007). Para ello 5 g de cera se mezclaron con 0.5 g NaOH y 25 ml de etanol al 95% en un matraz de bola. La mezcla se homogenizó y calentó a reflujo a diferentes tiempos y temperaturas de reacción (Tabla 9), manteniendo con agitación magnética constante a 250 rpm. Finalizado el tiempo de reacción bajo análisis, se adicionaron 10 ml de una solución al 6% de CaCl₂ en etanol al 95% (para precipitar los ácidos grasos como sus respectivas sales de calcio) agitando por 10 min. Después la mezcla se filtró en caliente utilizando papel filtro poro fino, la torta se lavó de 3 a 4 veces con etanol caliente al 95% y se descartó. Los filtrados (en donde se encuentran los alcoholes grasos) se colectaron, combinaron, enfriaron y posteriormente fueron nuevamente filtrados con papel Whatman grado 50. La torta obtenida en esta etapa se secó a 50 °C hasta peso constante. El producto seco se trituró y disolvió en 20 veces su volumen en acetona previamente calentada a 50 °C. Una vez disuelto el producto se dejó en reposo hasta su cristalización para finalmente ser recuperado por filtración.

Tabla 9. Tiempos y temperaturas de reacción evaluados en la saponificación de las ceras.

| Variable | Valores probados |
|------------------|------------------|
| Temperatura (°C) | 80, 130 y 200 |
| Tiempo (h) | 2, 4, 6 y 8 |

Se estudiaron los efectos del tiempo y temperatura de reacción en el rendimiento del policosanol obtenido, además de su análisis por espectroscopia de infrarrojo y cromatografía en capa fina comparando con los estándares comerciales 1-triacontanol y 1-octacosanol.

7.3 Microorganismos y preservación.

Se utilizaron tres cepas de *Bacillus subtilis* nombradas *Bs-1* (*B. subtilis* CDBB 39 variante 1), *Bs-2* (*B. subtilis* CDBB 39 variante 2) y *Bs-3* (*B. subtilis* CDBB 39 variante 3), obtenidas de la colección microbiana del CINVESTAV (Centro de Investigación y Estudios Avanzados), las cuales se preservaron por el método de conservación en papel filtro (con 10^7 esporas/disco) a 4 °C.

7.4 Medios de cultivo.

Se utilizaron dos medios de cultivo: Medio Nutriente (MN) y Medio Mineral (MM). El medio MN tiene la siguiente composición: caldo nutriente 8 g/l, NaCl 5 g/l y CaCl₂ 0.1 g/l. En cuanto al medio MM, la composición basal se muestra en la tabla 10, sin embargo se realizaron algunas modificaciones.

Tabla 10. Configuraciones utilizadas del Medio Mineral.

| Componente | g/l | | |
|---|--------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| | Medio mineral (MM) | Medio mineral modificación 1 (MM-1) | Medio mineral modificación 2 (MM-2) |
| Glucosa | 10 | ----- | ----- |
| K ₂ HPO ₄ | 2 | 2 | 2 |
| MgSO ₄ | 2 | 2 | 2 |
| FeSO ₄ | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| CaCl ₂ | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| NaCl | 5 | 5 | 5 |
| Extracto de levadura | 5 | 5 | ----- |
| Cera de abeja | ----- | 10 | 10 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | ----- | ----- | 5 |

La configuración MM-1 se utilizó para analizar el efecto en la actividad lipolítica al retirar la glucosa y emplear la cera de abeja como inductor y fuente de carbono alternativa, mientras que la configuración

MM-2 se usó para comprobar el crecimiento de los microorganismos utilizando la cera y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como única fuente de carbono y nitrógeno respectivamente. En todos los medios se ajustó el pH a 7.0 con NaOH al 50 % y/o H_3PO_4 2 N.

7.5 Análisis cualitativo para la producción de enzimas lipolíticas.

Para las pruebas cualitativas de producción de enzimas lipolíticas en placa se utilizó la composición de los medios MN y MM, más el 1.5% p/v de agar y 2% p/v de cera de abeja y coccerina. El pH de estos medios también fue ajustado a un valor de 7. La detección de actividad lipolítica se a cabo mediante dos técnicas.

(A) Por medio del revelado con solución acuosa de CuSO_4 . Se inocularon por extensión en placa las cepas de *Bs-1*, *Bs-2* y *Bs-3* en los medios MN y MM. Las placas se incubaron a 30 °C por 24, 48 y 72 h. Después de cada tiempo de incubación se describió la morfología colonial, presencia o ausencia de halos o zonas clarificadas en el medio, entre otros. Posteriormente se adicionaron 10 ml de una solución saturada de CuSO_4 a cada placa, se dejó en reposo por 30 min y se retiró el exceso, las placas se incubaron de 30 a 60 min a 30 °C. Un resultado positivo se observa por la coloración azul-verdoso de las colonias o su periferia debida a la formación de un complejo entre el cobre y los ácidos grasos liberados por la hidrólisis de esteres (Willis, 1960; Berry, 1933).

(B) Ensayo con Rodamina B. se utilizaron los medios MN y MM con el 2 % de cera más el 0.001% de rodamina B como indicador de la actividad lipolítica. La rodamina B se agregó en solución con agua destilada estéril a una concentración de 1 mg/ml la cual se pasó por un filtro de jeringa de 0.2 μm . La solución de rodamina B fue agregada antes de verter el medio de cultivo. Se inocularon por extensión en placa las cepas de *Bs-1*, *Bs-2* y *Bs-3* e incubaron a 30 °C por 24, 48 y 72 h, después de cada tiempo de incubación se describieron las características de crecimiento anteriormente mencionadas y se monitoreo la perdida de fluorescencia de la rodamina B irradiando con luz UV a 365 nm debida a la formación de un complejo entre el colorante y los ácidos grasos liberados. (Tellez, 2009; Kumar et al., 2012).

7.6 Cinéticas de germinación y propagación

Se llevaron a cabo cinéticas de germinación y propagación de las cepas de *B. subtilis* en los medios MN y MM para caracterizar el perfil de crecimiento en función del medio de cultivo y tipo de inóculo

empleado en cada prueba. Además de relacionarlo con la actividad esterasa/lipasa para identificar las mejores condiciones de expresión de dichas enzimas.

Cinéticas de germinación Un matraz Erlenmeyer de 500 ml con 125 ml del medio de cultivo seleccionado se inoculó con un disco con 10^7 esporas de la cepa de *B. subtilis* seleccionada y se incubó a 30 °C y 160 rpm. Se realizaron muestreos de 1 ml cada hora durante 24 h para monitorear el pH y crecimiento celular el cual se llevó a cabo por recuento en cámara de Neubauer en un microscopio de contraste de fases a 40x.

Cinéticas de propagación. Un matraz Erlenmeyer de 500 ml con 125 ml del medio de cultivo seleccionado se inoculó con el 5% v/v de un pre-cultivo (incubado por 15h) de la cepa de *B. subtilis* seleccionada. Las condiciones de temperatura y agitación fueron las mismas para el pre-inóculo y el cultivo a analizar, las cuales fueron 30 °C y 160 rpm respectivamente. Se realizaron muestreos de 1 ml cada hora durante 24 h para monitorear el pH y crecimiento celular por recuento en cámara de Neubauer en un microscopio de contraste de fases a 40x.

Tanto en los cultivos de germinación como de propagación, la actividad enzimática se determinó utilizando células completas, para lo cual se realizaron muestreos a diferentes tiempos de incubación (de 20 ml a concentraciones celulares altas y en concentraciones celulares bajas se sacrificó un matraz). Las células se cosecharon por centrifugación a 10 000 rpm a 4 °C por 15 min, el paquete celular se recuperó y lavo de tres a cinco veces con agua destilada o solución salina estéril (NaCl al 0.85%), posteriormente fue secado a 40 °C (Dinorín, 2009). Para la actividad enzimática extracelular se utilizaron sobrenadantes los cuales se filtraron en una membrana de 0.45 μ m y se congelaron hasta su uso.

7.7 Determinación de la actividad enzimática mediante el ensayo con esteres de *p*-Nitrofenol.

El ensayo de cuantificación de actividad esterasa se llevó a cabo en tubos eppendorf de 2 ml utilizando 5mg de células secas a los cuales se adicionaron 250 μ l de *p*-nitrofenil acetato (*p*-NPA) 10 mM en acetonitrilo y 750 μ l de buffer de fosfatos 50 mM pH 7. Para el blanco se utilizó la misma mezcla de reacción pero sin catalizador. Las muestras se incubaron por 10 min a 40 °C y 300 rpm. Después se tomaron muestras de 25 μ l del sobrenadante de la mezcla de reacción y se adicionaron a 1 ml de buffer de fosfatos 50 mM pH 7. Las muestras se analizaron por espectrometría de UV-Visible donde el *p*-nitrofenol (*p*-NP) liberando es detectado a 403 nm. La muestra si catalizador se utilizó como línea base en los análisis (Choi & Lee 2001).

Para la cuantificación de la actividad lipasa, el ensayo se llevó a cabo en tubos eppendorf de 2 ml utilizando como catalizador 5 mg de células secas y por otro lado 50 μ l de sobrenadante, a los cuales se les adiciono 250 μ l de *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP) 10 mM en *n*-hexano. Para los blancos se utilizó la misma mezcla de reacción pero sin utilizar catalizador. Las mezclas se incubaron a 40 °C y 300 rpm por 10 min. Se tomaron muestras de 25 μ l del sobrenadante de la reacción y se les adiciono 1 ml de NaOH 0.5 M. La fase acuosa se analizó por espectrometría de UV-Visible donde el *p*-NP liberado en la reacción es detectado a 403 nm. Las muestras blanco sirvieron como línea base en el análisis (Dinorín, 2009).

La actividad enzimática se representó como: unidad de actividad enzimática por mililitro (U/ml) definida como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μ mol de *p*-NP a partir de *p*-NPA o *p*-NPP por minuto bajo las condiciones de reacción.

7.8 Análisis de ceras y productos obtenidos de su saponificación por cromatografía en capa fina.

Con el fin de analizar de manera rápida los productos de la saponificación obtenidos en los distintos experimentos, se realizó cromatografía en capa fina (TLC), para lo cual se utilizaron placas de gel de sílice de 10 x 4 y 10 x 14cm de 250 μ m de espesor. Se aplicó cera de abeja (200 μ g aprox.), coccerina (200 μ g), policosanol obtenido de la saponificación (200 μ g), y los estándares 1-triacontanol y 1-octacosanol (100 μ g) disueltos en cloroformo.

Para obtener el mejor desarrollo de la placa cromatografía se probaron tres sistemas de solventes: (S1) hexano/dietil éter/ ácido acético 85:15:2 v/v/v (Hwang et al., 2002), (S2) hexano/ dietil éter/ ácido acético 95:5:1 v/v/v (Asikin et al., 2012) y (S3) hexano/dietil éter 6:4 v/v (Sakouhi et al., 2010). Para el revelado de las placas se probaron tres reactivos: (R1) vainillina al 6% en H₂SO₄ al 1% en etanol, (R2) CuSO₄ al 10% en H₃PO₄ al 8% y (R3) H₂SO₄-agua 1:1. La mejor combinación de sistema de sistema de solventes y revelador para separar y detectar los componentes de las ceras fue elegida.

7.9 Análisis de ceras y productos obtenidos de su saponificación por espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier.

Para obtener información sobre los grupos funcionales, especialmente de los esteres contenidos en las ceras bajo estudio, se realizó el análisis por Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR) de los estándares de alcoholes alifáticos 1-triacontanol y 1-octacosanol, así como de la cera de abeja, coccerina, el policosanol obtenido por su saponificación y las muestras utilizadas para la

inducción de enzimas lipolíticas en cultivo líquido. Las mediciones se realizaron en un espectrómetro de FT-IR VERTEX 70, las lecturas se realizaron a 120 scan en el infrarrojo medio ($400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$) por ATR utilizando como línea base el cristal a 60 scan y un ajuste de presión de 2 atm. Los espectros se procesaron con el software OriginPro 8.

8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se muestran los resultados obtenidos siguiendo el orden de la metodología planteada, tanto de la obtención de policosanol mediante la saponificación de las ceras como de la evaluación de actividad lipolítica.

8.1 Análisis de ceras

Se llevó a cabo el análisis fisicoquímico determinando los índices de saponificación, acidez y éster, así como por espectroscopia de infrarrojo y cromatografía en capa fina de la cera de abeja y coccerina, con el fin de obtener información acerca de su calidad, grupos funcionales presentes y número aproximado de componentes.

8.1.1 Análisis fisicoquímico de cera de abeja y coccerina.

La calidad de las ceras naturales es un factor importante en orden de preservar sus propiedades, por lo que con el objetivo obtener información acerca de la coccerina y verificar la autenticidad de la cera de abeja para descartar su adulteración, que es realizada con parafinas para aumentar la masa de producción, los parámetros fisicoquímicos: índice de saponificación, acidez y éster fueron determinados (Tabla 11). De acuerdo a los resultados obtenidos el índice de saponificación y acidez se encuentran dentro de los intervalos normales reportados por Maia & Nunes (2013) para cera de la especie *Apis mellifera*, de 65.5 a 124 mg KOH/g cera y de 14. 4 a 23 mg KOH/g de cera respectivamente. De igual forma se calculó el índice éster encontrando el valor resultante por arriba del intervalo reportado por Pérez (2006) de 72 a 79 mg KOH/ g cera, indicando un alto porcentaje de acilglicéridos

Tabla 11. Resultados obtenidos del análisis fisicoquímico de cera de abeja y coccerina.

| Prueba | Cera de abeja | Coccerina |
|---|---------------|--------------|
| Índice de saponificación (mg KOH/g de cera) | 74.29 ± 5.02 | 52.02 ± 1.64 |
| Índice de acidez (mg KOH/g de cera) | 16.16 ± 0.52 | 3.13 ± 0.1 |
| índice éster (mg KOH/g de cera) | 91.75 ± 7.79 | 48.89 ± 1.73 |

En base a la información obtenida se puede decir que la cera de abeja utilizada es auténtica, ya que autores como Bonvehi & Bermejo (2012) y Maia y Nunes (2013), mencionan que el número de saponificación e índice éster decrece en función del grado de adulteración con parafinas u otras sustancias de carácter lipídico, reportando valores de hasta 36.9 y 8.2 mg KOH/g cera respectivamente en muestras con dichas características. Además el alto contenido de acilglicerol está estrechamente relacionado con las condiciones ambientales en las cuales se sintetiza la cera de abeja, de ahí que su contenido pueda ser mayor o menor al valor promedio reportado. Por otro lado dado que la coccerina no es una cera comercial, no hay puntos de referencia para comparar los resultados obtenidos. Sin embargo se puede suponer que el contenido de ésteres y ácidos grasos libres es baja, ya que se requiere una menor cantidad de KOH para su saponificación y neutralización respectivamente, en comparación con la cera de abeja.

8.1.2 Análisis de cera de abeja y coccerina por FT-IR

Se realizó la caracterización por espectroscopia de infrarrojo, cuyo objetivo fue la elucidación de los posibles grupos funcionales presentes en la cera de abeja y coccerina. En la figura 6 se muestra el espectro de FT-IR de la cera de abeja, donde se puede observar a 729 cm^{-1} un doblete que indica presencia de cadenas de $(\text{CH}_2)_n$ con $n \geq 4$ característico de compuestos alifáticos. Por otro lado hay vibraciones a 1170 cm^{-1} que señalan la presencia de enlaces C-O-C de esterol alifáticos, lo que se confirma con la banda a 1735 cm^{-1} del grupo C=O correspondiente a esterol o ácidos carboxílicos, además de un hombro a 1710 cm^{-1} posiblemente de cetol y/o aldehídos. Un doblete a 2848 y 2916 cm^{-1} muestra la presencia de cadenas hidrocarbonadas con CH_2 y CH_3 , lo cual se puede confirmar con la banda a 1463 cm^{-1} . Hay vibraciones en el intervalo de 3000 a 3600 cm^{-1} característica de enlaces O-H, por lo que se puede suponer la presencia de ácidos grasos y/o alcoholol libres pero a una proporción baja dada la intensidad de dicha banda. No hay vibraciones en los intervalos de 1600 a 1680 cm^{-1} (de enlace C-H hibridación Sp^2), de 2100 a 2200 cm^{-1} (de enlace C-H hibridación Sp) ni sobretonos, por lo que moléculas con dobles y triples enlaces carbono-carbono así como compuestos aromáticos no están presentes o poseen una concentración tan baja que no es detectada mediante esta técnica.

En general, los enlaces evidentes que se elucidaron por el análisis de FT-IR fueron, C = O de ácidos, alcoholol, aldehído y/o cetol, C-O-C de esterol, O-H de alcoholol y/o ácidos, CH, CH_2 y CH_3 de cadenas hidrocarbonadas, que concuerda con algunos trabajos enfocados al estudio de los componentes principales de la cera de abeja por GC y GC-MS (Jiménez et al., 2003; Jiménez et al., 2004; Jiménez et al., 2006), en los cuales se han encontrado hidrocarburos alifáticos (de longitud C_{17} a C_{35}),

hidrocarburos insaturados (con una sola insaturación de longitud C_{21} a C_{35}) ésteres de ácido palmítico (con alcoholes de C_{22} a C_{36}), ácidos libres (C_{14} a C_{36}) y alcoholes libres (C_{24} a C_{34}). Cabe señalar que la intensidad relativa del doblete a 729 cm^{-1} aumenta en función de la longitud de cadena, por lo que al encontrarse ésteres de hasta C_{50} y otros hidrocarburos, deben encontrarse bandas finas tal y como fue observado en el espectro.

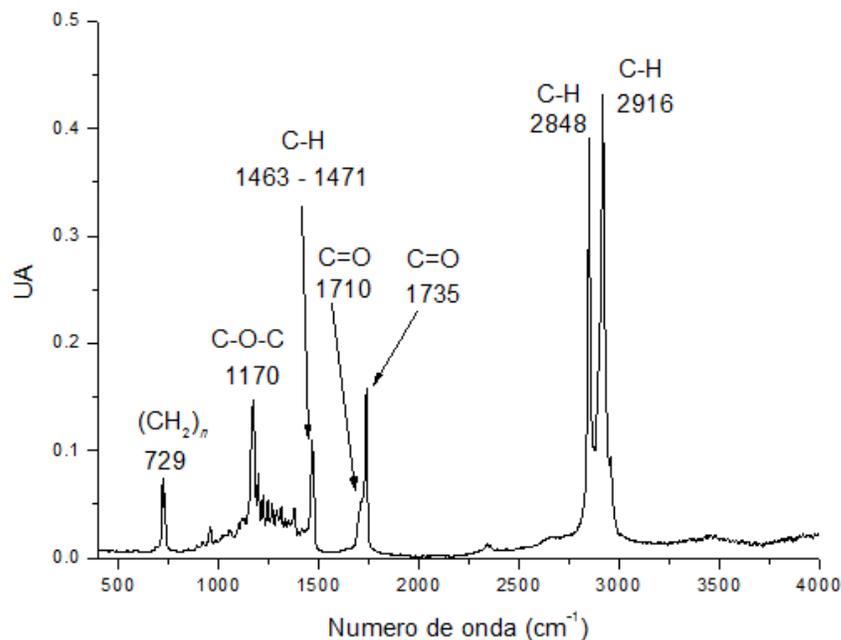


Figura 6. Espectro de FT-IR de cera de abeja de la especie *Apis mellifera*.

En análisis de la coccerina por espectroscopia de infrarrojo también fue realizado. De acuerdo al espectro de FT-IR obtenido (Figura 7), se observa a 729 cm^{-1} un doblete característico de compuestos alifáticos con cadenas de $(CH_2)_n$ con $n \geq 4$, cuya intensidad se relaciona en base a la longitud de cadena. También se observaron bandas poco intensas en el intervalo de 1000 a 1250 cm^{-1} que corresponden a enlaces C-O y C-O-C posiblemente de ésteres, ya que no hay evidencia de ácidos grasos o alcoholes libres dada la ausencia de vibraciones entre 3000 y 3600 cm^{-1} , región característica de enlaces O-H de dichas moléculas. El doblete a 1710 y 1731 cm^{-1} es atribuible al carbonilo de cetonas y/o aldehídos y ésteres alifáticos respectivamente. Por otro lado, el triplete entre 2800 y 3000 cm^{-1} corresponde a vibraciones de tensión C-H de metilos y metilenos, lo cual se confirma con las bandas a 1463 cm^{-1} para CH_2 y a 1379 cm^{-1} para CH_3 . Adicionalmente vibraciones características de dobles y triples enlaces carbono-carbono no fueron detectadas.

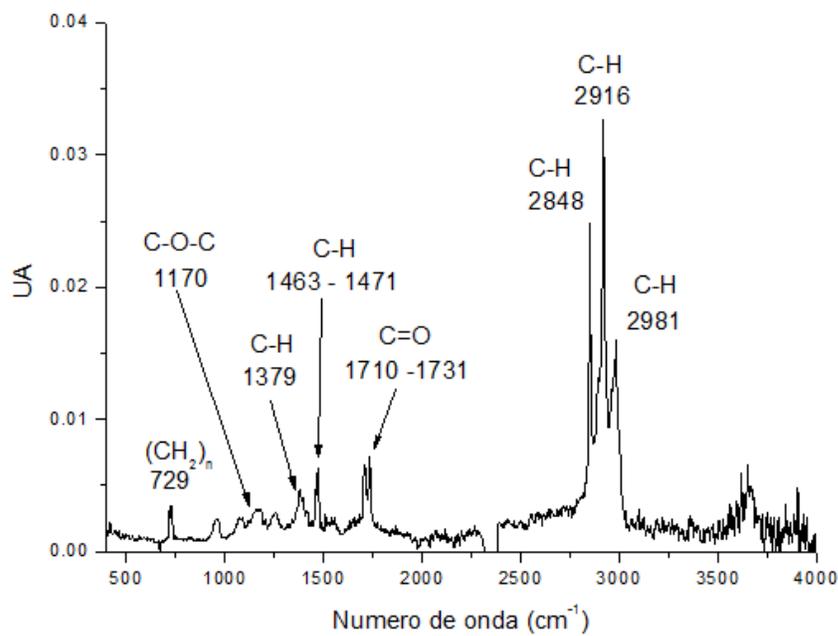


Figura 7. Espectro de FT-IR de coccerina de la grana cochinilla.

8.1.3 Análisis de cera de abeja y coccerina por TLC

Con el objetivo de analizar de manera rápida las ceras y los productos obtenidos de su saponificación se llevó a cabo cromatografía en capa fina. Para ello se probaron tres sistemas de solventes y tres reactivos de revelado. En la figura 8 se muestran las placas cromatográficas correspondientes a cada combinación, donde se observa que la mejor separación y visualización de los componentes de la cera de abeja se logró con el sistema hexano/dietil éter/ ácido acético 85:15:2 y el revelador de vainillina al 6% en H₂SO₄ al 1% en etanol.

Mediante el uso del revelador R2 la detección de los estándares de 1-octacosanol y 1-triacontanol fue baja o nula indistintamente del sistema de solventes utilizado, mientras que empleando el R3 la visualización fue buena, sin embargo la cantidad de componentes detectados por este revelador es menor con respecto al de vainillina en H₂SO₄. El uso de los sistemas de solventes S2 y S3 implica un menor grado de separación de los compuestos de la cera de abeja, lo cual está influenciado directamente por su polaridad. Además independientemente del sistema utilizado, la muestra de coccerina no sufrió separación alguna, por lo que se puede suponer que los compuestos que la constituyen poseen una polaridad demasiado baja para ser eluidos.

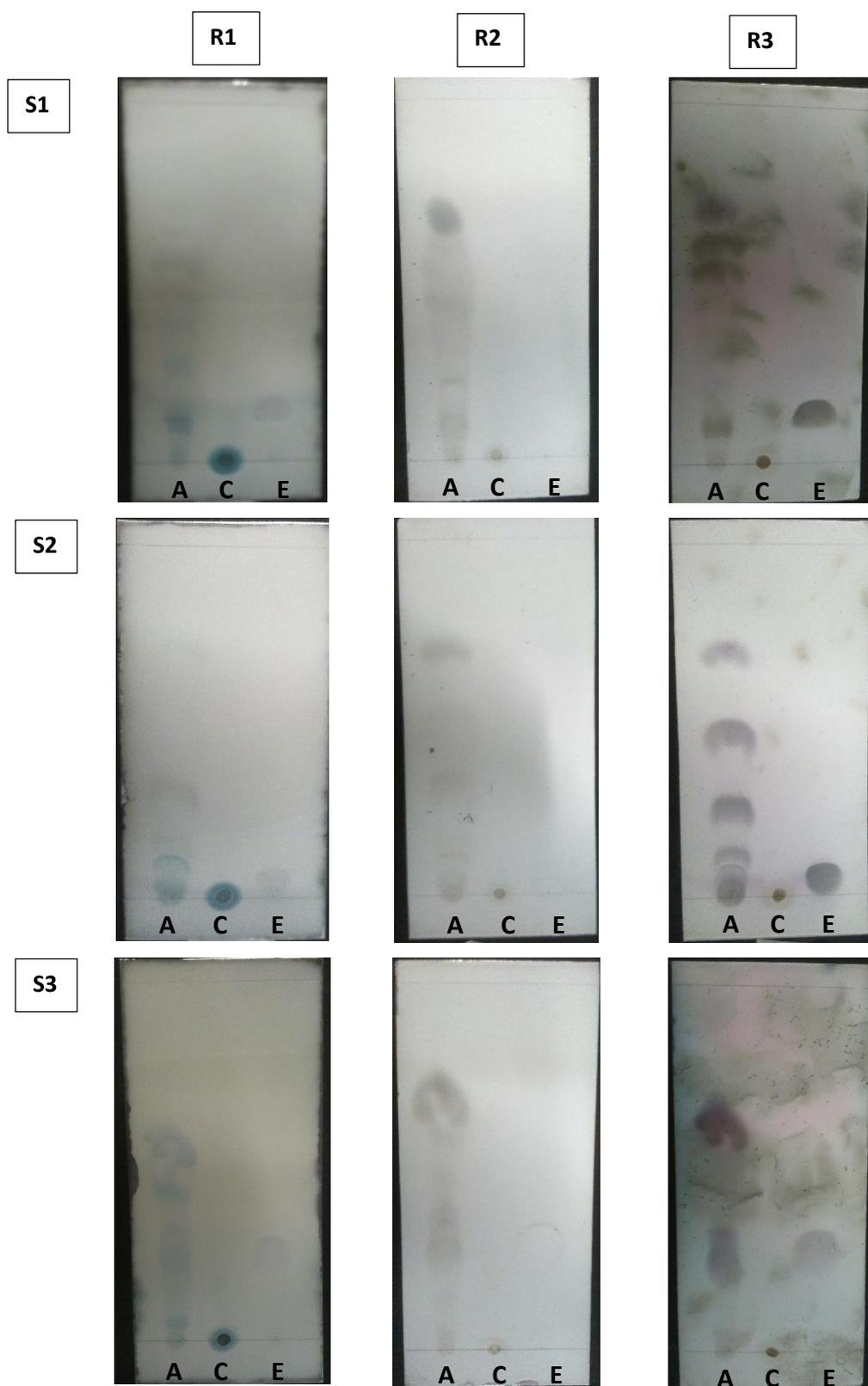


Figura 8. TLC de ceras. **(A):** Cera de abeja; **(C):** Coccerina; **(E):** estándar 1-octacosanol/1-triacontanol. **(S1):** Desarrollado en hexano/dietil éter/ ácido acético 85:15:2; **(S2)** Desarrollado en hexano/ dietil éter/ ácido acético 95:5:1; **(S3):** Desarrollado en hexano/dietil éter 6:4. **(R1):** Revelado con vainillina al 6% en H₂SO₄ al 1% en etanol; **(R2):** Revelado con CuSO₄ al 10% en H₃PO₄ al 8%; **(R3):** Revelado con H₂SO₄-agua 1:1.

Se calcularon los factores de retención (R_f) de cada componente separado de la cera de abeja y de los estándares de alcoholes alifáticos (Tabla 12), obteniendo valores de 0.03 a 0.71. Sin embargo al no contar con estándares de hidrocarburos, ácidos carboxílicos, aldehídos o cetonas, no es posible familiarizar las bandas obtenidas en las placas cromatográfica con alguno de estos compuestos, no obstante de acuerdo a reportes en los cuales se utilizaron estos sistemas de disolventes para el análisis de ceras (Hwang et al., 2002; Adhikari et al., 2006), establecieron que los hidrocarburos y ésteres alifáticos poseen valores de R_f de 0.66 a 0.8, triacilgliceroles de 0.3 a 0.47 y ácidos de 0.2 a 0.35. Información útil que puede correlacionarse con el análisis por FT-IR, donde se encontró evidencia de enlaces y grupos funcionales característicos de dichos compuestos.

Tabla 12. Comparación entre los valores de R_f de TLC obtenidos.

| Sistema de solvente | Revelador | | | | | | | | |
|--|---|----|------|---|----|------|---|----|------|
| | Vainillina al 6% en H ₂ SO ₄ al 1% en etanol (R1) | | | CuSO ₄ al 10% en H ₃ PO ₄ al 8% (R2) | | | H ₂ SO ₄ -agua 1:1 (R3) | | |
| | A | C | E | A | C | E | A | C | E |
| Hexano/dietil éter/ ácido acético 85:15:2 (S1) | 0.03 | ND | | 0.03 | ND | | 0.03 | ND | |
| | 0.1 | | | 0.06 | | | 0.1 | | |
| | 0.11 | | | 0.11 | | | 0.13 | | |
| | | | 0.15 | | | 0.15 | | | 0.15 |
| | 0.24 | | | 0.22 | | | 0.22 | | |
| | 0.28 | | | | | | 0.33 | | |
| | 0.39 | | | | | | | | |
| | 0.47 | | | 0.44 | | | | | |
| | 0.56 | | | 0.55 | | | 0.56 | | |
| | 0.65 | | | 0.65 | | | 0.63 | | |
| | | | | | | 0.71 | | | |
| Hexano/ dietil éter/ ácido acético 95:5:1 (S2) | 0.03 | ND | | 0.03 | | | 0.03 | ND | |
| | | | 0.05 | | ND | 0.05 | 0.06 | | 0.05 |
| | 0.1 | | | 0.09 | | | 0.12 | | |
| | 0.14 | | | 0.17 | | | | | |
| | | | | | | | 0.26 | | |
| | 0.31 | | | 0.3 | | | | | |
| | 0.47 | | | | | | 0.48 | | |
| | | | 0.51 | | | | | | |
| | | | 0.7 | | | 0.71 | | | |
| Hexano/dietil éter 6:4 (S3) | 0.05 | ND | | 0.04 | ND | | 0.05 | ND | |
| | | | | 0.15 | | | | | |
| | 0.23 | | 0.25 | | | 0.25 | 0.27 | | 0.26 |
| | 0.30 | | | 0.29 | | | 0.32 | | |
| | 0.37 | | | 0.37 | | | | | |
| | 0.54 | | | 0.52 | | | | | |
| | | | 0.69 | | | 0.64 | | | |

(A): Cera de abeja; (C): Coccerina; (E): estándar 1-octacosanol/1-triacontanol. (ND): No desarrollado.

Por otro lado los valores de R_f del estándar de alcoholes alifáticos vario en función del sistema de disolventes, obteniendo para el S1 0.15, S2 0.05 y S3 0.25. Se recomienda que los valores de R_f caigan en un intervalo de 0.2 a 0.8, a pesar de ello no se eligió el sistema S3 (único que cumplió con esta recomendación) dado que su capacidad de separar los componentes en la cera de abeja es inferior al S1, lo que brinda información útil al analizar las muestras obtenidas de la saponificación para elucidar la presencia de sustancias ajenas a los alcoholes alifáticos y así dar una idea de su pureza.

En cuanto a la coccerina, no se observó separación con ninguno de los sistemas de disolventes empleados. Chibnall et al. (1934) mencionan que la coccerina se encuentra constituida por dos partes ácidas y una alcohólica formando un compuesto de fórmula molecular $C_{30}H_{60}(C_{31}H_{62}O_3)_2$. Por lo que se puede suponer que al formar una cadena alifática tan grande su polaridad es muy baja, y por ello no es posible eluirlo con los disolventes utilizados, además de acuerdo con el análisis por FT-IR de esta cera, no se encontraron enlaces que evidencien la presencia de ácidos o alcoholes libres, lo cual se puede correlacionar con los resultados obtenidos en TLC.

8.2 Análisis de los cambios estructurales en la cera de abeja y coccerina debido a la saponificación por espectroscopia de infrarrojo.

Con la finalidad de estudiar las modificaciones estructurales en la cera de abeja y coccerina derivadas de su saponificación, se realizaron cinéticas para monitorear los cambios en el espectro de infrarrojo en función del tiempo, especialmente de las bandas características de enlaces éster a 1170 y 1735 cm^{-1} . Para ello se evaluó la reacción a temperaturas de 80, 130 y 200 °C, obteniendo muestras de la mezcla de reacción a tiempos de 1 a 8 h, las cuales se llevaron a peso constante a 50 °C y posteriormente fueron molidas hasta obtener un polvo fino el cual se utilizó para el análisis.

Se observaron diferentes cambios al comparar los espectros de FT-IR de la cera de abeja y sus hidrolizados obtenidos a 80 °C a tiempos de 1, 4, 6 y 8 h (Figura 9), indicando que los acilglicéridos presentes se hidrolizan desde la primera hora de reacción, lo cual es posible deducir por la desaparición de las bandas características de enlaces éster a 1170 y 1735 cm^{-1} de δ C–O–C y ν C=O respectivamente, para dar lugar a la formación de ácidos carboxílicos y alcoholes, lo cual se evidencia por la aparición de una banda ancha en el intervalo de 3000 a 3500 cm^{-1} de enlaces ν O–H de dichas moléculas, aunado a vibraciones en 1060 cm^{-1} del enlace δ C–O de alcoholes primarios y las tres bandas a 1539, 1556 y 1574 cm^{-1} de ν C=O de ácidos y cetonas. Por otro lado entre 1400 y 1440 cm^{-1} hay una serie de bandas que sugieren la presencia de R–CH₂–CO–R', ya que la flexión de los metilenos activos se observa como una

serie de frecuencias de vibración intensas en dicho intervalo. Los dobletes en 2848-2916, 1463-1471 y 729 cm^{-1} de metilenos, metilos y de cadenas de $(\text{CH}_2)_n$ con $n \geq 4$, se conservan independientemente del tiempo de reacción lo cual es de esperarse ya que son bandas características de compuestos alifáticos.

Es posible reducir los aldehídos y cetonas presentes en la cera de abeja a alcoholes primarios y secundarios respectivamente, sin embargo es poco probable que mediante la reacción llevada a cabo se de este proceso, ya que para ello se requiere el uso de NaBH_4 o LiAlH_4 . Sin embargo se podrían formar β -hidroxialdehídos o β -hidroxicetonas por una reacción de condensación aldólica (favorecida por el medio básico en el cual se lleva a cabo la saponificación) que de paso a la obtención de sistemas conjugados de un carbonilo α , β -insaturado, explicando la aparición de la banda ancha a 1630 cm^{-1} del enlace $\nu \text{C}=\text{C}$ conjugado no terminal, descartando que este corresponda a compuestos aromáticos por la ausencia de sobretonos en la región de 1700 a 2000 cm^{-1} .

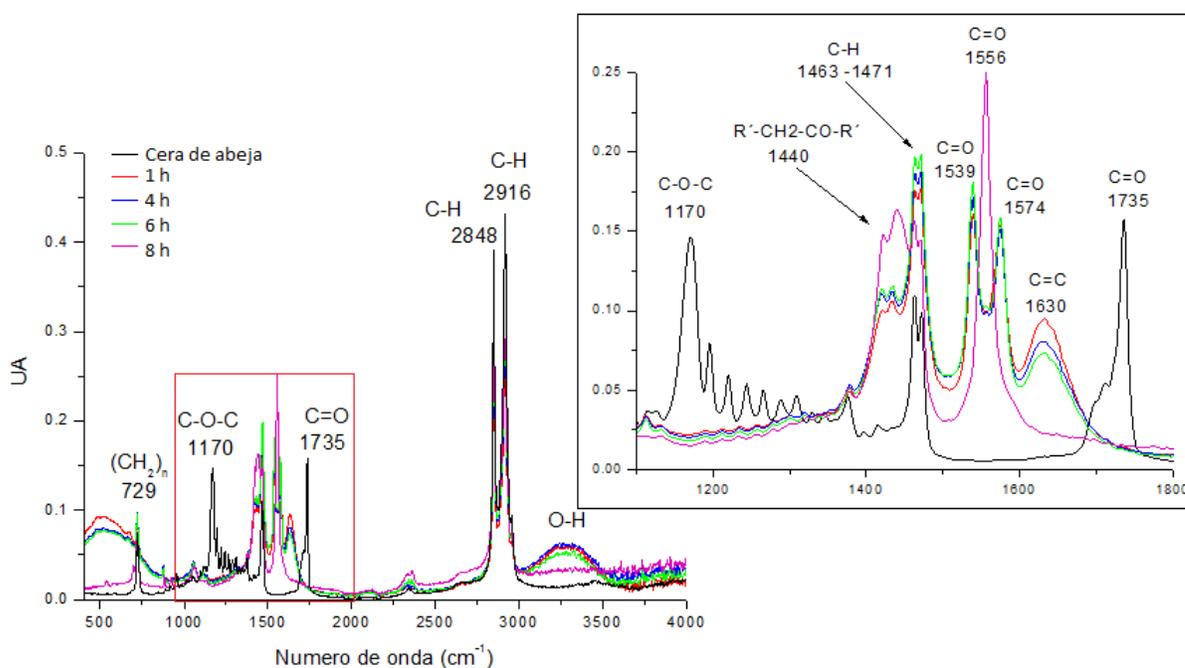


Figura 9. Espectros de FT-IR del monitoreo de la hidrólisis de cera de abeja a 80 °C durante 8 h de reacción.

En los espectros de FT-IR de las cinéticas realizadas a 130 y 200 °C (Anexo 11.1) se observaron los mismos cambios descritos anteriormente, con la única excepción de no presentar la banda a 1556 cm^{-1} correspondiente al enlace $\nu \text{C}=\text{O}$. Podría considerarse que este carbonilo pertenezca a un aldehído o

cetona, al cual mediante la aplicación de una mayor energía térmica provoque su descomposición para formar otras especies químicas, explicando la ausencia de la banda en cuestión.

El análisis de los cambios en la coccerina en función de la temperatura y tiempo de reacción también fue realizado. En la figura 10 se muestran los espectros de FT-IR de esta cera y sus hidrolizados obtenidos a 80 °C a tiempos de 1, 4, 6 y 8 h, en los cuales se puede observar que al igual que en la cera de abeja, los dobletes en 2848-2916, 1463-1473 y 729 cm^{-1} característicos de CH_2 , CH_3 y cadenas de $(\text{CH}_2)_n$ con $n \geq 4$ respectivamente, propios de compuestos alifáticos, se conservan independientemente del tiempo de reacción.

Por otro lado se puede decir que la temperatura a la cual se llevó a cabo la hidrolisis no favorece la ruptura de los esteres, dado que las bandas características de este tipo de enlace encontradas entre 1000 – 1200 cm^{-1} de δ C-O y δ C-O-C así como a 1731 cm^{-1} del C=O aún se encontraron presentes transcurridas 8 h de reacción, no obstante por la aparición de una banda ancha e intensa entre 3000 y 3500 cm^{-1} , se puede decir que hay cierto grado de ruptura lo cual permite liberar especies con enlaces ν O-H. Adicionalmente las bandas a 1379 y 1415 cm^{-1} sugieren la presencia de metilenos activos ($\text{R}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{R}'$).

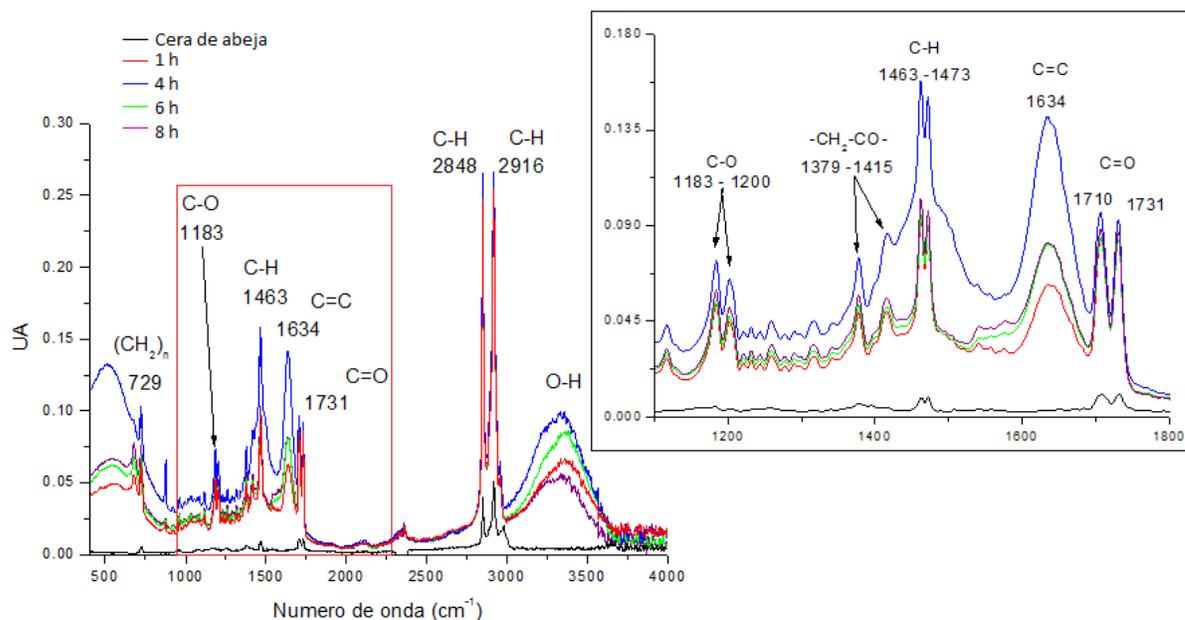


Figura 10. Espectros de FT-IR del monitoreo de la hidrolisis de coccerina a 80 °C durante 8 h de reacción.

Se sabe que las frecuencias de vibración de tensión del carbonilo de esterés, cetonas, aldehídos, y ácidos carboxílicos abarca el intervalo de 1540 a 1850 cm^{-1} , encontrándose bandas principalmente entre 1710 y 1735 cm^{-1} . Aunado a esto, en un análisis previo de la coccerina se determinó la ausencia de ácidos libres al no encontrar evidencia de enlaces v O-H con vibraciones entre 3000 y 3500 cm^{-1} . Por otro lado aldehídos presentan un grupo de característico de dos frecuencias de tensión C-H entre 2700 y 2800 cm^{-1} que no se encuentran en ácidos ni cetonas, las cuales tampoco fueron detectadas.

Es por ello que posiblemente el doblete a 1710 y 1731 cm^{-1} corresponde al carbonilo de una cetona y de un éster respectivamente. De esta forma, la presencia de un grupo cetona podría explicar la banda ancha e intensa a 1634 cm^{-1} del enlace v C=C conjugado no terminal, que puede corresponder a sistemas conjugados de un carbonilo α , β -insaturado, obtenido de una β -hidroxicetonas mediante una reacción de condensación aldólica. Reforzando esta hipótesis, Meinwald et al. (1975), determinaron la estructura de la coccerina del insecto *Dactylopius confusus* concluyendo que la cera consiste en un 15-oxotetra-triacontanil 11-oxotetratriacontanoato (Figura 11), compuesto que posee dos grupos cetona y un grupo éster. En los espectros de FT-IR de las cinéticas realizadas a 130 y 200 °C (Anexo 11.2) se encontraron los mismos resultados anteriormente descritos.

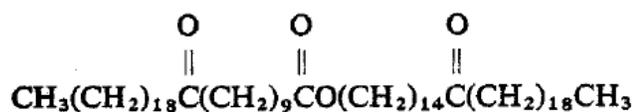


Figura 11. Estructura de la coccerina de *Dactylopius confusus*.

En resumen, los resultados obtenidos revelaron que la hidrólisis de los esterés en la cera de abeja se puede completar a 80 °C dese la primera hora de reacción, y que en el caso de la coccerina la ruptura total de estos compuestos no se completa incluso a alta temperatura y tiempos de reacción prolongados.

Por otro lado la información proporcionada por este análisis, también se utilizó como punto de referencia para el estudio en el cual se utilizó cera de abeja como inductor de actividad lipolítica en medio líquido, y de esta forma analizar los cambios que experimenta en dichas condiciones en comparación con los obtenidos por su hidrólisis química.

8.3 Obtención de policosanol por saponificación de cera de abeja y coccerina

La obtención de alcoholes primarios alifáticos a partir de cera de abeja y coccerina fue llevada a cabo por saponificación en etanol (Wang et al.2007). Para ello se estudió el efecto del tiempo y temperatura de reacción en el rendimiento del producto, evaluando la hidrólisis a 80, 130 y 200 °C a 2, 4, 6 y 8 h.

El policosanol resultante de ambas ceras consistió en un polvo fino color blanco, sin embargo en algunos casos se obtuvieron productos ligeramente amarillentos, lo cual puede deberse al uso de acetona en la operación de cristalización, ya que la propiedad lipofílica de este solvente puede derivar en la disolución de sustancias lipídicas coloreadas (Wang et al., 2007).

Por otro lado el rendimiento de los productos obtenidos a partir de la cera de abeja a 80 y 130 °C fue similar, con valores entre 37 y 43 % (369 a 433 mg de policosanol/g de cera), mientras que a 200 °C el valor máximo fue de 37% que equivale a 371 mg de policosanol/g de cera (Figura 12). En este caso, se observó que aparentemente la temperatura y tiempo de reacción no afectan de forma significativa el rendimiento, sin embargo no se realizó un estudio más detallado que permitiera conocer la proporción y composición de la mezcla de alcoholes grasos, ya que en base al análisis por TLC y FT-IR se determinó que los productos no se obtuvieron de forma pura, a pesar de llevar a cabo la cristalización con acetona y una recrystalización con etanol.

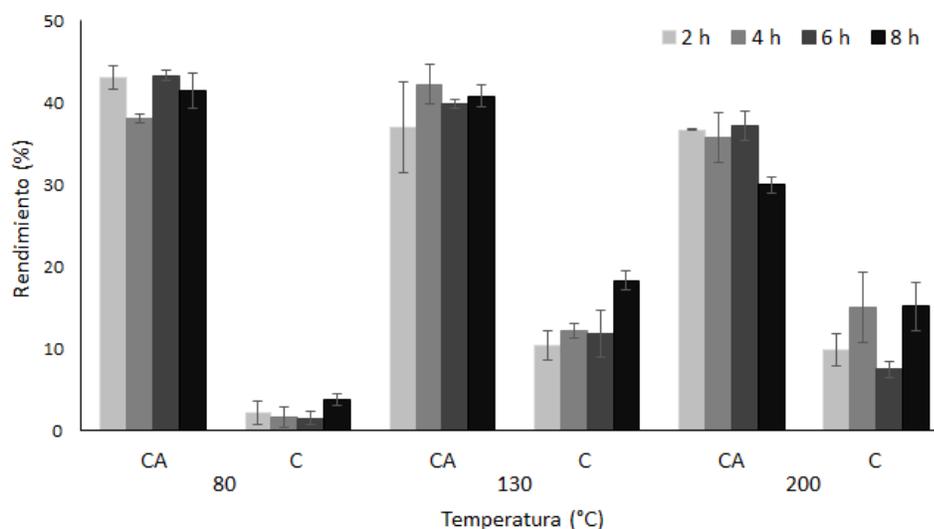


Figura 12. Comparación del rendimiento de policosanol obtenido por saponificación de cera de abeja y coccerina a diferentes temperaturas y tiempos de reacción. **(CA):** Policosanol obtenido de cera de abeja **(C):** Policosanol obtenido de coccerina.

En lo que respecta a la coccerina, el rendimiento de los productos obtenidos a temperaturas bajas y tiempos cortos de reacción es menor en comparación a los que se alcanzaron por el aumento de estas variables, ya que a 80 °C se obtuvo como máximo 37 mg de policosanol/g de cera, que es equivalente a un rendimiento del 3.74%, mientras que a 130 y 200 °C fue de 18 y 15% que corresponde a 182 y 151 mg de policosanol/g de cera respectivamente. Cabe señalar que independientemente de la temperatura, el rendimiento aumento en función del tiempo de reacción, sin embargo al igual que en la cera de abeja el análisis por TLC y FT-IR revelo que la mezcla de alcoholes no es pura.

La proporción de policosanol obtenida de la cera de abeja fue mayor en comparación a la de coccerina en todos los experimentos realizados (Figura 12). Esto fue más evidente en las hidrolisis a 80 °C, donde hubo una diferencia de hasta 20 veces en el rendimiento, no obstante a 130 y 200 °C esta se redujo, obteniendo de 2 a 5 veces más policosanol de cera de abeja con respecto a la coccerina.

En varios estudios se ha analizado la composición de la cera de abeja, encontrando que la mayor abundancia corresponde a mono, di y tri esterres con un porcentaje de entre 35 y 45 % e incluso mayor (Bonvehi & Bermejo, 2012; Jiménez et al., 2003; Jiménez et al., 2004; Jiménez et al., 2006), siendo los esterres de ácido palmítico con alcoholes de C₂₂ a C₃₆ los más abundantes, por lo que es de esperarse un mayor rendimiento de policosanol utilizando esta cera con respecto a la coccerina, tal y como se vio reflejado en este análisis.

Por otro lado aunque la información sobre la constitución de la coccerina es poca, se ha reportado que su estructura consta de un compuesto formado por un alcohol di-hídrico de fórmula C₃₂H₆₆O₂ y dos fracciones de hidroxiaácido de fórmula C₃₁H₆₂O₃ (Chibnall et al., 1934), no obstante Meinwald et al. (1975) también determinaron la estructura de esta cera mediante métodos químicos e instrumentales, concluyendo que se trata de un 15-oxotetra-triacontanil 11-oxotetra-triacontanoato (Figura 10), compuesto que posee dos grupos cetona, los cuales podrían generar reacciones secundarias y afectar de este modo la formación del alcohol y ácido correspondiente, lo que podría explicar un bajo rendimiento de policosanol.

Aunado a esto, es importante mencionar que al realizar las cinéticas para observar cambios en el espectro debido a la saponificación de la coccerina, se encontró que las bandas correspondientes a frecuencias de vibración del carbonilo y enlaces C-O característicos de esterres no desaparecen por completo incluso a 200 °C y 8 h de reacción, lo cual supone una hidrolisis incompleta, que

consecuentemente afecta la cantidad de policosanol obtenido. Considerando estos hechos cabe la posibilidad de que la saponificación no sea el método más adecuado para la obtención de alcoholes grasos a partir de coccerina, así para comprobar esta teoría, podría considerarse aumentar el tiempo de reacción y monitorear por espectroscopia de FT-IR el punto en el cual las bandas asociadas a esteres desaparecen por completo y de no obtener un resultado favorable, se podrían explorar alternativas como la implementación de una hidrolisis ácida.

8.3.1 Análisis de los productos obtenidos por TLC y FT-IR

Se realizó TLC del policosanol obtenido de cera de abeja con la finalidad de obtener información acerca de su pureza, para lo cual se aplicaron a una placa de gel de sílice de 10 x 14cm de 250 μm de espesor, muestras de cada temperatura y tiempo de reacción (200 μg aprox.), así como de los estándares 1-octacosanol y 1-triacontanol (100 μg aprox.) disueltas en cloroformo. Después de desarrollar la placa con hexano/dietil éter/ ácido acético 85:15:2 y revelar con vainillina al 6% en H_2SO_4 y calentamiento, se observaron en todas las muestras dos bandas (Figura 13), **A** con un R_f de 0.33 que coincidió con el de los estándares y **B** con R_f de 0.77, indicando la presencia de por lo menos un componente ajeno al policosanol.

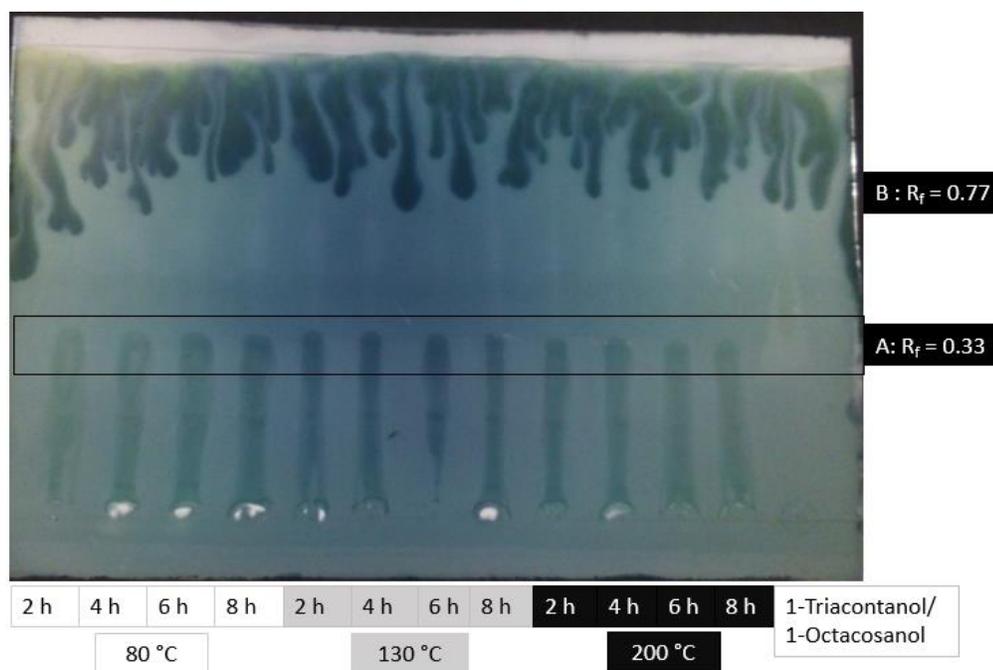


Figura 13. TLC de policosanol obtenido de cera de abeja a diferentes temperaturas y tiempos de reacción. Desarrollado en hexano/dietil éter/ ácido acético 85:15:2 y revelado con vainillina al 6% en H_2SO_4 al 1% en etanol.

El análisis por TLC del policosanol obtenido a partir de coccerina también fue realizado. Al desarrollar y revelar la placa cromatográfica también fueron observadas dos bandas (Figura 14), **A** con un R_f de 0.21 que concordó con la los estándares de alcoholes primarios alifáticos, sin embargo esta solo fue visible en las muestras obtenidas a 200 °C, mientras que en la respectivas a 80 y 130 °C no fue detectada, y **B** con un R_f de 0.86, la cual está presente en todas las muestras.

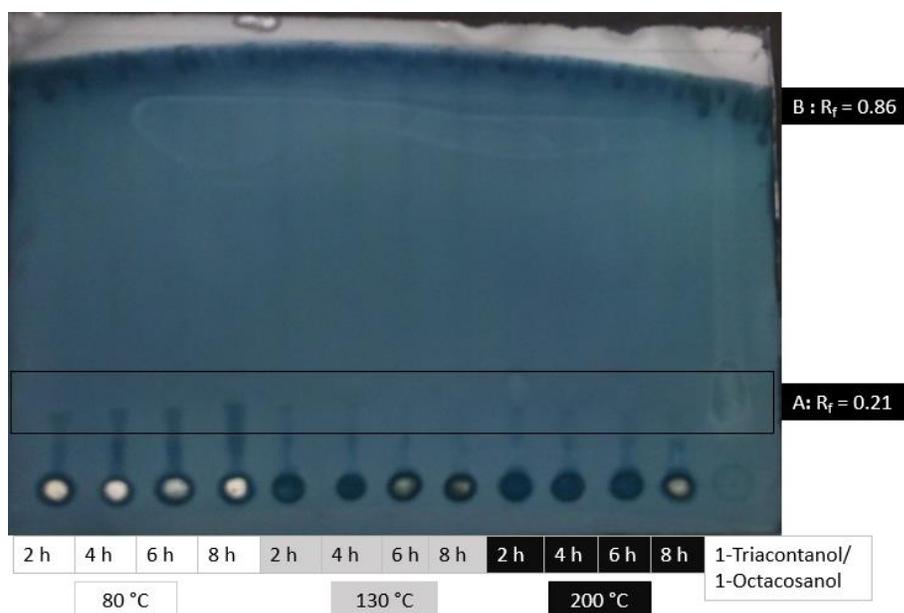


Figura 14. TLC de policosanol obtenido de coccerina a diferentes temperaturas y tiempos de reacción. Desarrollado en hexano/dietil éter/ ácido acético 85:15:2 y revelado con vainillina al 6% en H_2SO_4 al 1% en etanol.

Mediante la aplicación de esta técnica se comprobó la presencia de alcoholes alifáticos en las muestras tanto de cera de abeja como de coccerina, además se pudo deducir que los productos no fueron obtenidos totalmente puros dada la presencia de un componente con un R_f de 0.77 y 0.86 respectivamente, el cual puede corresponder a hidrocarburos alifáticos en base a la polaridad del sistema de solventes utilizado.

Por otro lado, el que no se haya detectado la presencia de alcoholes grasos en las muestras de policosanol de coccerina a 80 y 130 °C, no quiere decir que no estén presentes, ya que su proporción podría ser tan baja que mediante TLC no pueden ser detectados, siendo el mismo caso para algunas impurezas. Por esta razón se realizó el análisis por espectroscopia de infrarrojo de los estándares de

alcoholes primarios alifáticos, con el objetivo de identificar sus bandas características y comparar con los espectros del policosanol obtenido de las ceras, además de buscar frecuencias ajenas a las que presentan estos compuestos, lo cual permitió dar una idea del tipo de impurezas que pudieran estar presentes.

En los espectros de FT-IR de 1-octacosanol y 1-triacontanol (Figura 15) se encontraron dobletes a 720-729 cm^{-1} , 1461-1471 cm^{-1} y en 2848-2914 cm^{-1} , propios de vibraciones de flexión y tensión de enlaces C-H de metilenos y metilos propios de la fracción alifática del alcohol, así como a 1060 cm^{-1} de δ C-O y de 3000 a 3500 cm^{-1} de ν O-H. Por otro lado en los espectros correspondientes al policosanol de cera de abeja obtenido a 200 °C y diferentes tiempos de reacción, fueron encontradas las mismas frecuencias de vibración que en los estándares, no obstante las bandas a 1539 y 1575 cm^{-1} de enlaces de tensión del carbonilo (posiblemente del grupo R-COO⁻), sugirieron la presencia de ácidos.

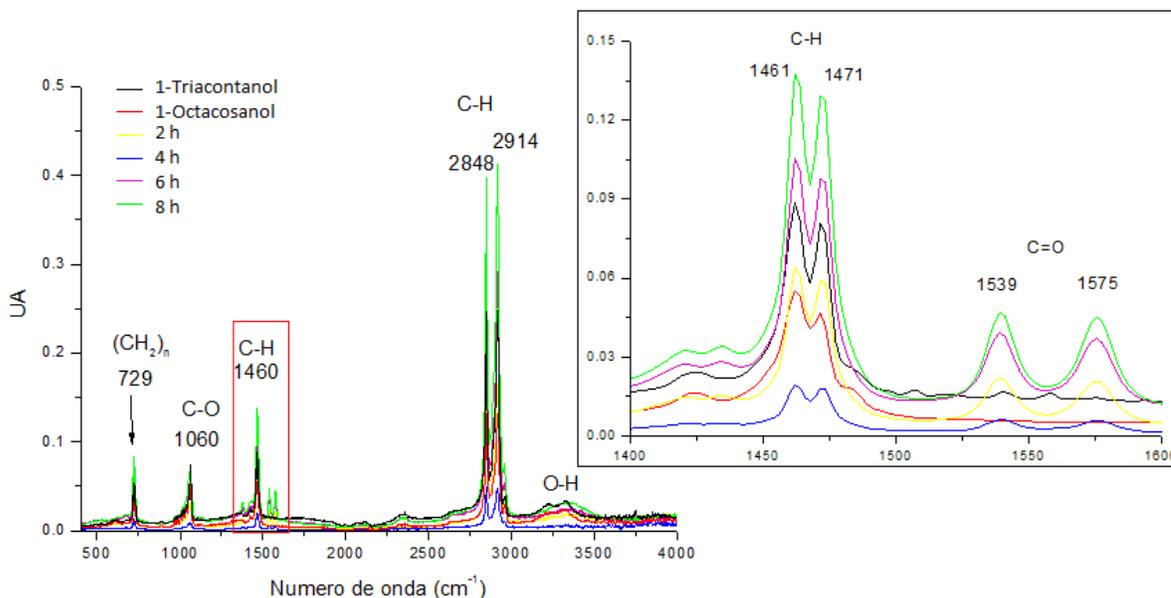


Figura 15. Espectros de FT-IR de policosanol obtenido de cera de abeja a diferentes tiempos de reacción a 200 °C y de estándares comerciales 1-Octacosanol y 1-Triacontanol.

Entonces, correlacionando la información obtenida por TLC y FT-IR, se puede decir que por la saponificación de cera de abeja es posible obtener una mezcla de alcoholes alifáticos. Sin embargo el proceso de purificación no fue favorable, ya que se encontró evidencia de ácidos grasos por la presencia

de bandas en el espectro de IR características del carbonilo, y posiblemente hidrocarburos por el componente con un R_f de 0.77 en TLC, ya que Hwang et al., (2002) al analizar por esta técnica cera de sorgo, reportan que dicha clase de compuestos poseen valores de R_f entre 0.7 a 0.85 bajo las condiciones realizadas en esta prueba, además cabe señalar que las bandas en IR propias de hidrocarburos poseen las mismas frecuencias de vibración que la fracción alifática de los alcoholes grasos, lo que impide conocer la contribución de cada especie, por lo que necesario implementar una técnica cuantitativa como GC-MS, por medio de la cual se calcule la abundancia de estas. Los espectros de las muestras de policosanol obtenidas a 80 y 130 °C mostraron las mismas características anteriormente descritas (Anexo 11.3).

De igual forma se analizaron de los espectros de FT-IR del policosanol obtenido de coccerina por saponificación a 200 °C, encontrando presentes todas las bandas características de alcoholes primarios alifáticos, sin embargo al comparar con los estándares se observaron cinco frecuencias de vibración a 1379, 1416, 1435 1583 y 1705 cm^{-1} que no corresponden a octacosanol o triacontanol (Figura 16).

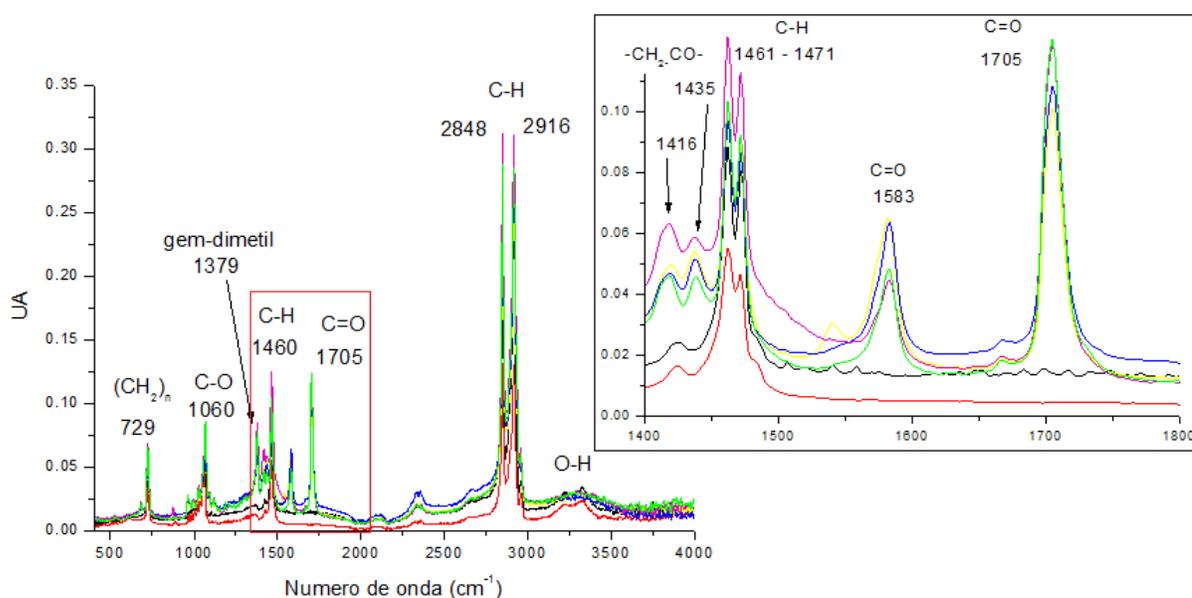


Figura 16. Espectros de FT-IR de policosanol obtenido de coccerina a diferentes tiempos de reacción a 200 °C y de estándares comerciales 1-Octacosanol y 1-Triacontanol.

La banda a 1379 cm^{-1} indica la presencia de compuestos con metilos geminales, mientras que las vibraciones a 1416 y 1435 cm^{-1} son características de metilenos unidos a un carbonilo ($-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{CH}_2$),

y/o metilenos junto a un doble enlace, además hay dos bandas que son indicativo de dos carbonilos distintos, a 1583 cm^{-1} que puede corresponder a una cetona y en 1705 cm^{-1} probablemente de un aldehído unido a un doble enlace. El que esta clase de compuestos pueda encontrarse en las muestras de policosanol a partir de coccerina, puede deberse a que la polaridad de los grupos funcionales R-OH, R-COH y $R_1\text{-CO-R}_2$ es muy similar, lo cual no favorece la separación de los alcoholes grasos por cristalización. Sin embargo para tener una idea más precisa en cuanto a la composición de los productos y la proporción de alcoholes alifáticos en estos, es necesario implementar técnicas de análisis cuantitativo para obtener información que permita comprobar y/o descartar lo anteriormente mencionado. En los espectros de FT-IR correspondientes al policosanol obtenido a $130\text{ }^\circ\text{C}$ fueron encontrados resultados similares (Anexo 11.4). Por otro lado en los productos de reacción a $80\text{ }^\circ\text{C}$, se detectaron mínimas vibraciones de tensión O-H entre 3000 y 3500 cm^{-1} , por lo que en relación al análisis por TLC donde no se encontró evidencia de alcoholes primarios alifáticos, se puede decir que bajo dichas condiciones de reacción la obtención de policosanol a partir de coccerina no es favorable.

8.2 Análisis cualitativo para la producción de enzimas lipolíticas.

Para determinar si la cera de abeja y coccerina pueden inducir la producción de enzimas lipolíticas en las cepas *Bs-1*, *Bs-2* y *Bs-3*, se realizaron pruebas en placa utilizando los medios MM y MN adicionados con el 2% p/v de cera. Las características de crecimiento en cada cultivo así como la detección de actividad lipolítica por los ensayos con CuSO_4 y rodamina B, se evaluaron cada 24 h.

En la figura 17 se muestran los resultados obtenidos con *Bs-1*. El crecimiento de esta cepa en MM consistió en colonias de forma rizoide con bordes enteros y de elevación plana. A 24 h de cultivo se observaron colonias blancas, sin embargo después de 48 h se tornaron rojizas lo cual puede deberse a la presencia de FeSO_4 en el medio, ya que esta sal podría estar formando algún complejo con productos del metabolismo bacteriano dando lugar a un cromóforo. Mediante el ensayo con rodamina B fue posible detectar actividad lipolítica por la pérdida de fluorescencia desde las 24 h, lo cual se hizo más evidente en los cultivos con mayor tiempo de incubación. Utilizando CuSO_4 como revelador también dio buenos resultados, observándose una coloración verdosa en la periferia de las colonias, lo cual se detectó desde las 24 h de incubación.

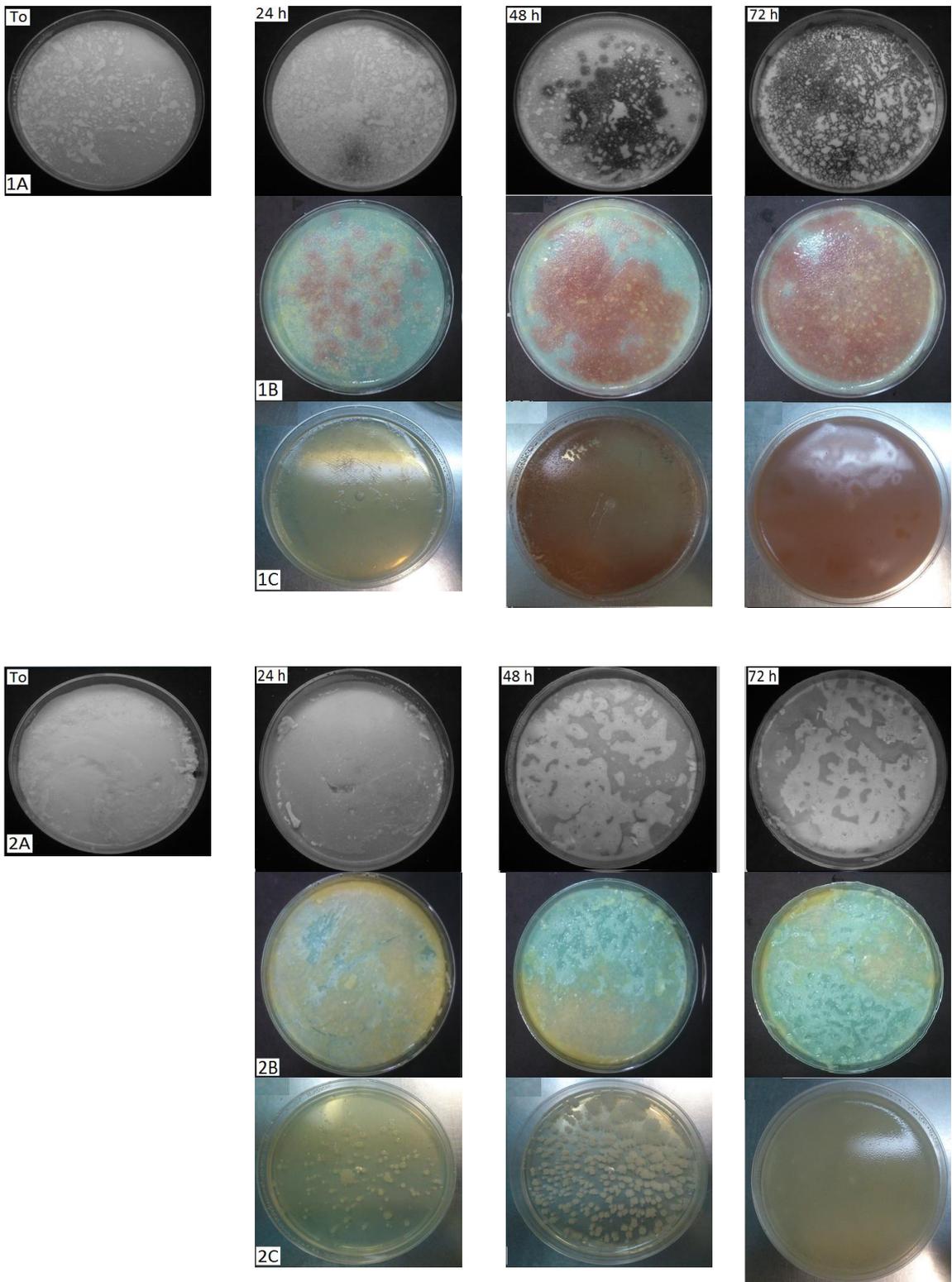


Figura 17. Historial de crecimiento a 72 h de *Bs-1* durante pruebas cualitativas de actividad lipolítica utilizando cera de abeja como inductor. **(1)** Cultivado en medio MM; **(2)** Cultivado en medio MN. **(A)**: Ensayo con Rodamina B; **(B)**: Ensayo de revelado con CuSO_4 ; **(C)**: Control.

Por otro lado, en MN se observaron de colonias circulares, planas, de bordes enteros y consistencia cremosa, que después de 48 h toman un aspecto filamentosos, sin embargo en MN con el 2% de cera de abeja las colonias son de forma irregular presentando bordes filamentosos desde las 24 h de incubación. Además, el ensayo con rodamina B en los cultivos de MN no es favorable, ya que la pérdida de fluorescencia no fue tan evidente con respecto a las placas de MM, sin embargo utilizando el revelado con CuSO₄ se obtuvo una respuesta positiva al observar una coloración azul verdosa en la periferia de las colonias.

La morfología colonial de *Bs-2* en MM y MN fue similar a la de *Bs-1*, mientras que la de *Bs-3* consistió en colonias opacas, circulares, convexas y de borde entero color blanco indistintamente del medio de cultivo utilizado. En la tabla 13 se muestran los resultados obtenidos en la detección de actividad lipolítica de las tres cepas, como se puede observar *Bs-1* y *Bs-2* dieron positivo en ambos ensayos con cera de abeja como inductor, mientras que la cepa *Bs-3* dio negativo a todas las pruebas, por lo que se puede suponer que: el microorganismo no produce enzimas lipolíticas, los medios de cultivo empleados no favorecen su expresión o los ensayos llevados a cabo para detectar la actividad no son adecuados para este caso particular.

Tabla 13. Resultados de la evaluación cualitativa en placa para la detección de actividad lipolítica.

| Cepa | Ensayo | Inductor / Medio de cultivo | | | |
|-------------|--------|-----------------------------|----|-----------|----|
| | | Cera de abeja | | Coccerina | |
| | | MM | MN | MM | MN |
| <i>Bs-1</i> | A | + | + | - | - |
| | B | + | + | - | - |
| <i>Bs-2</i> | A | + | + | - | - |
| | B | + | - | - | - |
| <i>Bs-3</i> | A | - | - | - | - |
| | B | - | - | - | - |

(MM): Medio mineral, **(MN):** Medio nutriente. **(A):** Ensayo de revelado con solución acuosa de CuSO₄; **(B):** Ensayo con Rodamina B.

Cabe señalar que independientemente de la cepa y medio de cultivo utilizado, se encontró que la coccerina no induce una respuesta positiva, lo cual puede deberse a la baja concentración o ausencia

de compuestos de carácter lipídico como ácidos grasos y ésteres de ácido palmítico, los cuales si están presentes en la cera de abeja y son un factor determinante en este tipo de pruebas.

8.4 Caracterización del crecimiento de *Bs-1* en medio líquido a diferentes condiciones de cultivo

En base a las pruebas en placa donde se determinó que el mejor inductor de actividad lipolítica fue la cera de abeja, y considerando que *Bs-1* y *Bs-2* presentaron las mismas características de crecimiento, la cepa *Bs-1* fue seleccionada para llevar a cabo estudios en medio líquido utilizando la composición basal de MM y MN como control y adicionando el 2% de cera de abeja para inducir la producción de enzimas lipolíticas. Se caracterizó el perfil de crecimiento y pH en función del tipo de inóculo empleado (esporas o células).

En la figura 18 se muestran los perfiles de crecimiento de *Bs-1* obtenidos en cinéticas de germinación utilizando 10^7 esporas como inóculo, donde se muestra que independientemente del medio de cultivo utilizado, a un tiempo de 5 h fue posible observar las primeras células. La fase de adaptación en MM tuvo una duración aproximada de 10 h, posteriormente se vio un crecimiento más pronunciado que tuvo una tendencia lineal, obteniéndose una concentración de biomasa máxima de 9×10^8 células /ml tanto en el medio control como en el adicionado con cera de abeja.

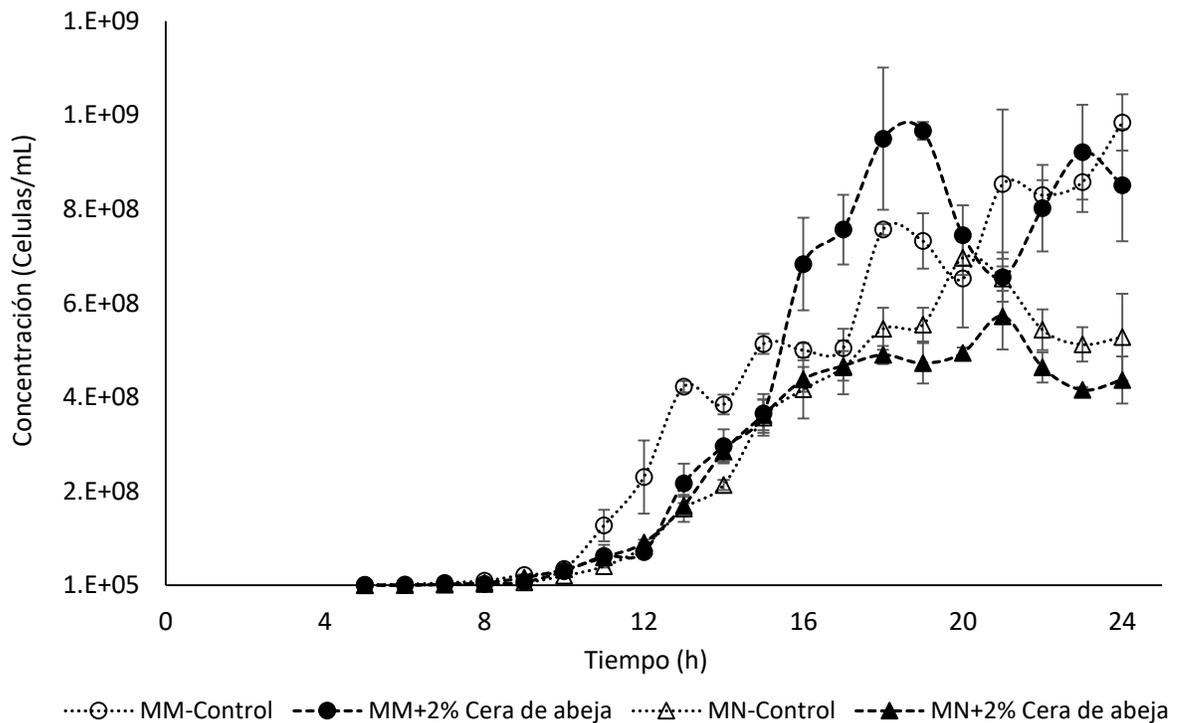


Figura 18. Perfiles de crecimiento celular de *Bs-1* en cultivos de germinación en MM y MN.

Por el contrario, en los cultivos con MN se observó un mayor crecimiento en el intervalo de 10 a 16 h, seguido de una fase estacionaria donde la concentración celular se mantuvo constante entre 5×10^8 y 6×10^8 células/ml tanto en el control como en el medio adicionado con el inductor

Es importante destacar que la adición de cera de abeja para inducción de enzimas lipolíticas parece no inhibir el crecimiento celular, ya no hay diferencias significativas en la concentración de biomasa entre MM y MM +2% cera, lo cual también se observó en MN. No obstante la cantidad de células obtenida en los cultivos con MM fue mayor con respecto a los de MN, lo cual fue más evidente después de las 18 h.

Los perfiles de pH en los medios utilizados para la germinación fueron analizados (Figura 19). La diferencia más marcada se vio a partir de las 11 h, que coincide con el cambio en el metabolismo celular, dado que a partir de este tiempo la velocidad de crecimiento aumento. Al utilizar MN se favorece la producción de metabolitos de carácter básico, obteniendo un pH final en el medio de 8.25, mientras que en MM son de naturaleza acida, donde el pH disminuye de 7.0 a 5.5 entre las 5 y 17 h, y posteriormente asciende a 6.4. Las diferencias entre ambos perfiles pueden ser explicadas por la disponibilidad y tipo de nutrientes en cada medio de cultivo, lo cual tiene una estrecha relación con la naturaleza de los productos del metabolismo que se generan bajo cada condición.

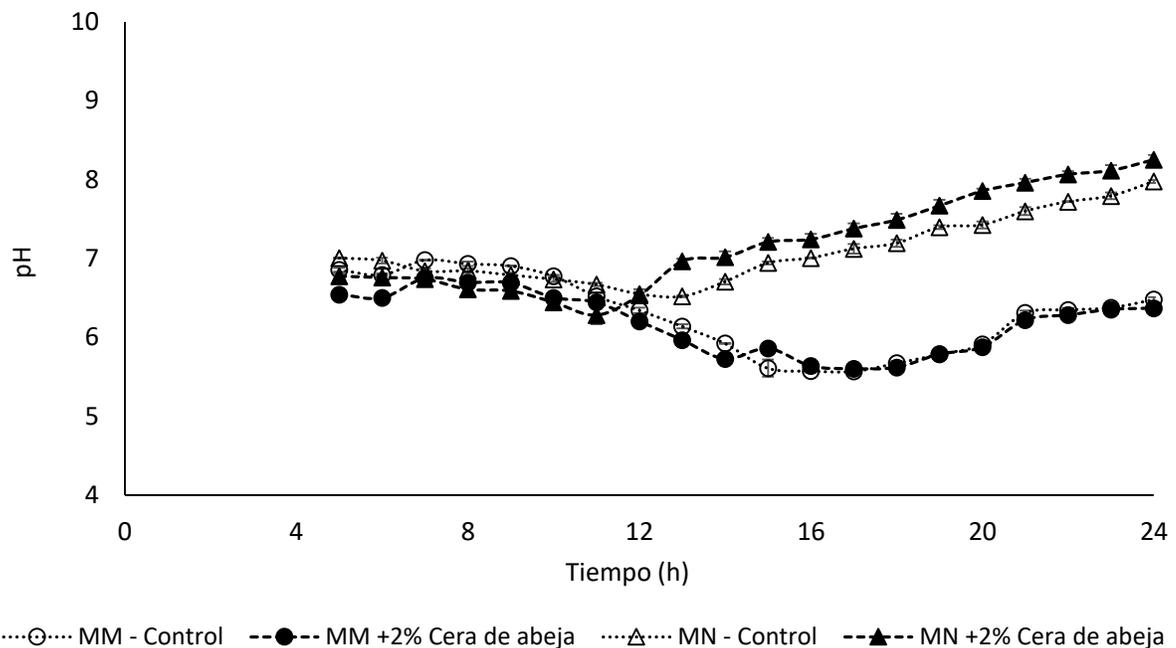


Figura 19. Perfiles de pH de *Bs-1* en cultivos de germinación utilizando MM y MN.

Por ejemplo, en MM la fuente de carbono es glucosa. Harwood (1989), menciona que cuando *Bacillus* es crecido en este monosacárido, ácidos orgánicos como el piruvato y acetato son acumulados en el medio reduciendo el pH entre 5 y 6. Después que la glucosa es agotada y las enzimas del ciclo de Krebs se inactivan por diferentes mecanismos de regulación, principalmente por la disponibilidad del sustrato, ya que tanto la vía de glucolisis como del ciclo de Krebs están integradas de forma que solo se metaboliza la cantidad de glucosa necesaria para abastecer al ciclo y de esta forma cubrir las necesidades energéticas de la célula, los ácidos orgánicos son utilizados como fuente de carbono y el pH del medio asciende alrededor de 7, así un reajuste en las enzimas del metabolismo intracelular permite utilizar fuentes de carbono alternas. Mientras que MN es un medio complejo constituido de peptonas y extracto de carne que sirven como fuente de carbono y nitrógeno. El extracto de carne contiene aminoácidos, péptidos y nucleótidos que pueden ser catalizados a piruvato, acetyl CoA y NH₃, por lo que las bacterias que tienen la capacidad de degradar esta clase de moléculas, tienden a alcalinizar el medio de cultivo debido a la liberación de amoníaco que es altamente miscible en soluciones acuosas.

De igual forma se llevaron a cabo cultivos de propagación los cuales se inocularon con el 5% v/v de un pre-cultivo incubado por 15 h, obteniendo los respectivos perfiles de crecimiento (Figura 20). Utilizando MM (tanto control como con el 2% de cera) la tendencia de crecimiento fue lineal y no se observó una fase de adaptación, sin embargo es evidente que la mayor velocidad de crecimiento fue entre las primeras 10 h, obteniendo una máxima concentración de biomasa de 1×10^9 células/ml al término del experimento. En MN durante las primeras 4 h el crecimiento fue bajo incrementándose notablemente entre las 5 y 10 h, seguido de una fase estacionaria donde la máxima producción de biomasa fue de 6×10^8 células/ml.

Cabe señalar que de la misma forma que en los cultivos de germinación, la adición de cera de abeja para la inducción de enzimas no inhibe el crecimiento celular en los cultivos de propagación, dado que no hubo diferencias significativas en la cantidad de biomasa obtenida entre los medios de composición basal utilizados como control, y los empleados con el 2% de cera. No obstante la concentración celular entre MM y MN después de las 16 h es claramente diferente, siendo un orden de magnitud mayor en el medio mineral con respecto al nutriente.

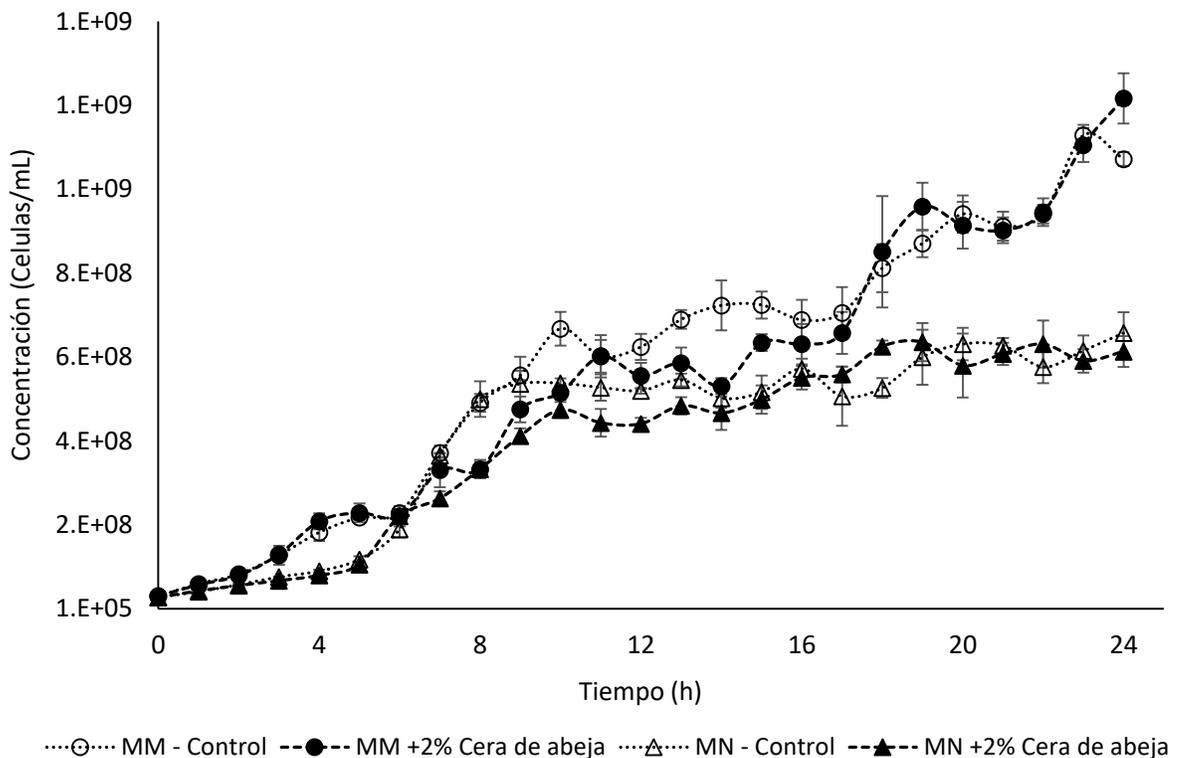


Figura 20. Perfiles de crecimiento celular de *Bs-1* en cultivos de propagación en MM y MN.

Los perfiles de pH en los cultivos de propagación también fueron analizados (Figura 21), donde fue posible observar que poseen las mismas características con respecto a los obtenidos en los cultivos de germinación. Es decir, por el uso de MN la cepa *Bs-1* adopta un metabolismo en el cual los productos generados son alcalinos, obteniendo un pH en el medio de hasta 8.3, mientras que en MM se obtienen metabolitos ácidos que disminuyen el pH hasta 5.5 después de 12 h, el cual posteriormente aumenta alrededor de 6.27. Este fenómeno es evidente a partir de las 5 h.

En resumen, debido al estado de dormancia en el que se encuentra el inóculo utilizado en los cultivos de germinación, la fase de latencia es muy prolongada, ya que las esporas monitorean las condiciones ambientales y cuando estas son favorables, comienza la germinación para convertirse nuevamente en células. De esta forma bajo las condiciones experimentales manejadas, este proceso tiene una duración aproximada de 10 h indistintamente de utilizar MM o MN, donde en las primeras 5 h se da la germinación, y de las 6 a 10 h las células se adaptan al medio sintetizando la maquinaria enzimática necesaria para alcanzar una duplicación celular mayor. Contrariamente, al emplear células como inóculo

se observó una mayor tasa de crecimiento durante las primeras horas, seguido de un descenso para dar origen a una fase estacionaria, la cual fue más evidente en los cultivos con MN.

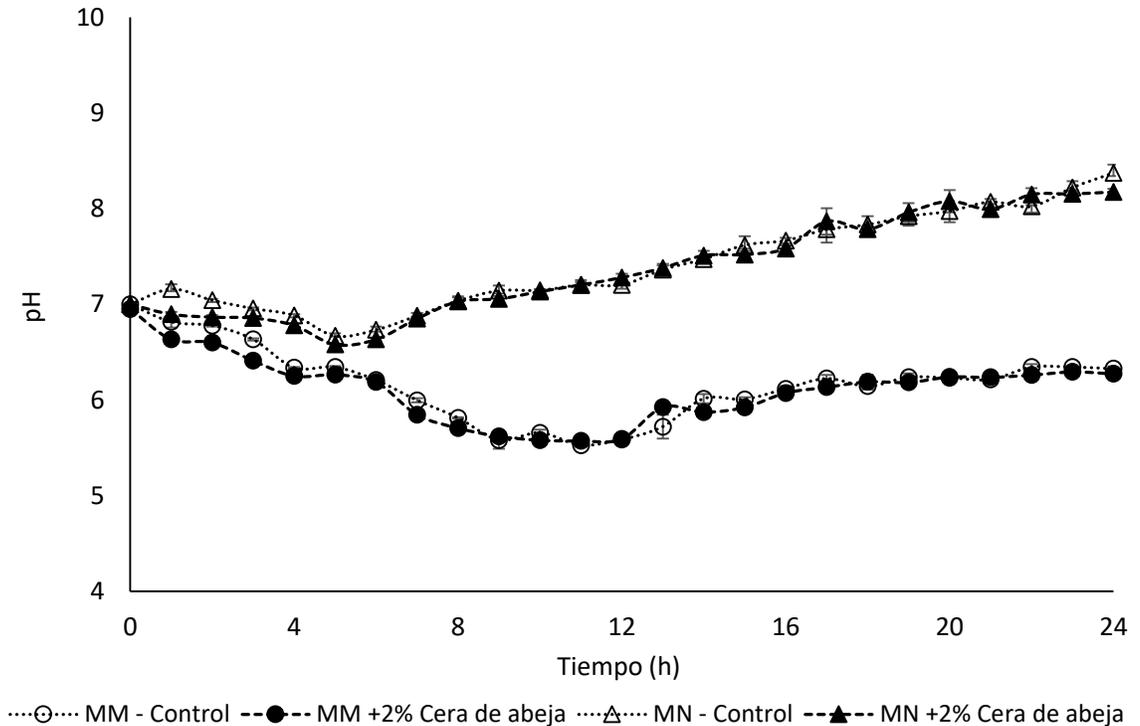


Figura 21. Perfiles de pH de *Bs-1* en cultivos de propagación utilizando MM y MN.

Por otro lado, dadas las características de crecimiento de *Bs-1* bajo cada condición de cultivo, se determinó la velocidad de crecimiento específica (μ), con el propósito de obtener información acerca de su afinidad al medio mineral o nutriente, así como determinar el efecto en esta variable por la adición de la cera de abeja. En la tabla 14 se muestran los resultados obtenidos, mediante los cuales se determinó que independientemente del medio de cultivo empleado, los valores de μ son más altos en los cultivos de germinación, siendo de 0.81 a 0.84 h^{-1} en MM y entre 0.86 y 0.89 h^{-1} en MN. En comparación, al emplear células como inóculo en MM la velocidad de crecimiento específica fue de 0.23 a 0.28 h^{-1} y en MN de 0.30 a 0.36 h^{-1} .

En base a lo anterior, aparentemente para *Bs-1* la afinidad hacia a los medios de cultivo se ve mayormente influenciada por el estado metabólico del inóculo que por la composición del medio. Sin

embargo, es bien sabido que los microorganismos sufren modificaciones estructurales en base a las condiciones de crecimiento que se generan a lo largo de una fermentación. Por lo que la baja velocidad de crecimiento específica observada en los cultivos de propagación, puede tener su origen en la edad de las células procedentes del pre cultivo que se utilizó como inóculo y/o por la maquinaria enzimática contenida.

Tabla 14. Comparación de las velocidades de crecimiento específicas de *Bs-1* en diferentes condiciones de cultivo.

| Medio de cultivo | Velocidad específica de crecimiento μ (h^{-1}) | |
|------------------|--|------------------|
| | G | P |
| MM | 0.84 \pm 0.03 | 0.28 \pm 0.003 |
| MM-cera | 0.81 \pm 0.016 | 0.23 \pm 0.008 |
| MN | 0.89 \pm 0.006 | 0.36 \pm 0.008 |
| MN-cera | 0.86 \pm 0.038 | 0.30 \pm 0.007 |

(**MM**) Medio mineral composición basal, (**MM cera**) Medio mineral +2% de cera de abeja, (**MN**) Medio nutriente composición basal, (**MN cera**) Medio nutriente +2% cera de abeja. (**G**) En cultivos de germinación, (**P**) En cultivos de propagación.

Adicionalmente, la presencia del 2% p/v cera de abeja en MM y MN no afecta significativamente la velocidad de crecimiento, lo cual es importante, ya que la mayoría de las enzimas lipolíticas producidas por *Bacillus* mediante el uso de inductores, son de carácter intracelular o asociadas a membrana, de esta forma una mayor concentración celular supondría una mayor cantidad de enzimas.

8.4.1 Cuantificación de actividad esterasa/lipasa de *Bs-1* por medio del ensayo con *p*-NPA/ *p*-NPP

El *p*-NPA y *p*-NPP son sustratos empleados para determinar la actividad de esterasas y lipasas respectivamente, que mediante una reacción de hidrólisis producen *p*-NP, el cual tiene actividad óptica en el espectro visible entre 400 y 405 nm, siendo posible realizar su cuantificación.

Por lo que se realizó un barrido en un espectrofotómetro de UV/Vis de 200 a 700 nm para observar el punto máximo de absorción del *p*-NP, que se presentó a 403 nm (Figura 43, Anexo 11.5). Entonces se llevó a cabo una curva de calibración utilizando diluciones de 0 a 140 μ M de *p*-NP en NaOH 0.5 M, obteniendo la ecuación de la recta $y = 0.0173x + 0.0188$ con un coeficiente de correlación $R^2 = 0.999$

(Figura 22), mediante la cual se realizaron los cálculos correspondientes para determinar las U/ml en las reacciones. Los ensayos se llevaron a cabo utilizando células completas de acuerdo al método de Choi & Lee (2001) para la actividad esterasa y en base a lo establecido por Dinorín (2008) para la actividad lipasa.

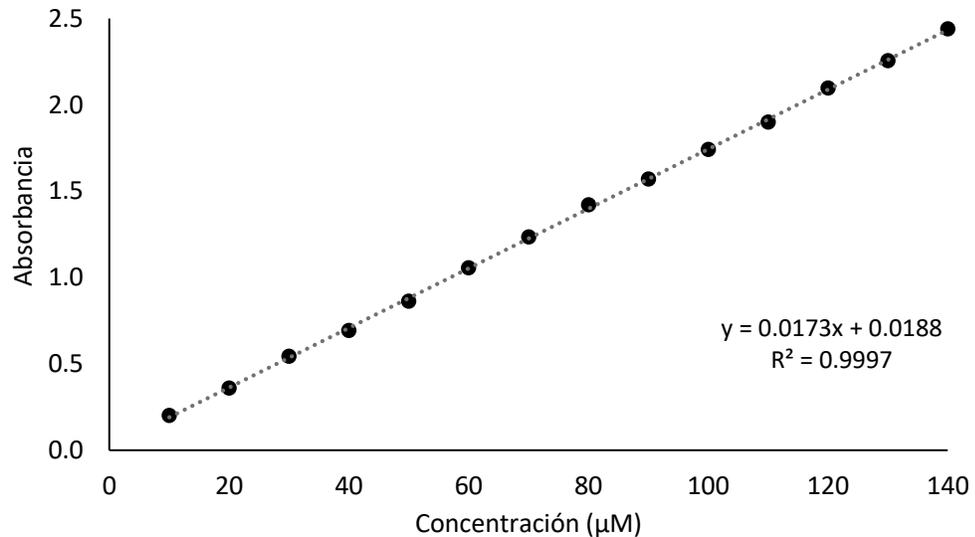


Figura 22. Curva de calibración de *p*-Nitrofenol a 403 nm.

En los cultivos de germinación la actividad enzimática fue evaluada a las 16, 18, 20, 22 y 24 h empleando la composición basal de MM y MN así como con el 2 % de cera de abeja como inductor. La actividad lipolítica se detectó en ambos medios de cultivo, sin embargo la expresión de esterasas y lipasas se vio favorecida bajo diferentes condiciones, lo cual se describe a continuación.

En la figura 23 se muestran los resultados obtenidos, donde fue posible observar que la actividad esterasa en el control de MM (MM-est) se mantiene constante en función del tiempo, con valores entre 0.31 a 0.37 U/ml. En MM con inductor (MM cera-est) se vio el mismo comportamiento, pero con un máximo de 0.47 U/ml a las 24 h.

Por otro lado en MN la actividad esterasa fue mayor a 16 h, tanto en el medio control (MN-est) como en el adicionado con el inductor (MN cera-est) llegando a 0.50 y 0.57 U/ml respectivamente, sin

embargo la expresión de esta enzima o su viabilidad disminuye con respecto al tiempo hasta un 34 %, ya que a las 24 h tan solo se detectó entre 0.17 y 0.19 U/ml.

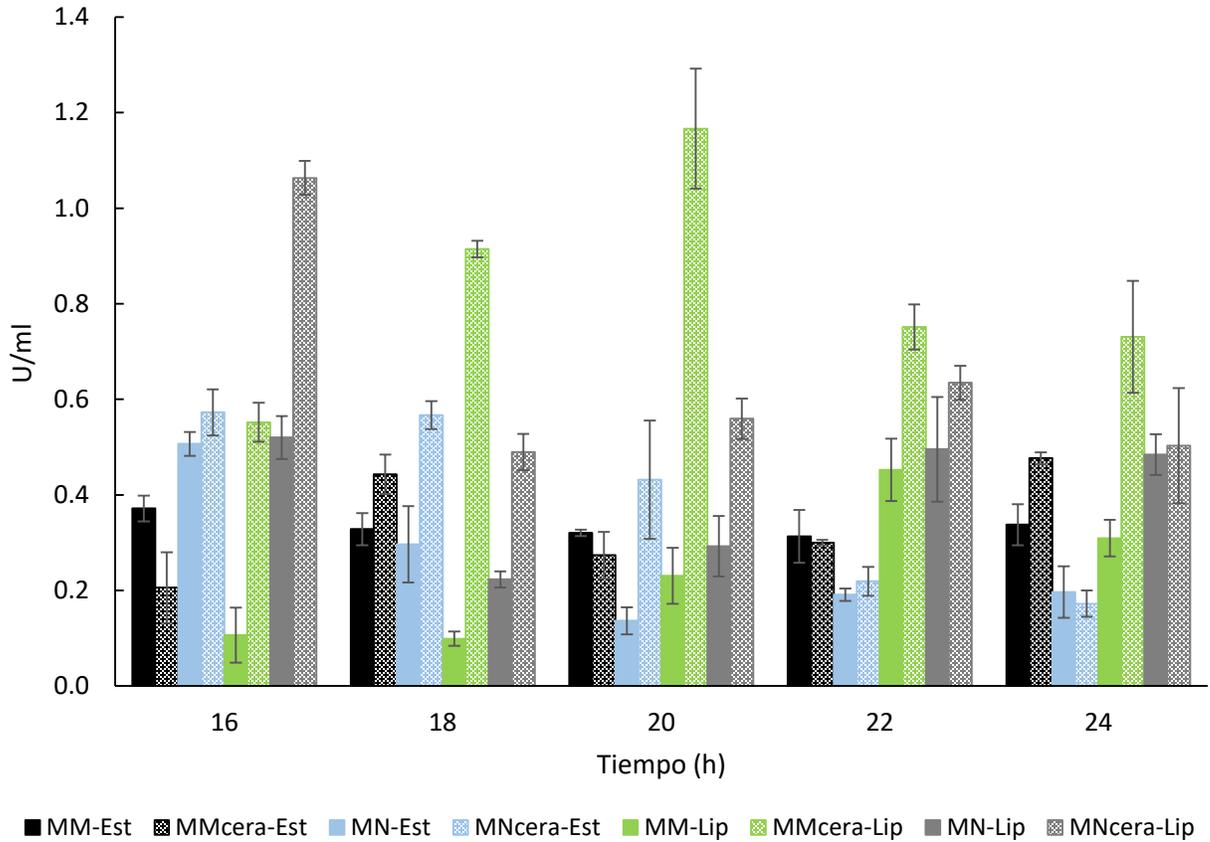


Figura 23 Actividad esterasa/lipasa de células completas de *Bs-1* obtenidas en cultivos de germinación en: **(MM)** Medio mineral, **(MM cera)** Medio mineral +2% de cera de abeja, **(MN)** Medio nutriente, **(MN cera)** Medio nutriente +2% cera de abeja. **(Est)** Actividad esterasa en U/ml, **(Lip)** Actividad lipasa en U/ml.

La actividad lipasa también fue cuantificada, donde en MM claramente se vio un efecto positivo por la acción del inductor, generando un aumento gradual en la actividad enzimática alcanzando hasta 1.16 U/ml a las 20 h (MM cera-Lip), es decir alrededor de 5 veces más con respecto al control, en el cual solo se obtuvo 0.23 U/ml. Al emplear MN valores entre 0.4 y 0.5 U/ml fueron determinados (MN-Lip), mientras que en el medio con cera (MM cera-Lip) ocurrió un incremento del 48.8 % a las 16 h con respecto al control, consiguiendo 1.06 U/ml no obstante, la actividad disminuye alcanzando valores de 0.4 a 0.6 U/ml de las 18 h en adelante.

En base a la información obtenida en este análisis, se puede decir que la producción de lipasas es preferentemente influenciada en los cultivos de germinación, independientemente de utilizar MM o MN, pero cabe resaltar que los niveles de expresión más altos se obtuvieron al emplear el medio de composición mineral. En la germinación de *Bs-1* se observó una fase de latencia de aproximadamente 10 h, por lo que se puede suponer que en este periodo de tiempo la mayor parte de los nutrientes fue consumida, de esta forma la expresión de enzimas para aprovechar fuentes de carbono alternas es necesaria para continuar con la división celular.

Al estar presente la cera de abeja, constituida principalmente por esteres alifáticos, la producción de lipasas es favorecida dada la capacidad de estas enzimas para hidrolizar esteres de cadena larga. Esto explicaría que la actividad esterasa en MM, aun con la incorporación de la cera al medio para inducir una mayor producción no se factible, ya que se obtuvieron los mismos niveles de expresión en el medio control y en el adicionado con el inductor en la mayoría de los casos. Además en MN, la actividad esterasa disminuye tanto en el medio control como en adicionado con cera de abeja a periodos de cultivo superiores a 16 h, lo que podría indicar que la síntesis de estas enzimas no es primordial para la célula, dadas las características del inductor empleado (cuya composición es principalmente de moléculas de carácter alifático), debido a que las esterases solo hidrolizan esteres de cadena corta.

La actividad enzimática en los cultivos de propagación fue evaluada a 12, 15, 18, 21 y 24 h (Figura 24). Fue encontrando que al utilizar MM más el inductor (MM cera-est), la actividad esterasa aumenta alrededor del 50% con respecto al control (MM-est), sin embargo este efecto solo se dio entre la 12 y 15 h obteniendo un máximo de 0.31 y 0.41 U/ml respectivamente, mientras que a mayor tiempo no hay diferencias significativas en la actividad enzimática que se obtiene al utilizar el inductor con respecto al control.

En MN de composición basal (MN-est) se puede observar que el perfil de actividad esterasa es similar a una grafica de distribución normal, con un máximo a 18 h donde se obtuvo 0.49 U/ml, sin embargo por la incorporación de la cera de abeja al medio (MN cera-est), la actividad aumenta significativamente en función del tiempo, llegando alrededor de 1.3 U/ml entre las 22 y 24 h, lo que representa un aumento de 3.1 veces más con respecto al control.

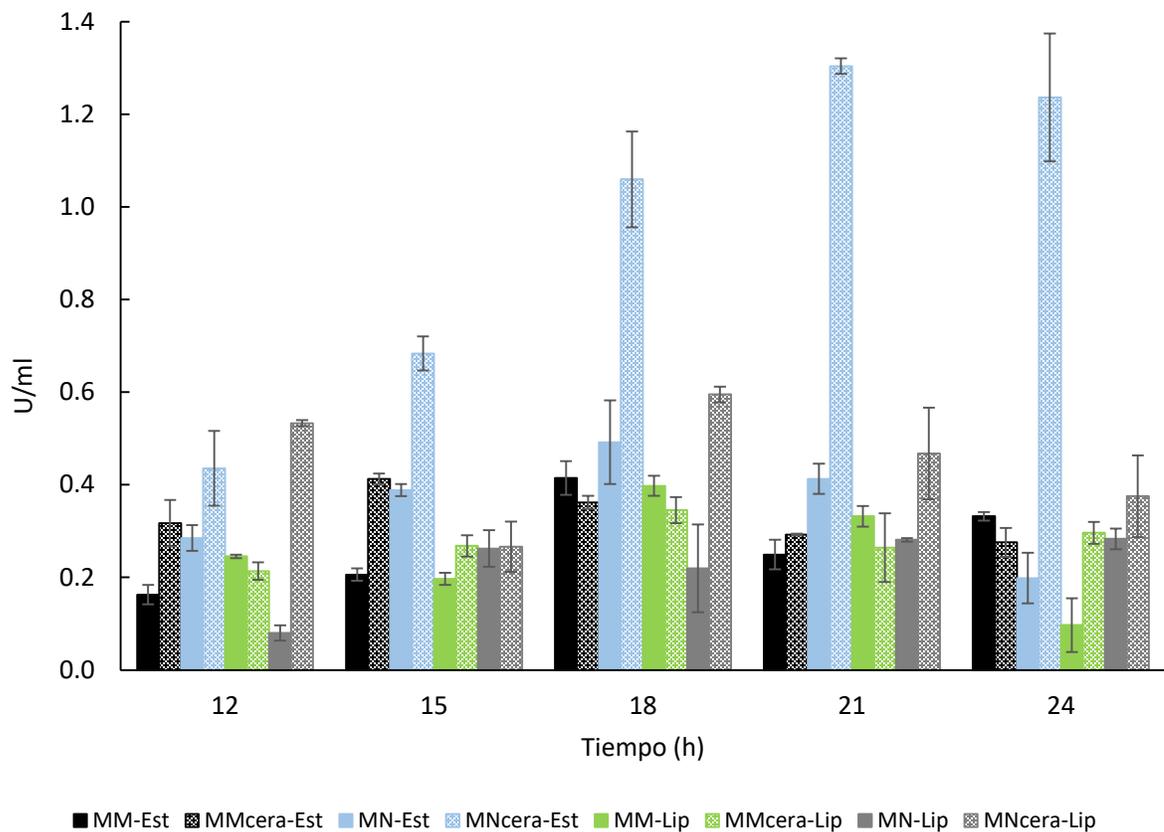


Figura 24. Actividad esterasa/lipasa de células completas de Bs-1 obtenidas en cinéticas de propagación en: **(MM)** Medio mineral, **(MM cera)** Medio mineral +2% de cera de abeja, **(MN)** Medio nutriente, **(MN cera)** Medio nutriente +2% cera de abeja. **(Est)** Actividad esterasa en U/ml, **(Lip)** Actividad lipasa en U/ml.

En cuanto a la actividad lipasa, utilizando MM no hay diferencias significativas entre el control (MM-Lip) y el medio con inductor (MM cera-Lip), obteniendo un máximo de 0.39 y 0.34 U/ml respectivamente a 18 h. Cabe resaltar que es hasta las 24 h donde la expresión de lipasas en el medio de composición basal disminuye a 0.09 U/ml, mientras que en el medio con inductor es de 0.29 U/ml lo cual representa una diferencia del 32.7 %.

Por su parte en MN el efecto de la cera para la inducción de lipasas es positivo, encontrando los mejores resultados a 12 y 18 h donde la actividad enzimática aumentó con respecto al control 6.6 y 2.7 veces respectivamente, es decir en MM control (MN-Lip) se obtuvo entre 0.08 y 0.22 U/ml, mientras que en el medio con inductor (MN cera-Lip) la actividad detectada fue alrededor de 0.59 U/ml.

En los cultivos de propagación, es evidente que la síntesis esterasas y lipasas es mayor utilizando MN con respecto a MM. La razón por la cual este comportamiento se lleva a cabo puede tener origen en la composición del medio, ya que autores como Gupta et al. (2004) y Panda & Gowrishankar (2005), mencionan que el factor más importante para la expresión de enzimas lipolíticas es la presencia de acilglicérols, ácido grasos, ésteres hidrolizables, tweens, sales biliares y glicerol, sin embargo su producción también es fuertemente influenciada por otras fuentes de carbono y nitrógeno como peptonas y extracto de levadura, cuya efectividad para la producción de esterasas y lipasas de *Bacillus sp* y *Pseudomonas* ha sido comprobada.

En relación a esto, el estado metabólico del inóculo también podría ser factor, ya que es bien conocido que la maquinaria enzimática de la célula varía en función de las condiciones ambientales en la que se encuentre. En este sentido Harwood (1989) menciona que en medios complejos constituidos de peptonas y extracto de carne, donde los aminoácidos y péptidos tienen que ser metabolizados, la síntesis de enzimas de clase hidrolasa es necesaria, por lo que es posible que esterasas o lipasas se encuentren de forma constitutiva, lo cual explicaría una mayor actividad enzimática en los cultivos con MN con respecto a MM.

8.4.2 Análisis por FT-IR de la cera de abeja empleada como inductor en MM y MN

Fue comprobado que la cera de abeja induce la actividad lipolítica, entonces con la finalidad de conocer si hay cambios en su estructura debido a interacción con microorganismos, se llevó a cabo el análisis por espectroscopia de infrarrojo. Para ello la cera fue recuperada del caldo de cultivo por filtración y se lavó con agua destilada de 3 a 5 veces. Después fue llevada a peso constante a 50 °C en un horno de secado. El análisis se enfatizó en las bandas características de ésteres a 1170 y 1735 cm^{-1} , que corresponden a las frecuencias vibración de flexión C–O–C y tensión de C=O respectivamente.

En la figura 25 se muestran los espectros de FT-IR de la cera recuperada en los cultivos de germinación y propagación, donde se puede observar que no hay cambios de intensidad o corrimientos en las bandas a 1170 y 1735 cm^{-1} , lo cual indica que no hay modificaciones significativas en la estructura de los acilglicéridos presentes. Sin embargo en un acercamiento entre 1500 y 1600 cm^{-1} , es posible notar la formación de dos bandas a 1539 y 1574 cm^{-1} en las muestras de cera obtenidas de los caldos de cultivo, las cuales no fueron observadas en la muestra control. Estas bandas corresponden a vibraciones de tensión del carbonilo de ácidos grasos, lo que podría significar que cierto grado de hidrólisis se lleva a cabo, pero siendo escaso para detectar la formación de otras bandas de interés, principalmente entre

1000 y 1100 cm^{-1} de enlaces δ C–O y arriba de 3000 cm^{-1} de ν O–H, que brinden evidencia de la formación de un alcohol. Además cabe la posibilidad de que las bandas a 1539 y 1574 cm^{-1} correspondan al carbonilo de una cetona o al anión R–COO⁻ producido por la ruptura heterolítica de un R–COOH, ya que los ácidos carboxílicos pueden reaccionar con metales para formar sales, lo que podría explicar por qué en MM la formación de dichas bandas es más evidente en comparación con la respuesta observada en las muestras de MN, dado que MM contiene Na, Mg, Fe y Ca.

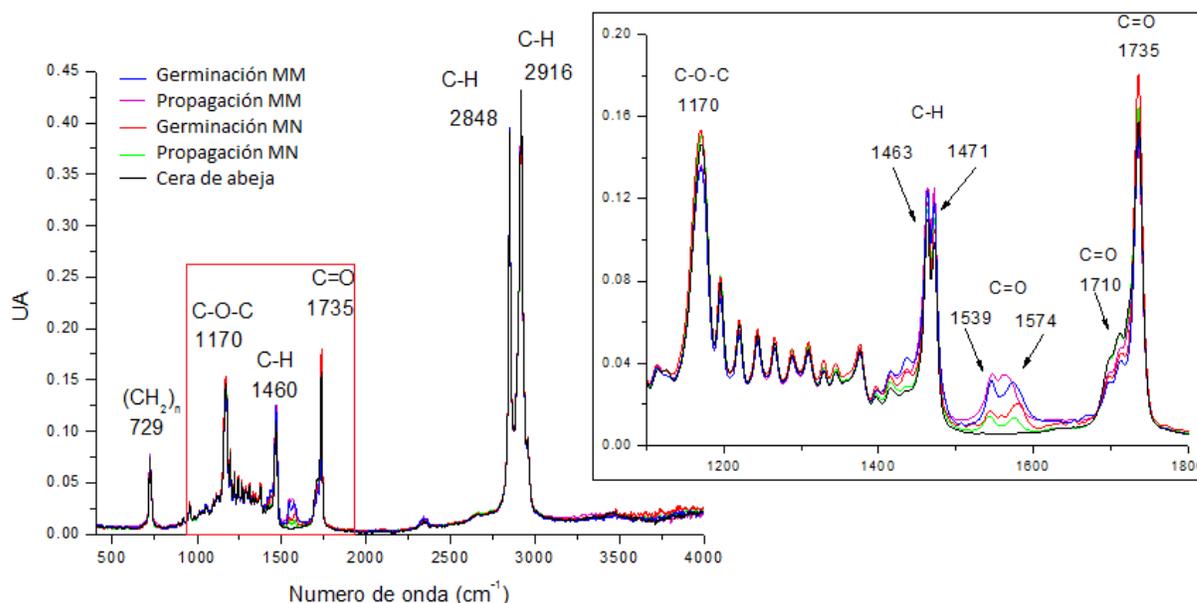


Figura 25. Espectros de FT-IR de cera de abeja empleada como inductor de actividad lipolítica en cultivos de germinación y propagación de *Bs-1* utilizando MM y MN.

Por otro lado la aparición de las bandas entre 1530 y 1580 cm^{-1} en el espectro de FT-IR, es uno de los cambios característicos que experimenta la cera de abeja por la saponificación, lo cual fue observado en las cinéticas de la reacción de hidrólisis que se llevaron a cabo en análisis anteriores y cuyos resultados se discutieron en el apartado 8.2.

Por lo anteriormente descrito, se puede decir que la cera de abeja induce en determinados casos una mayor producción de enzimas lipolíticas de *Bs-1*, sin embargo al emplear la composición de MM y MN para el crecimiento celular, no se promueven modificaciones estructurales significativas en la cera que indiquen la hidrólisis total de los acilgliceroles presentes, por lo que se puede suponer que su uso como fuente de carbono alterna es mínimo o nulo. En este sentido una limitación en los nutrientes podría

obligar a las células emplear la cera para satisfacer sus necesidades nutricionales, lo que supondría una mayor producción de enzimas que sean capaces de hidrolizar los constituyentes de la misma.

8.5 Caracterización del crecimiento de *Bs-1*, *Bs-2* y *Bs-3* en medio mineral modificado (MM-1)

Algunos autores como Gupta et al. (2004) y Panda & Gowrishankar (2005), mencionan que diferentes efectos en la expresión de esterasas y lipasas pueden ser observados a partir de pocas horas a varios días de incubación, esto en relación al microorganismo utilizado, fuente de carbono y nitrógeno, entre otros factores. Además, Sharma et al. (2001), Takac & Marul (2008) y Asoodeh & Ghanbari (2013), han reportado que por la presencia de cationes como K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} , se puede estimular la actividad esterasa/ lipasa en cepas de *Bacillus subtilis*.

Por lo anteriormente expuesto, y con el propósito de encontrar las mejores condiciones para producción de enzimas lipolíticas, que tengan la capacidad para hidrolizar los ésteres de la cera de abeja, se modificó la composición de MM. Para ello se sustituyó la glucosa por cera de abeja a 10 g/l y se conservó el resto de los componentes sin modificación. Esta configuración del medio de cultivo se nombró MM-1.

MM-1 se utilizó para realizar cultivos de germinación a 24 h y de propagación a 24,48 y 72 h, donde se evaluó el efecto en el crecimiento y actividad enzimática de las cepas *Bs-1*, *Bs-2* y *Bs-3*, en relación al tipo de inóculo (esporas o células) y periodo de incubación.

De acuerdo a los perfiles de crecimiento en los cultivos de germinación (Figura 26), las cepas *Bs-1* y *Bs-2* poseen características similares. En ambos casos, a un tiempo de 5 h fue posible detectar las primeras células y la fase latencia tuvo una duración aproximada de 8 h. El mayor crecimiento celular se dio entre las 9 y 16 h para *Bs-1* con una concentración máxima de biomasa de 4.75×10^8 células/ml. Sin embargo en *Bs-2* el crecimiento fue más pronunciado entre las 9 y 20 h, obteniendo alrededor de 6.01×10^8 células/ml.

Por otro lado *Bs-3* a pesar de germinar en tan solo 2 h, solo presenta una velocidad de crecimiento constante hasta las 10 h de cultivo, seguido de una fase estacionaria que se prolongó hasta el término del experimento, en la cual la máxima concentración de biomasa alcanzada fue de 2.62×10^8 células/ml.

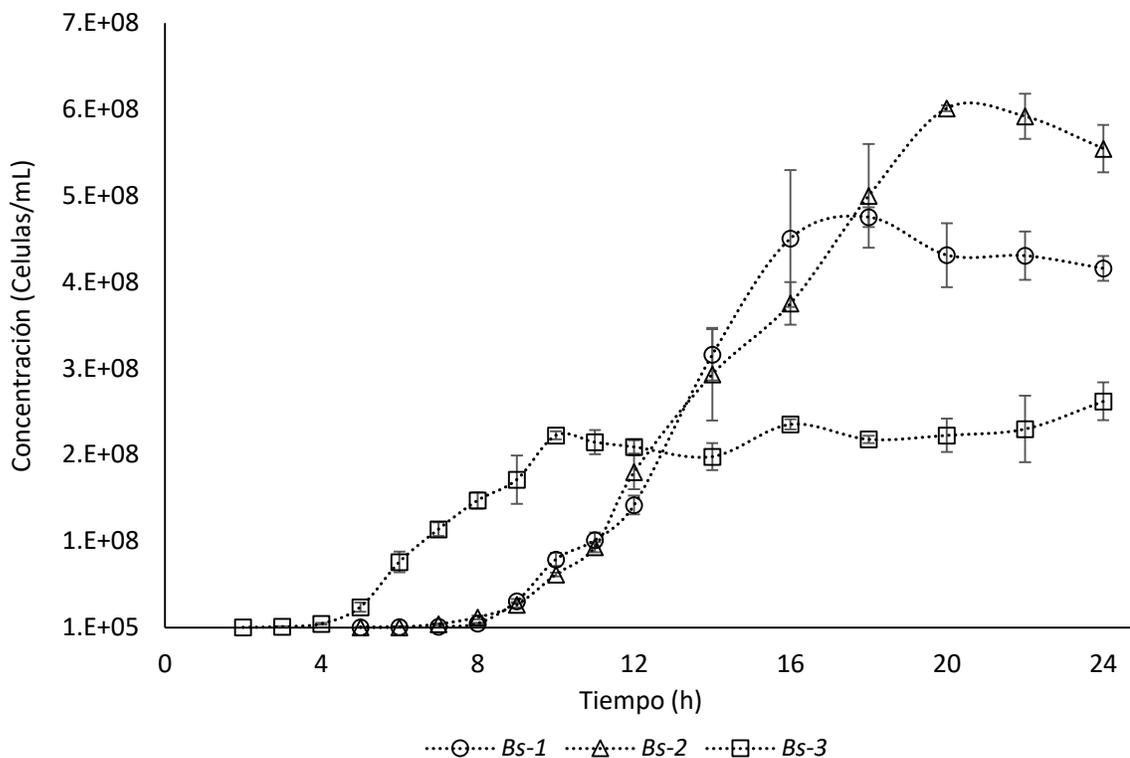


Figura 26. Perfiles de crecimiento celular de *Bs-1*, *Bs-2* y *Bs-3* en cultivos de germinación con MM-1.

Entre las cepas evaluadas es clara la diferencia en su metabolismo, ya que la fase de latencia en *Bs-3* fue solo de 4 h, indicando que este microorganismo posee una maquinaria enzimática que le permite una adaptación dos veces más rápida al medio en relación a *Bs-1* y *Bs-2*. Por lo contrario la concentración celular de *Bs-3* es hasta 3 veces menor, debido a que esta cepa entra a una fase estacionaria con tan solo 10 h de incubación.

Utilizando MM-1 en los cultivos de *Bs-1*, *Bs-2* y *Bs-3*, se favorece la producción de metabolitos de carácter básico que cambian el pH del medio entre 8.1 y 8.4 después de 24 h. Esto se debe a la producción de NH_3 como resultado de la degradación del extracto de levadura, que es utilizado como fuente de nitrógeno y probablemente de carbono, ya que antes de degradar una fuente compleja como la cera de abeja, la célula va a metabolizar preferentemente los nutrientes que impliquen un menor gasto energético. De acuerdo a la información obtenida en este análisis, se determinó el tiempo de incubación de los pre-cultivos empleados para la inoculación de los medios para propagación. Siendo para *Bs-1* y *Bs-2* de 12 h y *Bs-3* de 6 h.

En los cultivos de propagación, el perfil de crecimiento para cada cepa fue evaluado por 72 h. Sin embargo al llevar a cabo las cinéticas de crecimiento se observó que las células de *Bs-1* y *Bs-2* comenzaban a esporular a partir de las 12 h de incubación, siendo a 24 h la presencia de células fue prácticamente nula (Figura 27).

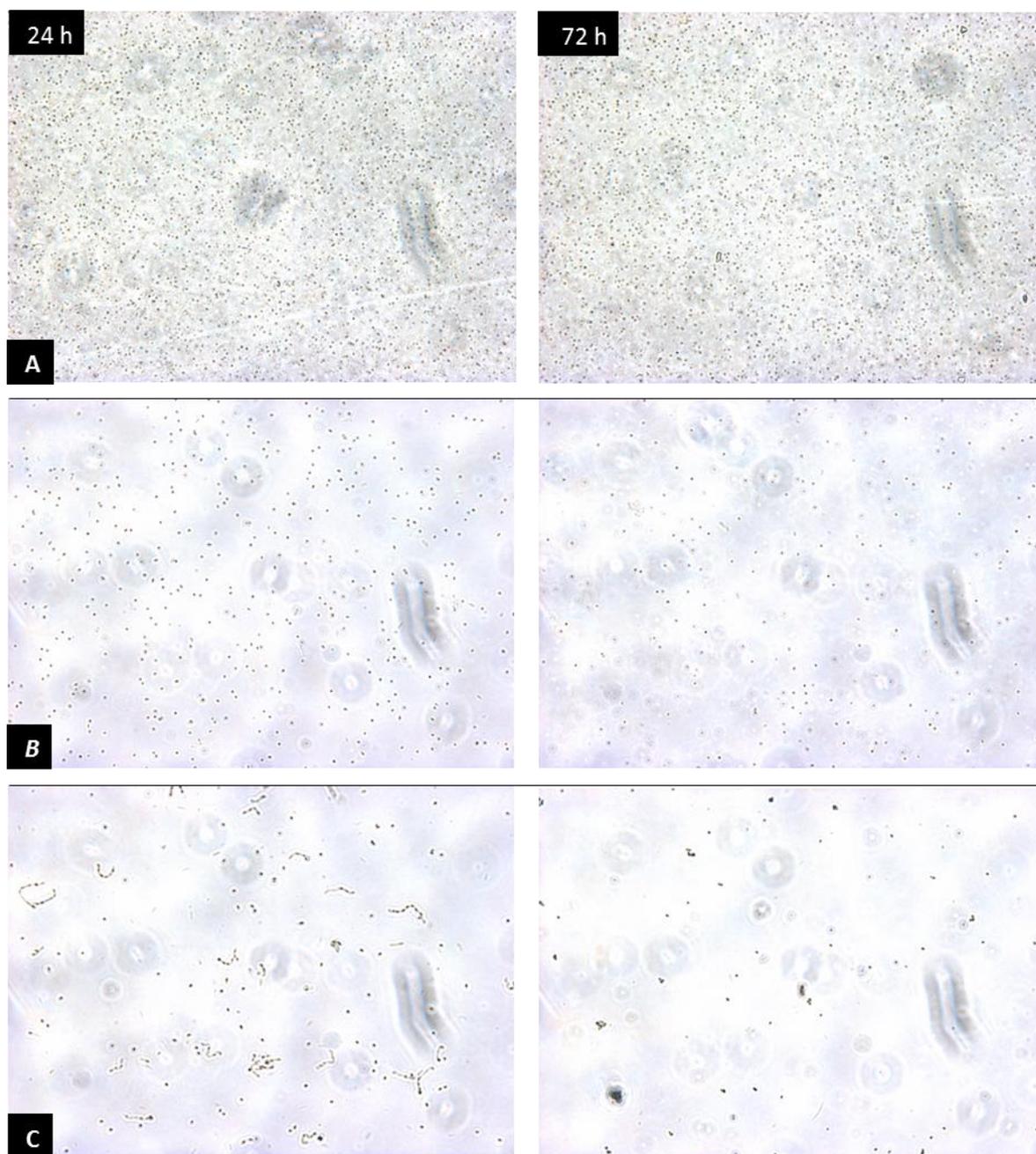


Figura 27. Morfología celular de las cepas (A) *Bs-1*, (B) *Bs-2* y (C) *Bs-3* entre 24 y 72 h de cultivo en MM-1.

No obstante en la cepa *Bs-3* este comportamiento fue visto a partir de las 24 h, tiempo en el cual algunas células aun fueron encontradas. A pesar de ello, y con la finalidad de comprobar si se daba algún cambio en la morfología celular a partir de la formación de esporas, se continuaron monitoreando los cultivos de propagación de cada microorganismo hasta 72 h, sin embargo no se observaron diferencias en este periodo de tiempo. Siendo la concentración de esporas obtenida para cada cepa al término de las respectivas fermentaciones de 5.74×10^8 , 5.79×10^8 y 1.25×10^8 esporas /ml para *Bs-1*, *Bs-2* y *Bs-3* respectivamente.

Por otro lado, en cuanto a las características de crecimiento celular durante las primeras 12 h en los cultivos de propagación (Figura 28), se pudo observar que independientemente de la cepa, la mayor velocidad de crecimiento tuvo lugar en el intervalo de 0 a 8 h. En *Bs-1* y *Bs-3*, el crecimiento sucedió inmediatamente después de la inoculación, alcanzando concentraciones de biomasa alrededor de 4.22×10^8 y 2.7×10^8 celas/ml respectivamente. Mientras que en *Bs-2* presento una fase de latencia de aproximadamente 3 h, posteriormente se vio un mayor crecimiento obteniendo hasta 2.88×10^8 células/ml. Cabe señalar que en los cultivos de los tres microorganismos después de 8 h, se presentó un descenso gradual en la concentración celular, hasta observar la aparición de esporas se mencionó anteriormente.

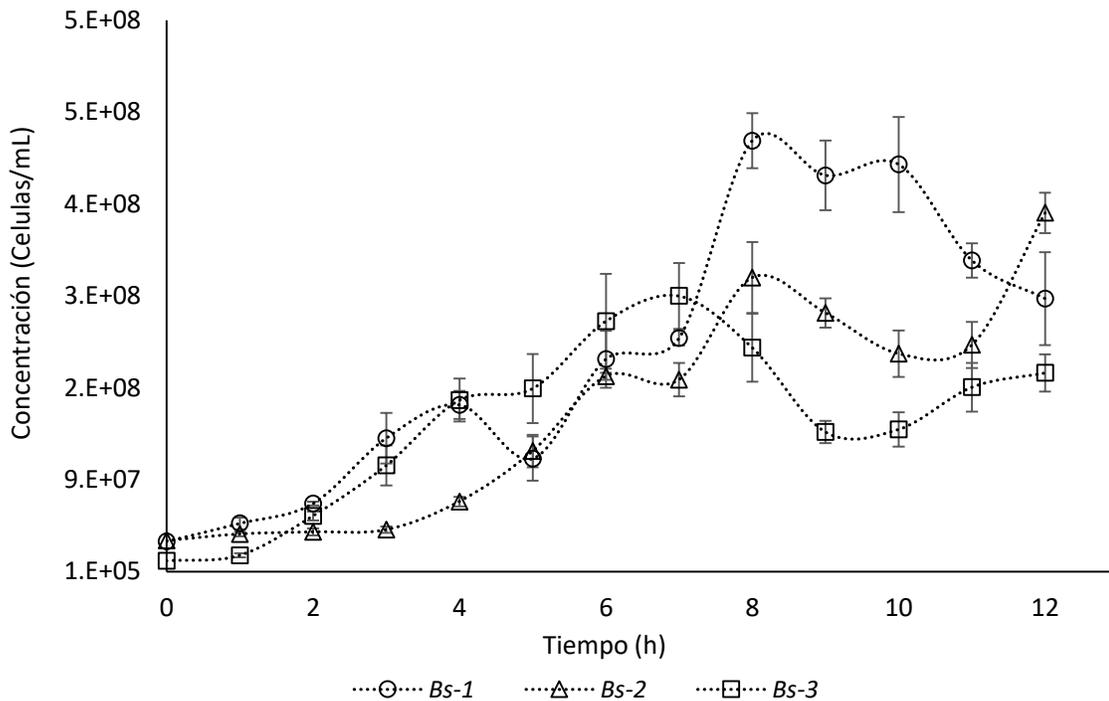


Figura 28. Perfiles de crecimiento celular de *Bs-1*, *Bs-2* y *Bs-3* en cultivos de propagación con MM-1.

El pH en los cultivos de propagación fue monitoreado durante 72 h. En la figura 29 se muestran los perfiles obtenidos para cada cepa. Se encontró que independientemente del microorganismo utilizado, en MM-1 todos genera metabolitos que alcalinizan el medio, lo cual sucede a una mayor velocidad entre las 0 y 12 h, donde el cambio de pH va de 7.0 a 8.22 y coincide con el estado metabólico donde la duplicación celular es mayor.

Cabe señalar que después de las 24 a 72 h, donde prácticamente solo se encontró presencia de esporas en los cultivos de las tres cepas, aun se detectaron cambios de pH, en *Bs-1* de 8.74 a 9.12, *Bs-2* de 8.36 a 9.26 y *Bs-3* de 7.97 a 9.08.

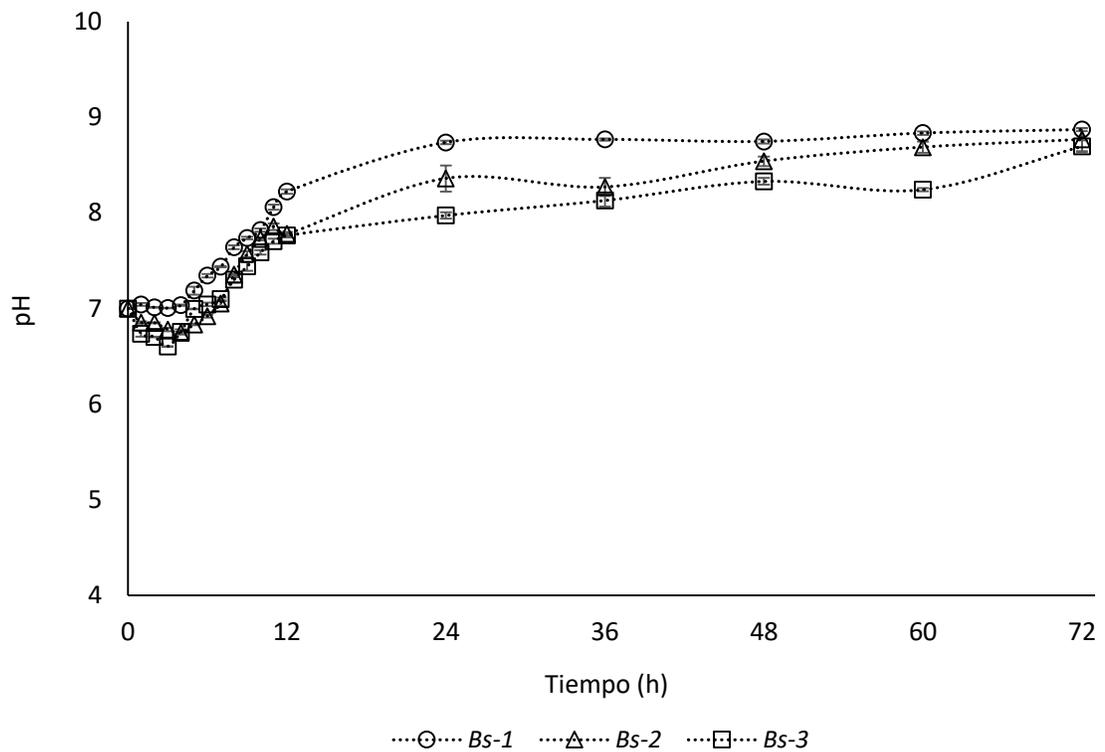


Figura 29. Perfiles de pH de *Bs-1*, *Bs-2* y *Bs-3* en cultivos de propagación empleando MM-1.

De acuerdo a los perfiles de crecimiento obtenidos de cada microorganismo y condición de cultivo, se calcularon las velocidades de crecimiento específico (μ), cuyos resultados se muestran en la tabla 15. Se encontró que el tipo de inoculo utilizado puede determinar la afinidad al medio de cultivo, ya que al

usar esporas se obtuvieron valores de μ entre 0.99 y 1.52 h⁻¹, mientras que al emplear células, la velocidad de crecimiento disminuyó de 3.36 y 4.66 veces indistintamente de la cepa utilizada.

Tabla 15. Comparación de las velocidades de crecimiento específicas de *Bs-1*, *Bs-2* y *Bs-3* con MM-1.

| Cepa | Velocidad específica de crecimiento μ (h ⁻¹) | |
|-------------|--|---------------|
| | G | P |
| <i>Bs-1</i> | 1.06 ± 0.039 | 0.296 ± 0.005 |
| <i>Bs-2</i> | 0.992 ± 0.034 | 0.295 ± 0.027 |
| <i>Bs-3</i> | 1.52 ± 0.033 | 0.326 ± 0.030 |

G) En cultivos de germinación, **(P)** En cultivos de propagación.

La cepa *Bs-3* tuvo la mayor afinidad al medio MM-1 ($\mu=1.52$ h⁻¹), que concuerda con su capacidad para germinar en tan solo 2 h. Sin embargo *Bs-1* y *Bs-2* también presentan una afinidad relativamente alta.

La baja velocidad de crecimiento específica en los cultivos de propagación, puede tener su origen en la tendencia que presentaron las tres cepas de formar esporas en periodos cortos de incubación. De acuerdo a Errington (1993), la esporulación se lleva a cabo principalmente por tres factores: señalización nutricional, densidad de población y ciclo celular.

Se puede descartar que la formación de esporas a 12 h en los cultivos de propagación se deba al ciclo celular, ya que los inóculos fueron obtenidos de un pre-cultivo a partir de esporas, tomando la muestra al término de la fase de latencia y próxima al tiempo de incubación donde la velocidad de duplicación celular es alta, lo que significa que la presencia de células vegetativas e incluso esporas que pudieran estar presentes en el inóculo e interferir en el crecimiento celular, es nula o mínima. Sin embargo los mecanismos de señalización que se activan por la baja concentración de nutrientes aunado a la densidad celular pueden ser considerados. Esto en relación a la composición de MM-1, donde la glucosa fue sustituida por cera de abeja, quedando el extracto de levadura como fuente de carbono y nitrógeno. Entonces aun si las cepas bajo estudio pudieran producir enzimas para hidrolizar la cera de abeja a monómeros y emplearla como fuente de carbono, esto traería consigo la necesidad del consumo de nitrógeno, tanto para el crecimiento celular como para la producción de enzimas. Tomando en cuenta que en MM-1 el extracto de levadura tiene una concentración de 5 g/l, esto podría

no ser suficiente para la síntesis enzimática y crecimiento celular, activando señales que induzcan la esporulación por falta de nutrientes.

8.5.1 Cuantificación de actividad esterasa/lipasa de *Bs-1*, *Bs-2* y *Bs-3* por medio del ensayo con *p*-NPA/*p*-NPP

Se determinó la actividad enzimática utilizando paquetes celulares obtenidos de los cultivos de germinación en MM-1 a 8, 12, 16, 18, 20, 22 y 24 h. En la figura 30 se muestra el perfil de actividad lipasa/esterasa. Con base en los resultados se determinó que en las tres cepas bajo estudio, la expresión de esterases durante la germinación a tiempos inferiores de 16 h es nula o poco significativa, mientras que entre 16 y 24 h la máxima actividad fue de 0.31 U/ml (a 22 h) en *Bs-1*, 0.1 U/ml (a 20 h) en *Bs-2* y de 0.28 U/ml en *Bs-3* (a 16 h).

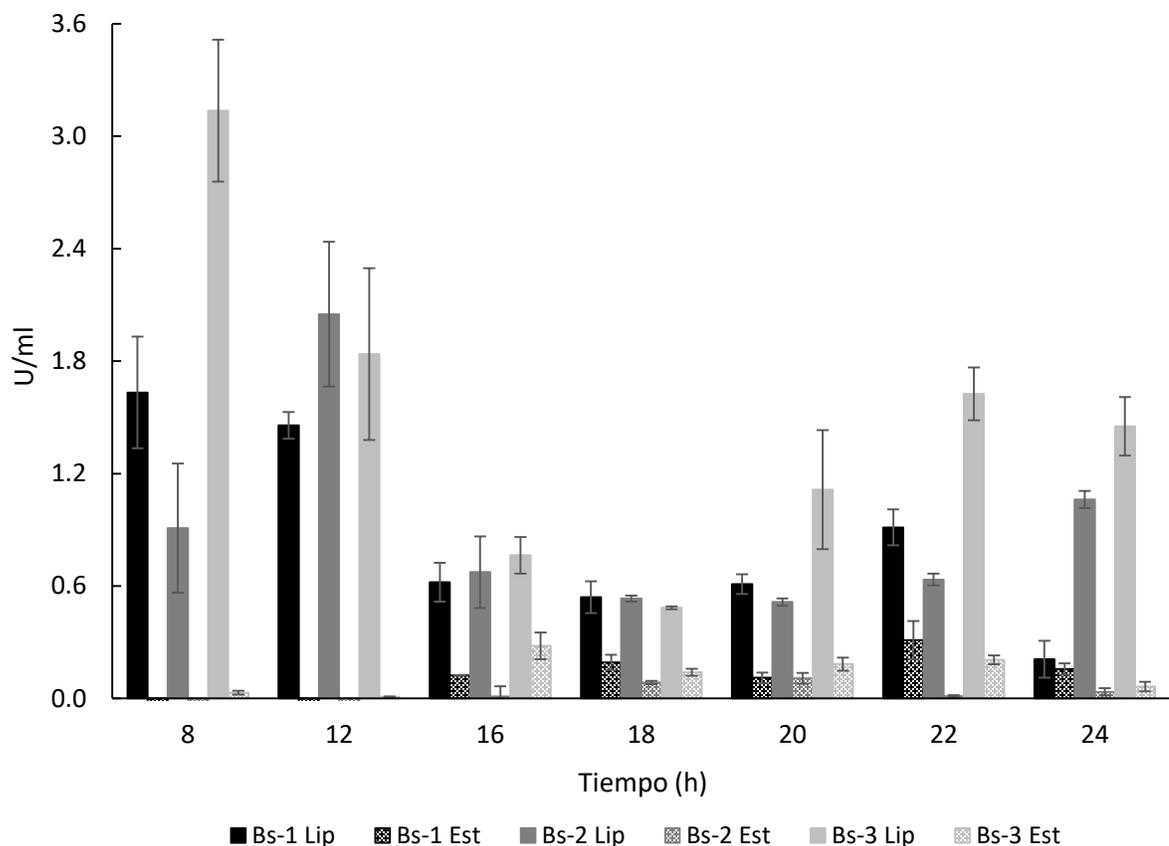


Figura 30. Actividad esterasa/lipasa de células completas de *Bs-1*, *Bs-2* y *Bs-3* obtenidas en cultivos de germinación en MM-1. **(Est)** Actividad esterasa en U/ml, **(Lip)** Actividad lipasa en U/ml.

Por el contrario, al determinar la actividad lipasa, se encontró que esta es mayor entre la 8 y 12 h para las tres cepas. En *Bs-1* se obtuvo un máximo de 1.63 U/ml, posteriormente entre las 16 y 22 h la actividad disminuye del 40 al 60%, obteniendo de 0.54 a 0.91 U/ml. La actividad lipasa máxima en *Bs-2* fue de 2.05 U/ml, la cual disminuye gradualmente hasta en un 75% de las 16 a 22 h, donde se obtuvo entre 0.51 y 0.67 U/ml. En lo que respecta a *Bs-3*, la actividad máxima fue de 3.13 U/ml, esta disminuye paulatinamente hasta un mínimo de 0.48 U/ml, lo que se traduce en una pérdida del 84.6%, sin embargo entre las 20 y 24 h, hay un aumento en la actividad enzimática con valores alrededor de 1.62 U/ml.

En resumen, indistintamente de la cepa utilizada en los cultivos de germinación con MM-1, únicamente la producción de lipasas es llevada a cabo. A la fecha no hay antecedentes sobre el uso de cera de abeja como fuente de carbono e inductor no convencional empleada en cultivo líquido para la producción de enzimas lipolíticas de *B. subtilis*. Sin embargo se han realizado estudios sobre el uso de aceites vegetales o ácidos grasos y su efecto en la expresión de dichas enzimas.

Por ejemplo, Takac & Marul (2008), evaluaron el efecto de diferentes fuentes de carbono de carácter lipídico en la actividad lipolítica extracelular de un aislado de *B. subtilis*. Emplearon un medio nutriente que fue adicionado con diferentes ácidos grasos entre ellos palmítico, esteárico, oleico y linoléico, así como aceites de sésamo, girasol, oliva, maíz y soya. Los autores reportaron los mejores resultados utilizando aceite linoléico al 1% v/v (0.032 U/ml) y con aceite de sésamo bajo la misma proporción (0.155 U/ml).

En relación a lo anterior, la cera de abeja posee ácidos grasos de diferentes longitud de cadena, entre los que destaca el ácido palmítico y sus esteres, lo cual se relaciona directamente al hecho que mediante el uso de la cera en MM-1, se favorezca la actividad lipasa, ya que Takac & Marul (2008), mencionan que altos porcentajes de ácidos grasos de cadena larga favorecen la actividad lipasa, que la presencia de glucosa en el medio de cultivo reprime la expresión de la actividad lipolítica, y que a tiempos prolongados de cultivo la actividad lipasa puede disminuir, posiblemente por la acción de proteasas.

Por otro lado, la inducción enzimas lipolíticas con diferentes cepas de *Bacillus subtilis* se ha estudiado ampliamente. Kumar et al. (2012) evaluaron un aislado de *Bacillus sp* DVL2 para la producción de esterases/ lipasas, por lo que emplearon sustancias de carácter lipídico como tween 80, tributirina y

aceite de oliva en medios de cultivo con extracto de carne, extracto de levadura, peptona, sacarosa y glucosa en diferentes combinaciones. Los autores reportan que el aislado de *Bacillus sp* DVL2 produjo tres esterases distintas, extracelular con un actividad de 9.2 U/L, intracelular con 5200 U/L y ligada a membrana con 60 U/mg, así una lipasa extracelular con 331U/ L e intracelular con 112 U/L a 24 h de incubación. Cabe señalar que el principal objetivo de este estudio radia en la búsqueda de una enzima específica para hidrolizar los ésteres que constituyen a la cera de abeja, dejando como segunda prioridad una alta producción, sin embargo al comparar con los resultados obtenidos con lo reportado por Kumar et al. (2012), encontramos que los valores de actividad enzimática determinados en este trabajo son comparables a los reportados en literatura (realizando la conversión de U/L a U/ml).

Higerd &Spizzen (1973), determinaron la presencia de dos esterases *Bacillus subtilis*, denominadas arbitrariamente como esterasa A y esterasa B, en células vegetativas y esporulantes. Por esa razón, y a pesar de tener conocimiento que en los cultivos de propagación con MM-1, las tres cepas de *Bacillus* formaron esporas a partir de 12 h, la determinación de la actividad esterasa y lipasa a 24, 48 y 72 h fue llevada a cabo (Figura 31).

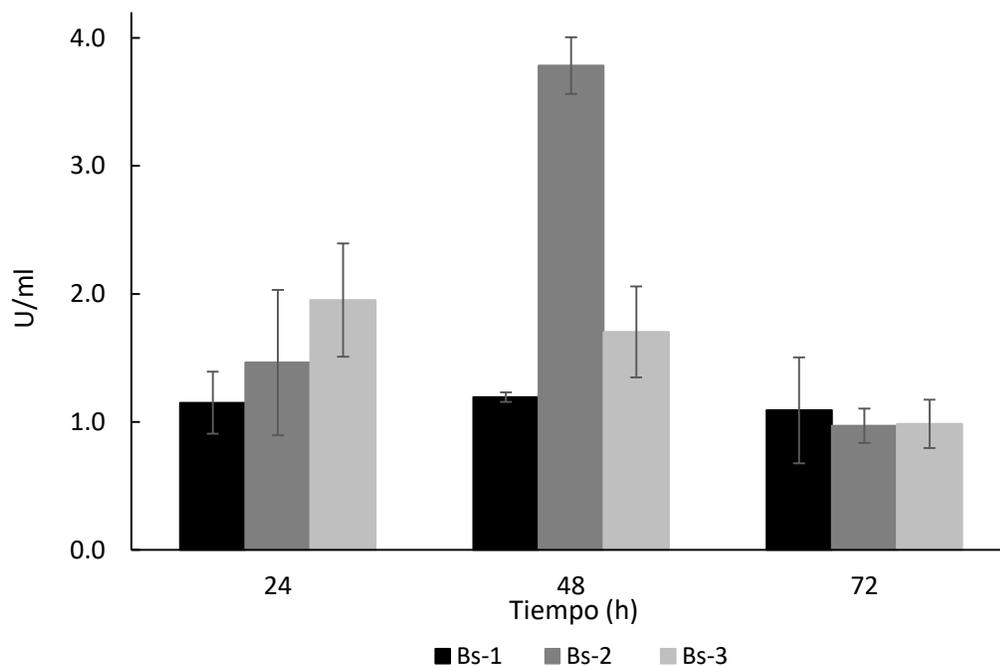


Figura 31. Actividad lipasa en U/ml de células completas de *Bs-1*, *Bs-2* y *Bs-3* obtenidas en cultivos de propagación en MM-1.

La actividad esterasa no fue detectada, sin embargo se obtuvieron valores de actividad lipasa relativamente altos, en comparación a los determinados en los cultivos de germinación utilizando el mismo medio de cultivo. Se encontró que independientemente del periodo de incubación y microorganismo empleado, la actividad lipasa fue superior a 1 U/ml. La cepa *Bs-1* presento un valor constante en función del tiempo a alrededor de 1.1 U/ml. *Bs-2* tuvo una máxima actividad a 48 h de 3.78 U/ml. Mientras que en *Bs-3* a 24 h de determino una actividad lipasa de 1.95 U/ml, la cual disminuyo gradualmente en función del tiempo hasta 72 h, con un mínimo de 0.98 U/ml. En relación a esto y correlacionando con los perfiles de pH que se caracterizaron en los cultivos de propagación, se puede suponer que la lipasa expresada por *Bs-1*, *Bs-2* y *Bs-3*, es estable en medios alcalinos de pH cercano a 9. No obstante, la realización de estudios más detallados para analizar este comportamiento es necesaria.

8.5.2 Análisis por FT-IR de la cera de abeja empleada como inductor en MM-1

Al realizar los ensayos de actividad enzimática en los cultivos de propagación con MM-1, de determino la presencia de una lipasa activa entre el periodo de incubación de 24 a 72 h. Entonces, con el objetivo de conocer si se producen efectos en la estructura de la cera de abeja por su interacción con una lipasa en medio alcalino, se llevó a cabo el análisis por espectroscopia de infrarrojo. Para ello la cera de los cultivos a 72 h fue recuperada por filtración, lavada con agua destilada de 3 a 5 veces y llevada a sequedad hasta peso constante.

En la figura 32 se muestran los espectros de FT-IR de la cera obtenida de los cultivos con *Bs-1*, *Bs-2* y *Bs-3* a 72 h, así como de la cera de abeja control. Aparentemente las bandas características de ésteres a 1170 y 1735 cm^{-1} que corresponden a las frecuencias vibración de flexión C–O–C y tención de C=O respectivamente, no presentaron cambios. Sin embargo al analizar detenidamente el intervalo de longitud de onda entre 1000 y 1800 cm^{-1} , se encontró lo siguiente:

En la muestra de cera del cultivo con *Bs-1*, la banda a 1735 cm^{-1} del carbonilo de ésteres permaneció sin cambios, no obstante el hombro a 1710 cm^{-1} , que también corresponde a vibraciones de ν C=O pero de aldehídos o cetonas desaparece. Además fueron encontradas tres bandas en el intervalo de 1540 a 1630 cm^{-1} , cuya formación es muy característica de cuando se realiza la saponificación de la cera de abeja. Lo cual fue previamente caracterizado en las cinéticas donde se evaluaron los cambios en la cera de abeja como producto de la hidrólisis alcalina.

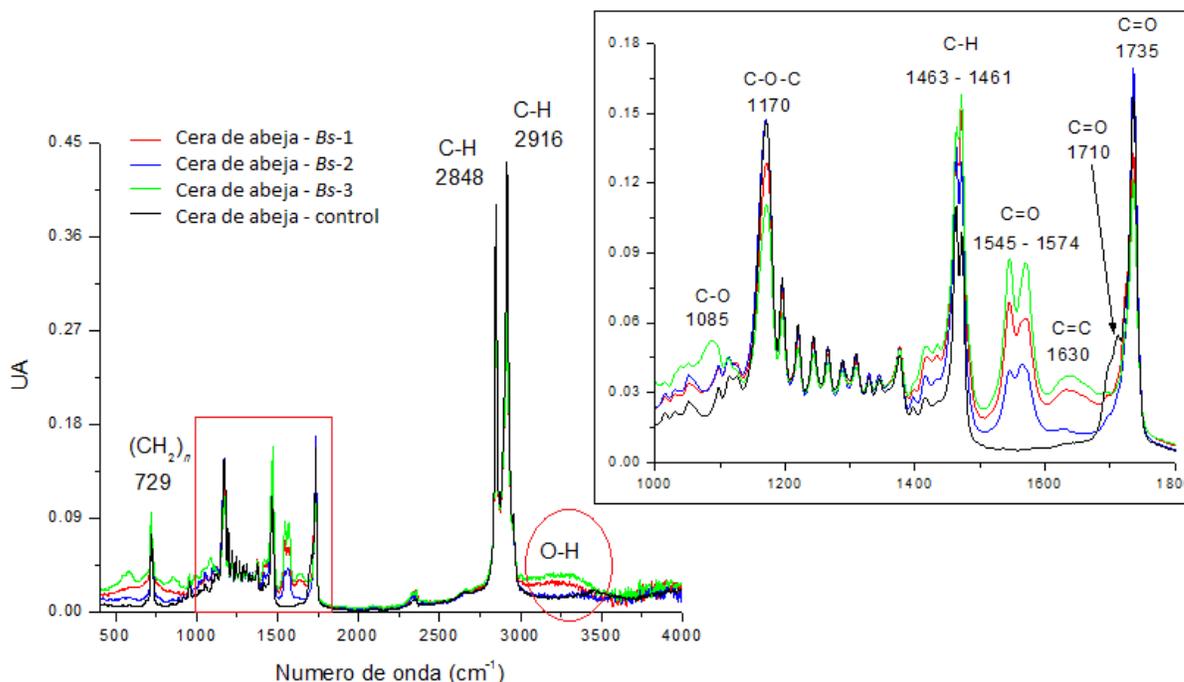


Figura 32. Espectros FT-IR de cera de abeja empleada como fuente de carbono alternativa e inductor de actividad lipolítica en cultivos de propagación de *Bs-1*, *Bs-2* y *Bs-3* en MM-1 a 72 h.

En este sentido, las bandas a 1545 y 1574 cm^{-1} corresponden a vibraciones de tensión de C=O, posiblemente de un ácido o cetona. Anteriormente se propuso que este carbonilo podría corresponder al anión R-COO^- , producido por la ruptura heterolítica de un ácido carboxílico por la reacción con metales para la formación de sales. Sin embargo fueron detectadas entre 3000 y 3500 cm^{-1} vibraciones de tensión O-H. Por lo anterior, cabe la posibilidad de que se lleve a cabo cierto grado de hidrolisis en los ésteres de la cera de abeja y/o la reducción de aldehídos a alcoholes (por la desaparición del hombro a 1710 cm^{-1}). Además la formación de una banda ancha a 1630 cm^{-1} de ν C=C también fue detectada, que en conjunto a las propias de los carbonilos (1545, 1574, 1735 cm^{-1}), sugieren la presencia de sistemas conjugados de un carbonilo α , β -insaturado.

Resultados similares fueron obtenidos en las muestras de cera de abeja de los cultivos con *Bs-2* y *Bs-3*. Cabe señalar que en la muestra obtenida del cultivo con *Bs-2*, las vibraciones de tensión O-H no se detectaron y la formación de las bandas entre 1540 y 1630 cm^{-1} fue menos evidente con respecto a los resultados obtenidos en las dos cepas restantes. Esto es en cierta forma contradictorio a los resultados obtenidos de actividad lipolítica, ya que fue con la cepa *Bs-2*, donde se encontró una mayor actividad (alrededor de 3.78 U/ml).

Entonces con base en lo anterior, se puede suponer que una alta expresión de lipasas no necesariamente implica una mayor modificación estructural de la cera de abeja, lo cual se reflejó en los espectros de FT-IR, donde los cambios más notables fueron al emplear las cepas *Bs-1* cuya actividad lipolítica se mantuvo constante alrededor de 1.1 U/ml y con *Bs-3* donde vario de 0.98 a 1.95 U/ml. Este comportamiento puede estar relacionado con las características de las lipasas expresadas por cada cepa bajo estudio., siendo la especificidad una de las más relevantes.

8.6 Análisis preliminar de crecimiento y producción de esterasas/lipasas de *Bs-1*, *Bs-2* y *Bs-3* en medio mineral modificado (MM-2)

Para determinar si las cepas de *B. subtilis* bajo estudio son capaces de crecer en un medio con limitaciones nutricionales, se realizaron pruebas de germinación y crecimiento celular utilizando el medio MM-2, en el cual las fuentes de carbono y nitrógeno utilizadas fueron cera de abeja al 1% w/v y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 0.5% w/v respectivamente.

Se evaluó la germinación de *Bs-1*, *Bs-2* y *Bs-3* en MM-2 inoculando con 10^7 esporas, encontrando que bajo las condiciones de cultivo empleadas e indistintamente de la cepa de *Bacillus* utilizada, la germinación no puede llevarse a cabo, ya que al incubar hasta por un periodo de 7 días, no se detectó la presencia de células en el medio. Esto es de esperarse, ya que al utilizar un inóculo en un estado metabólico de dormancia, los requerimientos nutricionales para reactivar el crecimiento celular no se pueden satisfacer con una fuente de nitrógeno mineral cuando se utilizan como única fuente de carbono compuestos que en principio para ser aprovechados, primeramente deben ser fraccionados a monómeros, para lo cual la síntesis de enzimas que puedan cumplir esta función es indispensable.

Por lo anteriormente descrito, en el medio MM-2 se sustituyó a la cera de abeja por el 1% w/v de glucosa. Esta modificación se utilizó para activar las cepas de *Bacillus* preservadas en discos de esporas, con la finalidad de obtener un pre-cultivo que fue utilizado para inocular MM-2 y determinar si las cepas *Bs-1*, *Bs-2* y *Bs-3* son capaces de crecer a partir de un inóculo de células en el medio con cera y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuente de carbono y nitrógeno respectivamente.

Se evaluó el crecimiento a periodos de incubación de 24, 48, 72 y 96 h, determinando que las tres cepas tiene la capacidad de crecer en MM-2 a partir de un inóculo de células previamente germinadas en un medio bajo en nutrientes. Se obtuvo una máxima concentración celular en *Bs-1* y *Bs-2* en el orden de 10^5 células/ml a 48 h, mientras que en *Bs-3* fue en el orden de 10^7 células /ml en el mismo periodo de

tiempo. Entre las 48 y 96 h solo se detectó la presencia de esporas en el medio de cultivo independientemente de la cepa utilizada.

La actividad enzimática se determinó a los mismos periodos de tiempo en los que se evaluó el crecimiento celular. Encontrando que solo la expresión de lipasas es llevada a cabo en las tres cepas de *Bacillus*. De acuerdo al perfil de actividad enzimática (Figura 33), en *Bs-1* se obtuvo un máximo de 1.63 U/ml a 24h. En *Bs-2* se obtuvieron valores constantes entre 0.9 y 1.15 U/ml, mientras que en *Bs-3* fueron de 0.65 a 1.08 U/ml, obteniendo los mejores resultados entre las 24 y 48 h. Es de esperarse que la producción de esterasas no se lleve a cabo dada la naturaleza de la fuente de carbono, donde los constituyentes son de carácter alifático y preferentemente inducen la expresión de lipasas.

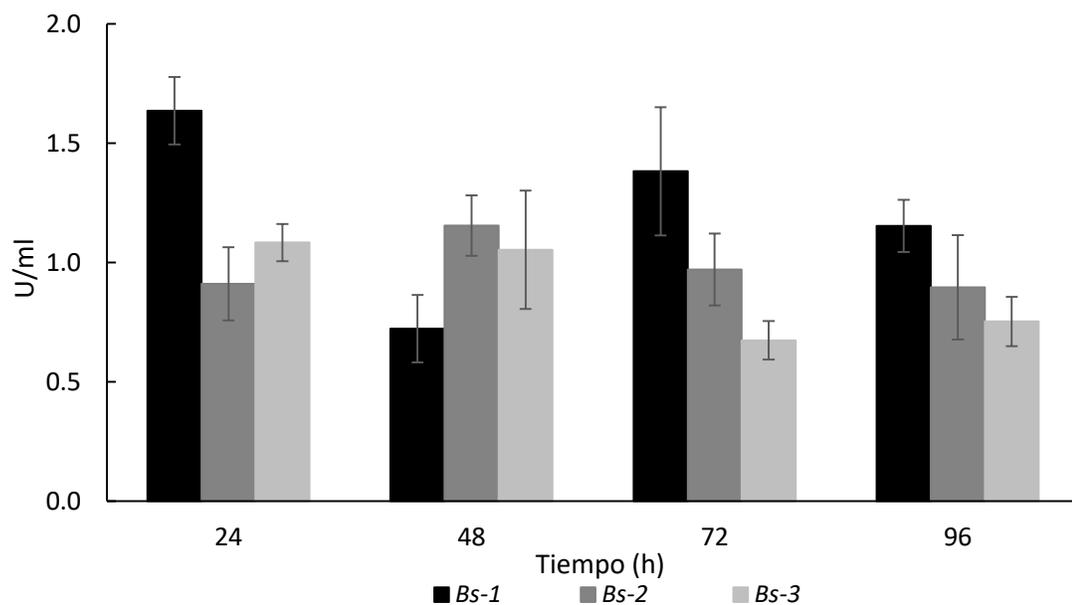


Figura 33. Actividad lipasa en U/ml de células completas de *Bs-1*, *Bs-2* y *Bs-3* obtenidas en cultivos de propagación en MM-2.

El que las tres cepas de *Bacillus* puedan crecer en un medio tan poco convencional como lo es MM-2, brinda una idea de su capacidad para sintetizar enzimas específicas que hidrolizan los componentes de la cera de abeja. Por lo que un estudio más detallado involucrando el análisis de variables como el pH inicial del cultivo, la variación de temperatura, concentraciones del inductor y fuentes de nitrógeno, es necesario.

De igual forma, el estudio de la cera de abeja obtenida de los cultivos a 96 h por espectroscopia de infrarrojo fue realizado. Cabe señalar que los resultados obtenidos fueron muy similares a lo que se describió en el apartado 8.4.2, donde se analizaron los espectros de FT-IR de la cera empleada como inductor de actividad lipolítica en los medios MM y MN.

En la figura 34 se muestran los espectros de FT-IR de la cera de abeja obtenida en de los cultivos de *Bs-1*, *Bs-2* y *Bs-3*. En los cuales la única variación con respecto al control, radica en la formación de dos bandas a 1539 y 1574 cm^{-1} de enlaces de tensión del C=O. Por las condiciones en la que se llevó a cabo el cultivo de cada microorganismo, donde la cera fue la única fuente de carbono disponible, se podría esperar una modificación estructural más significativa en relación al crecimiento celular, sin embargo esto no fue observado a pesar de detectar una actividad lipolítica relativamente alta, en comparación con otras pruebas realizadas empleando diferentes configuraciones de MM, así como medio nutriente.

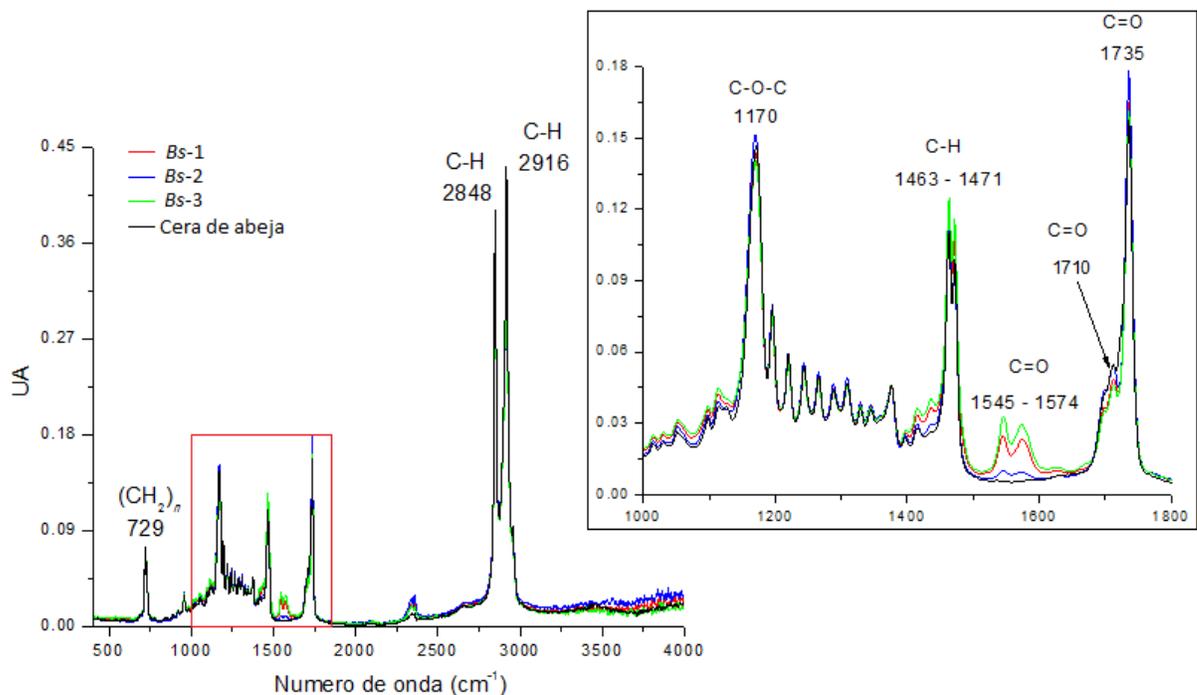


Figura 34. Espectros FT-IR de cera de abeja empleada como única fuente de carbono en cultivos de propagación de *Bs-1*, *Bs-2* y *Bs-3* en MM-2 a 72 h.

Lo anterior puede relacionarse al hecho que para activar las esporas se utilizó glucosa como fuente de carbono, por lo que la maquinaria enzimática en las células del inoculo debió reajustarse para

aprovechar la cera de abeja, lo que conlleva a la síntesis de nuevas enzimas y metabolitos para lo cual se requiere nitrógeno, que al ser provisto de una fuente mineral, podría afectar las características de las enzimas sintetizadas bajo estas condiciones con respecto a utilizar extracto de levadura o peptona. Además Gupta et al. (2004), mencionan que al emplear fuentes inorgánicas de nitrógeno, el NH_4Cl y $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ en algunos casos son más efectivas con respecto al sulfato de amonio.

El objetivo principal de este trabajo se centró en la búsqueda de las condiciones de cultivo ideales para llevar a cabo la hidrólisis enzimática de los esteres alifáticos de la cera de abeja, y obtener de esta forma la fracción alcohólica que es un producto de alto valor comercial. Esto no pudo ser concretado, sin embargo se obtuvo información útil que permitirá a futuras investigaciones tener un punto de referencia para implementar y mejorar los procedimientos y condiciones experimentales desarrollados en este trabajo de investigación.

8 CONCLUSIONES

Por medio de la saponificación de la cera de abeja se obtuvieron productos con cierto contenido de alcoholes alifáticos de alto peso molecular, cuya abundancia se vio mejorada por el aumento de la temperatura y tiempo de reacción.

Para la obtención de alcoholes alifáticos de cadena larga a partir de coccerina, la saponificación no es el método más adecuado, determinado que bajo los parámetros de reacción empleados, los ésteres contenidos en la cera se hidrolizan de forma parcial.

Bajo los parámetros en los cuales se llevaron a cabo los cultivos celulares de *Bs-1*, *Bs-2* y *Bs-3* en medio líquido, la cera de abeja indujo la producción de esterasa y lipasas en diferentes proporciones relacionadas con la composición del medio y tipo de inóculo, obteniendo que:

- La producción de lipasas de *Bs-1* se favorece en los cultivos de germinación utilizando MM y MN con respecto a los cultivos de propagación donde la expresión de esterasas es mayor utilizando los mismos medios de cultivo.
- La ausencia de glucosa en los cultivos de germinación con MM-1 promueve la síntesis de lipasas de *Bs-1*, *Bs-2* y *Bs-3*, obteniendo una mayor expresión de la enzima durante las primeras 12 h de cultivo, obteniendo como máximo 3.13 U/ml con *Bs-3*.
- La esporulación en los cultivos de propagación con MM-1 se induce a periodos de incubación cortos independientemente de la cepa de *Bacillus* utilizada, donde se determinó la presencia de una lipasa activa bajo dichas condiciones, mediante la cual se obtuvo una actividad enzimática mayor a 1 U/ml.
- La velocidad de crecimiento específica es mayor durante la germinación independientemente del medio de cultivo y cepa de *Bacillus* empleados.
- Las cepas *Bs-1*, *Bs-2* y *Bs-3* tienen la capacidad de crecer utilizando cera de abeja como única fuente de carbono.

9 PERSPECTIVAS

Algunos puntos importantes para la continuación de esta investigación son:

- Determina la proporción y composición de las especies químicas que integran la cera de abeja para correlacionarlo con la producción de policosanol vía química, así como su efecto en la inducción de enzimas lipolíticas.
- Implementar GC-MS para determinar la composición y pureza del policosanol obtenido de cera de abeja y coccerina.
- Ya que la mejor respuesta en cuanto a los cambios estructurales que sufre la cera de abeja por la interacción con células o sus enzimas se observó en los cultivos de propagación con MM-1, se recomienda analizar el efecto en la actividad enzimática por la variación de temperatura, agitación, fuente de nitrógeno pH inicial, así como diferentes % w/v del inductor en el medio de cultivo.

10 BIBLIOGRAFIA

Adhikari P., Hwang K.T., Park J.N., Kim C.K. (2006). Policosanol Content and Composition in Perilla Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:5359-5362

Asikin Y., Takahashi M., Hirose N., Hou D., Takara K., Wada K. (2012). Wax, policosanol, and long-chain aldehydes of different sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) cultivars. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 1-9.

Asoodeh A. & Ghanbari T. (2013). Characterization of an extracellular thermophilic esterase produced by *Bacillus subtilis* DR8806. *Journal of Molecular Catalyst B: Enzymatic* 85-86: 49-55.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. De Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N., Ludwig W., Rainey F., Schleiter K. & Whitman W. 2009 (Volumen 3, segunda edición).

Berry J. (1933). Detection of microbial lipase by copper soap formation. *Journal of bacteriology.* 25 (4): 433-444.

Bonvehí J. & Bermejo F.J. (2012). Detection of adulterated commercial Spanish beeswax. *Food Chemistry*, 132: 642-648.

Bornscheuer U.T. & Kazlauskas R.J. (2006). *Hydrolases in organic synthesis regio- and stereoselective biotransformations*. 2nd ed. Alemania. Edit. Wiley-Vch.

Bornscheuer U.T. (2002). Microbial Carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 23: 73-81.

Bradbear N. (2005). *La apicultura y los medios de vida sostenibles*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO.

Buchwald R., Breed D.M., Bjostad L., Hibbard B.E., Greenberg A.R. (2009). The role of fatty acids in the mechanical properties of beeswax. *Apidologie*, 40: 585-594.

Cabello C.J., Galindo-Sáenz A., Bermúdez-Barajas L., Pérez-Berumen C., Ávila Orta C., Valdés Garza J.A. (2013). Cera de candelilla y sus aplicaciones. *Avances en Química*, 8 (2): 105-110.

Calero O. (2006). *Caracterización bioquímica y molecular de una esterasa fúngica aplicación en la industria papelera*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

Carey F.A. (2006). *Química Orgánica*. 6° ed. México. Edit. McGraw Hill Interamericana.

Carissimi M., Ottonelli C., Furtado T., Carbellini V. & Scroferneker M. (2007). Comparison of lipolytic activity of *Sporothrix schenckii* strains utilizing olive oil rhodmine B and tween 80. *TECNO-LÓGICA*. 11: 33-36.

Chahinian H., Ali Y.B., Abousalham A., Petry S., Mandrich L., Manco G., Canaan S. & Sarda L. (2005). Substrate specificity and kinetic properties of enzymes belonging to the hormone-sensitive lipase family: Comparison with non-lipolytic and lipolytic carboxylesterases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1738: 29-36.

Cherif A., Messaouda M., Kaabi B., Boukhcina Z., Pepe C., Kellel H. (2010). Comparison of the Concentrations of Long-Chain Alcohols (Policosanol) in Three Tunisian Peanut Varieties (*Arachis hypogaea* L.). *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 58: 12143-12148.

Chibnall C.A., Latner A.L., Williams E.F., Ayre C.A., (1934). The constitution of coccerin. Biochemical Department, Imperial College of Science and Technology, South Kensington.

Choi J.Y., & Lee B.H. (2001). Culture condition from the production of esterase from *Bacillus casei* CL96. *Bioprocess and biosystem engineering*, 24: 69-63.

Cortés D. (2004). Relación del aparato reproductor femenino de *Dactylopius coccus* Costa (Hemiptera: Dactylopiidae) en la síntesis de ácido carmínico. Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas.

Dinorín J. (2009). Evaluación de la actividad de lipasa a partir de cultivo de microorganismos aislados de suelos y su aplicación en la transesterificación de aceites de desecho. Tesis de Maestría. CIBA-IPN.

Dunford N.T., Irmak S., Jonnala R. (2010). Pressurised solvent extraction of policosanol from wheat straw, germ and bran. *Food Chemistry* 199: 1246-1249.

Errington J. (1993). *Bacillus subtilis* sporulation: Regulation of gene expression and control of Morphogenesis. *Microbiological Reviews*. 57 (1): 1-33.

García M. (2005). Hidrólisis enzimática de triglicéridos en emulsiones de o/w. Aplicación a formulaciones detergentes. Universidad de Granada. Departamento de Ingeniería Química.

González V.L., Marrero L., Sierra R., Velázquez C. (2007). Capillary Gas Chromatography of the Fatty Alcohols (C₂₄-C₃₄) Policosanol in Film-Coated Tablets. *Latin American Journal of Pharmacy*. 26 (6): 900-3.

Gupta R., Gupta N. & Rathi P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol Biotechnol*. 64: 763-781.

Hangarter R. y Ries S. (1978). Effect of triacontanol on plant cell culture in vitro. *Plant. Physiol*. 61: 855-857.

Harrabi S., Boukhchina S., Mayer P.M., Kallel H. (2009). Policosanol distribution and accumulation in developing corn kernels. *Food Chemistry* 115: 918-923.

Harwood R. C. (1989). *Bacillus*. Springer Science Business Media, LCC. ISBN 978 1 4899 3504 5.

Hasan F., Shah A. & Hameed A. (2009). Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*. 27: 782-798.

Higerd T. & Spizizen J. (1973). Isolation of two acetyl esterases from extracts of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 114 (3): 1184-1192.

Hosokawa M. (2010). Carboxylesterases: Overview, structure, function and polymorphism, Chiba Institute of Science, Japan, 288-0025.

Hwang K., Cuppett S., Weller C., Anna M. & Shoemaker R. (2002). Aldehydes in grain sorghum wax. *Journal of Oil and Fat Industries*. 79: 529-533.

Irmak S., Dunford N.T. (2005). Policosanol Contents and Compositions of Wheat Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 5583-5586.

Irmak S., Dunford N.T., Milligan J. (2006). Policosanol contents of beeswax, sugar cane and wheat extracts. *Food Chemistry*, 95: 312-318.

Jassen P., Monk C. & Morgan H. (1994). A thermophilic, lipolytic *Baillus* sp. And continuous assay of its p-nitrophenyl palmitate esterase activity. *Microbiology Letters*. 120: 195-200.

Jiménez J.J., Bernal J., S., Nozal M., Martin M. & L. Bernal Jr. (2006). Sample preparation methods for beeswax characterization by gas chromatography with flame ionization detection. *Journal of Chromatography* 1129: 262-272.

Jiménez J.J., Bernal J.L., Aumente S., Nozal M., Martin M. & L. Bernal Jr. (2004). Quality assurance of commercial beeswax Part I. Gas chromatography–electron impact ionization mass spectrometry of hydrocarbons and monoesters. *Journal of Chromatography* 1024: 147-154.

Jiménez J.J., Bernal J.L., Aumente S., Toribio L. Bernal Jr. J. (2003). Quality assurance of commercial beeswax II. Gas chromatography–electron impact ionization mass spectrometry of alcohols and acids. *Journal of Chromatography A*. 1007: 101–116.

Kaiser P., Raina C., Parshad R., Johri S., Verma V., Andrabi K.I.Qazi G.N. (2006). A novel esterase from *Bacillus subtilis* (RRL 1789): Purification and characterization of the enzyme. *Protein expression and purification* 45: 262-268.

Kumar D., Kumar L., Nagar S. Raina C. Parshad R. & Kumar R. (2012). Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus* sp. Strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions. *Archives of Applied Science Research*. 4 (4): 1763-1770.

Lamego J., Cunha B., Peixoto C., Sousa M.F., Alves P.M., Simplício A.L., Coroadinha A.S. (2013). Carboxylesterase 2 production and characterization in human cells: new insights into enzyme oligomerization and activity. *Appl. Microbiol Biotechnol*, 97: 1161-1173.

León R., Lema C., Nava N., Quintero A. (2014). Revisión Bibliográfica I. Universidad de los Andes.

Liu P. (2007). Structural, kinetic and mutational analysis of two bacterial carboxylesterases. *Biology Dissertations*, paper 26.

Lizano O. (2012). Caracterización bioquímica de la actividad lipolítica de *Pseudoalteromonas atlantica* aislada de la Bahía de Parcas. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Madrigal C.S. (2007). Extracción de la cera de caña con etanol a partir de lodos residuales de la industria azucarera. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas.

Mahadevan V. (1978). Fatty alcohols: Chemistry and metabolism. Prog. Chem. Fats Other Lipids. 15: 255-299.

Maia M. & Nunes F. (2013). Authentication of beeswax (*Apis mellifera*) by high temperature gas chromatography and chemometric analysis. Food chemistry. 136: 961-968.

Martinez J. (2000). El policosanol de la caña de azúcar, aplicaciones en las hipercolesterolemias y el riesgo vascular. Rev. Fitoterapia 3: 183-194.

Maytorena C. & García F. (2012). Uso de enzimas en solventes orgánicos en la industria de bioprocesos. Biotecnología 16(1): 21-35

Meinwald J., Smolanoff J., Chibnall A.C., Eisner T. (1975). Characterization and synthesis of waxes from Homopterous insects. J. Chem. Ecol., 1 (2): 269-274.

Méndez E., Blanco M., Laguna A., García E. (2003). Isolation and characterization of a mixture of higher primary aliphatic alcohols of high molecular weight from henequen (*Agave furcroydes* L.) wax. Revista CENIC Ciencias Químicas 34 (1): 35-38.

Mendez R., Amor A., Rodeiro I., González R., Gómez P., Alfonso J. y Mas R. (2001). Policosanol modulates HMG-CoA reductase activity in cultured fibroblast. Archives of Medical Research 32: 8-12.

Misra A. y Srivastava N. (1991). Effect of the triacontanol formulation "Miraculan" on photosynthesis, growth, nutriment uptake and essential oil yield of Lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*). Plant Growth Regulation 10: 57-63.

Naeem M., Idreesa M., Aftaba T., Alam M., Khan M., Uddinb M. & Varshney L. (2014). Employing depolymerised sodium alginate, triacontanol and 28-homobrassinolide in enhancing physiological activities, production of essential oil and active components in *Mentha arvensis* L. Industrial Crops and Products, 55: 272-279.

Navarro I. & Periago M (2012). Enzimas lipolíticas bacterianas: propiedades, clasificación, estructura, aplicaciones tecnológicas y aspectos legales. An. Vet (MURCIA) 28: 45-65.

Panda T. & Gowrishankar B.S. (2005). Production and applications of esterases. Appl Microbiol Biotechnol, 67: 160-169.

Perez P. Alcoholes alifáticos primarios de peso molecular elevado obtenidos a partir de cera de abeja y su utilización farmacéutica. España. Patente ES 2 252 034 T3. 16 Mayo 2006.

Peris J. (2008). Estudio analítico de materiales empleados en barnices, aglutinantes y consolidantes en obras de arte mediante métodos cromatográficos y espectrométricos. Universidad de Valencia. Facultad de Químicas.

Qun Li M.S, Alan B.R., Thomson M.D., Michael T., Clandinin P.D. (2011). Cholesterol Ester and Free Fatty Acids Are Modulated by Policosanol in CaCo-2 Intestinal Cells. Journal of the American College of Nutrition, 30 (3): 201-209.

Sakouhi F., Boukhchina S., absalon C., Fouquet E. & Kellel K. (2010). Policosanol Characterization and accumulation during ripening of Tunisian *Olea europaea* L. fruits. Eur. J. Lipid. Sci. Technol. 112: 373-379.

Sánchez A. (1998). Recuperación, purificación y caracterización de lipasas producidas por *Candida rugosa*. Aplicación a la resolución de compuestos quirales y diseño del reactor enzimático. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona.

Satoh T. & Hosokawa M. (2006). Structure, function and regulation of carboxylesterases. *Chemico-biological Interactions*, 162: 195-211.

Sharma R., Chisti Y. & Banerjee U. (2001). Production purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances*. 19: 627-662.

Sindhu T.C., Jaganmohan L., Shamanthaka M.C. (2007). Characterization of wax esters free fatty alcohols and free fatty acids of crude wax from sunflower seed oil refineries. *Food Chemistry*. 101 1552–1557.

Skoog D., Holler F. & Nieman T. (2001). Quinta edición. Editorial McGraw Hill. ISBN 0 03 002078 6.
Stoycheva M., Montero G., Zlatev R., León J. & Gochev V. (2012). Analytical methods for lipase activity determination: A review. *Current Analytical Chemistry*. 8: 400-407.

Takac S. & Marul B. (2008). Effects of lipidic carbon sources on the extracellular lipolytic activity of a newly isolated strain of *Bacillus subtilis*. *J. Ind. Microbiol Biochnol*. 35: 1019-1025.

Tallofa J., González A., Tiznado M., Zacarías L. y Baéz L. (2013). Composición fisiológica y biosíntesis de la cutícula en plantas. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 36 (1): 3-12.

Thomson C., Delaquis P. & Mazza G. (1999). Detection and Measurement of Microbial lipase activity: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. (39) 2: 165-187.

Tovar (2008). Factores que determinan la asociación del insecto productor de grana fina (*Dactylopius coccus Costa*) (Homóptera, Dactylopiidae) a diferentes especies de *Opuntia* y *Nopalea*. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Trinidad A. & Aguilar D. (2000). Fertilización foliar. Un respaldo importante en el rendimiento de los cultivos. *Terra* Vol. 17(3): 247-255.

Varady K., Wang Y. y Jones P. (2003). Role of policosanols in the prevention and treatment of cardiovascular disease. *Nutrition Reviews* (61) 11: 376-383.

Viola F., Oliaro S., Binello A., Cravotto G. (2008). Policosanol: updating and perspectives. *Mediterr. J. Nutr. Metab*. 1: 77-83.

Wang. M., Lian H., Mao L., Zhou J., Gong H., Quian B., Fang Y., Li j. (2007). Comparison of various extraction methods for policosanol from rice bran wax and establishment of chromatographic fingerprint of policosanol. *J. Agric. Food Chem*. 55: 5552-5558.

Willis A. (1960). The lipolytic activity of some *Clostridia*. *The Journal of Pathology*. 2: 379- 390.

11 ANEXOS

Anexo 11.1 Espectros de FT-IR de las cinéticas de saponificación de cera de abeja a 80 y 130 °C

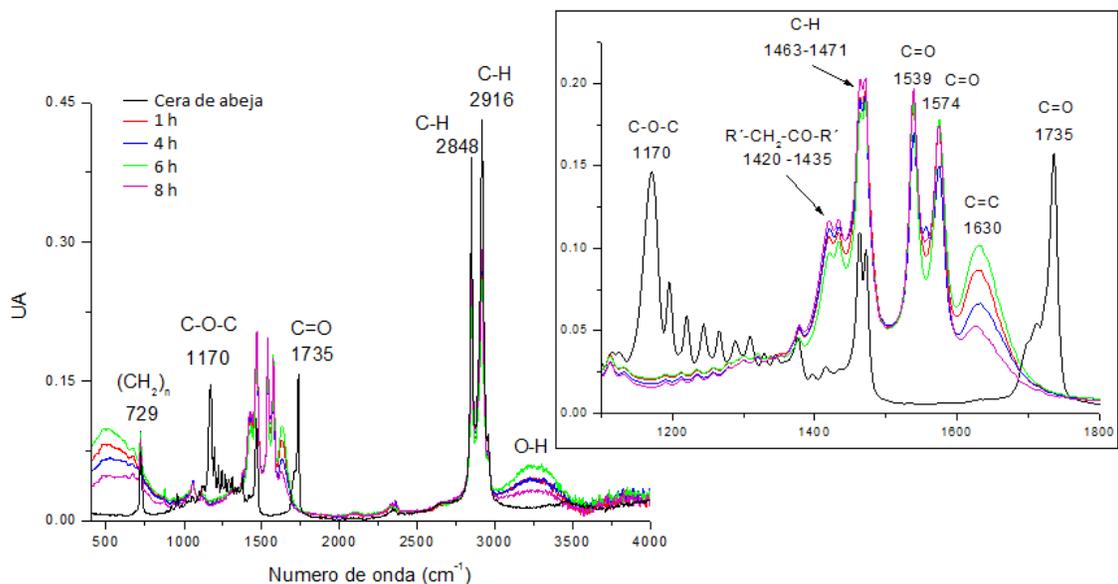


Figura 35. Seguimiento de la hidrolisis de cera de abeja a 130 °C por FT-IR a diferentes tiempos de reacción.

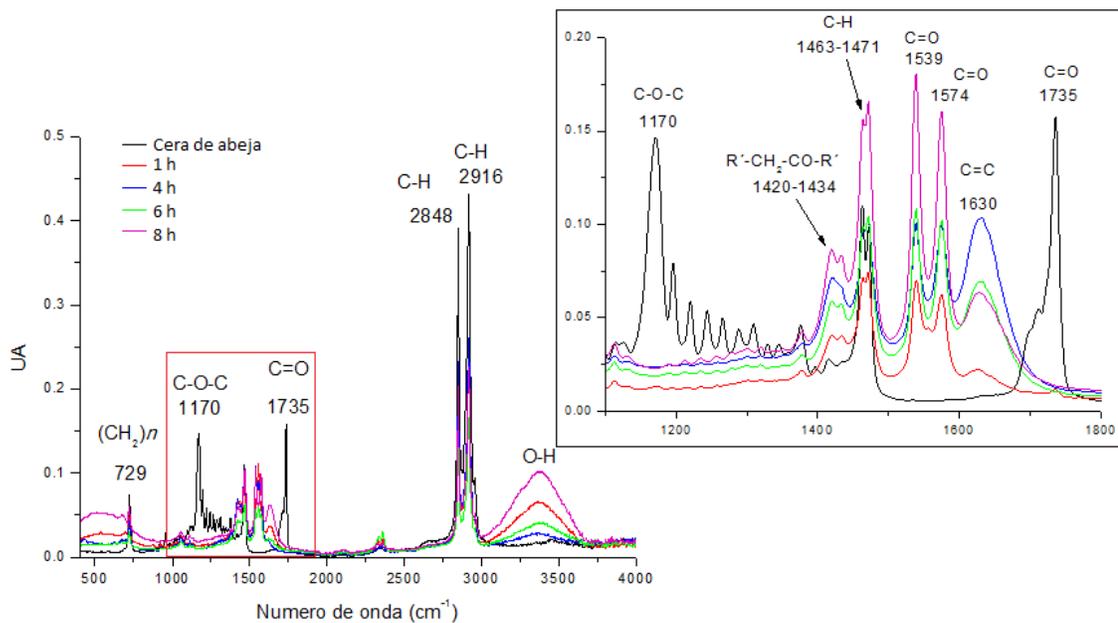


Figura 36. Seguimiento de la hidrolisis de cera de abeja a 200 °C por FT-IR a diferentes tiempos de reacción.

Anexo 11.2 Espectros de FT-IR de las cinéticas de saponificación de coccerina a 80 y 130 °C

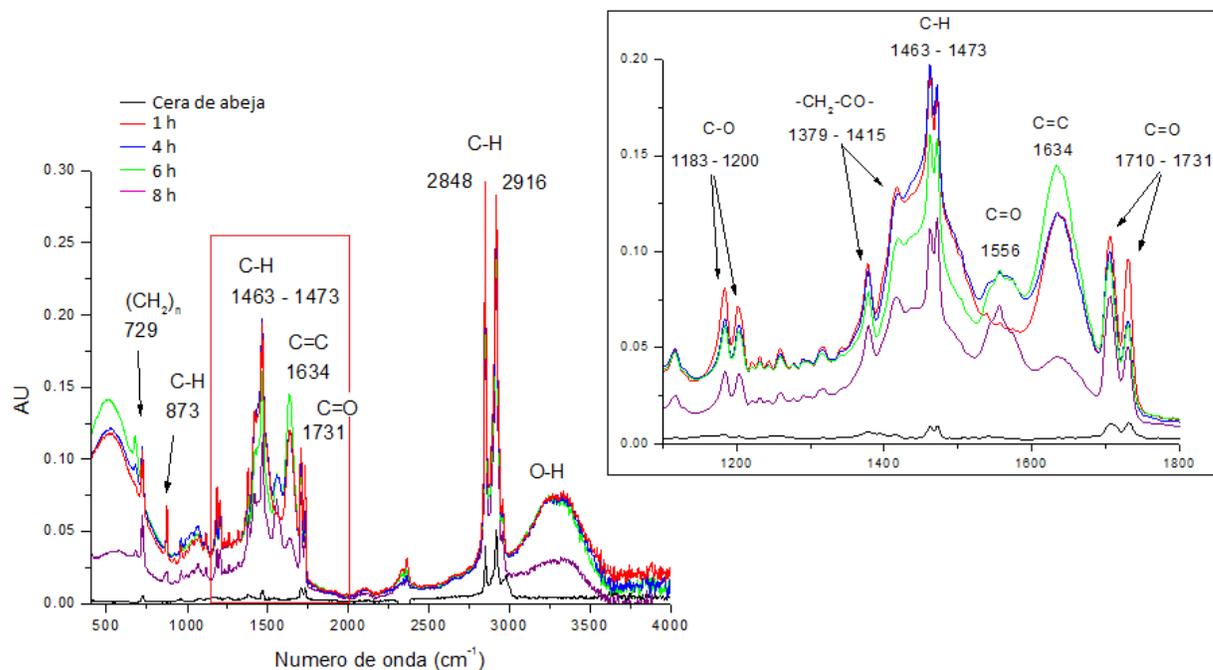


Figura 37. Seguimiento de la hidrolisis de coccerina a 130 °C por FT-IR a diferentes tiempos de reacción.

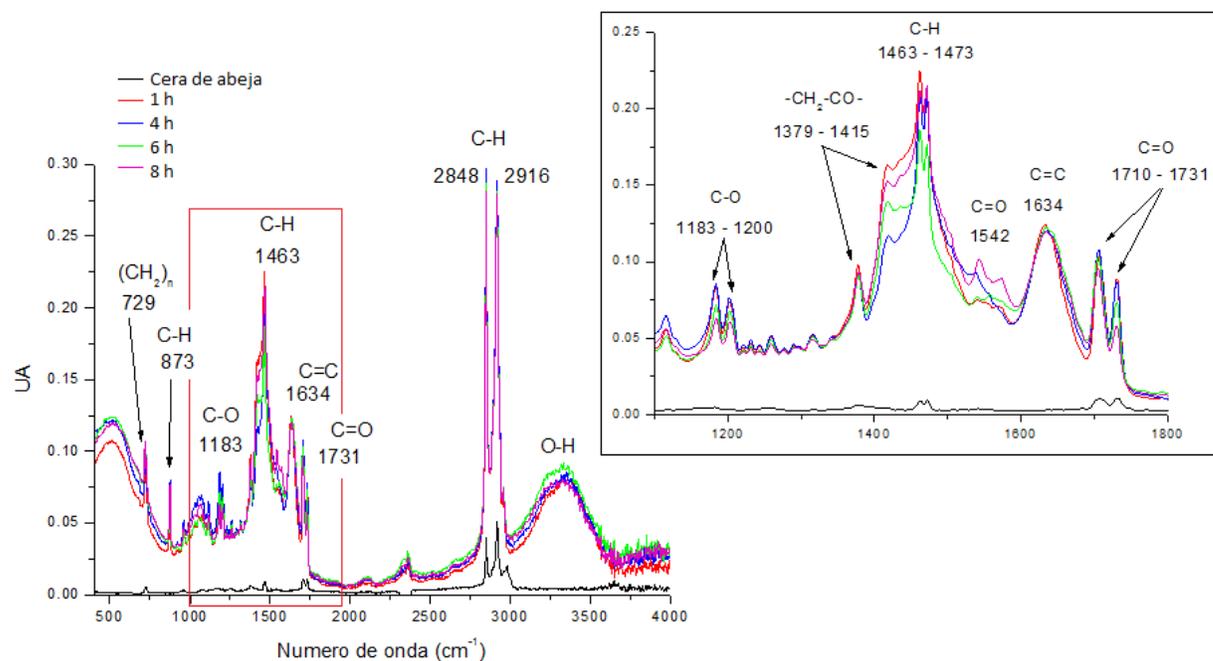


Figura 38. Seguimiento de la hidrolisis de coccerina a 200 °C por FT-IR a diferentes tiempos de reacción.

Anexo 11.3 Espectros de FT-IR del policosanol obtenido a partir de cera de abeja a 80 y 130 °C

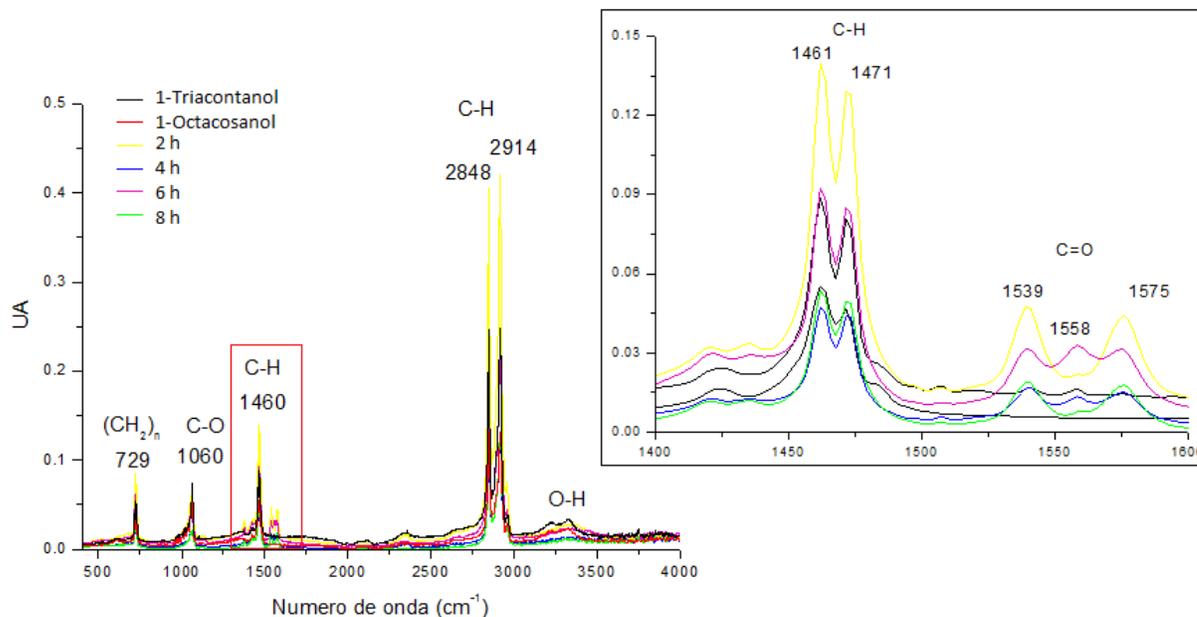


Figura 39. Espectros de FT-IR de policosanol obtenido de cera de abeja a diferentes tiempos de reacción a 80 °C y estándares comerciales 1-Octacosanol y 1-Triacontanol.

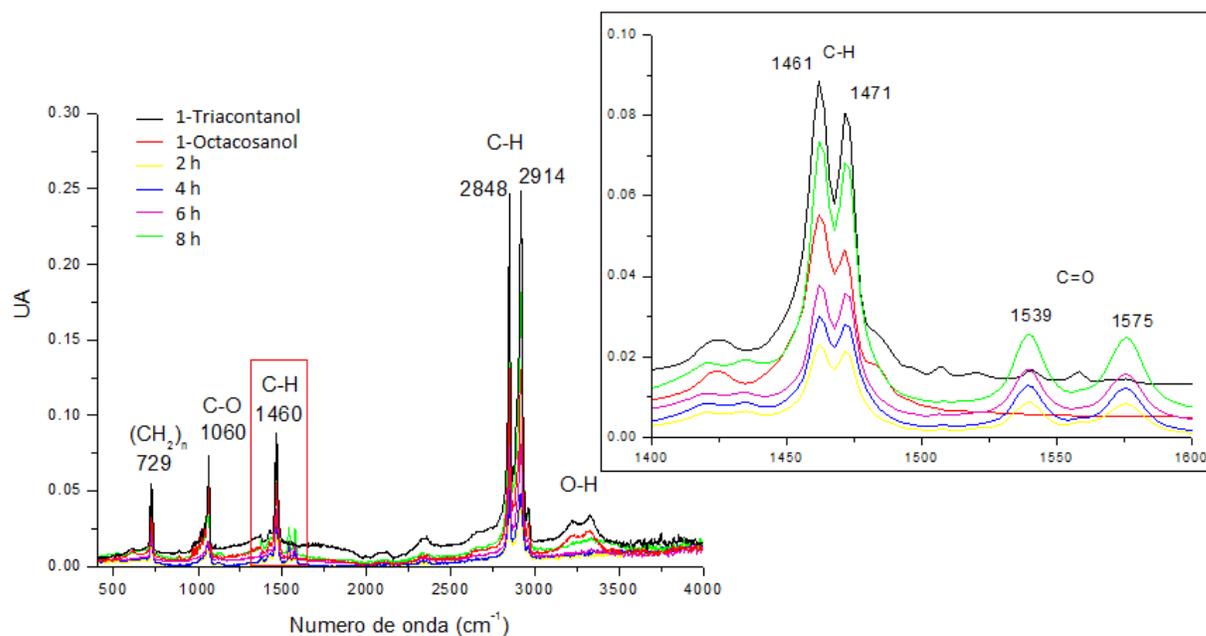


Figura 40. Espectros de FT-IR de policosanol obtenido de cera de abeja a diferentes tiempos de reacción a 130 °C y estándares comerciales 1-Octacosanol y 1-Triacontanol.

Anexo 11.4 Espectros de FT-IR del policosanol obtenido a partir de coccerina a 80 y 130 °C

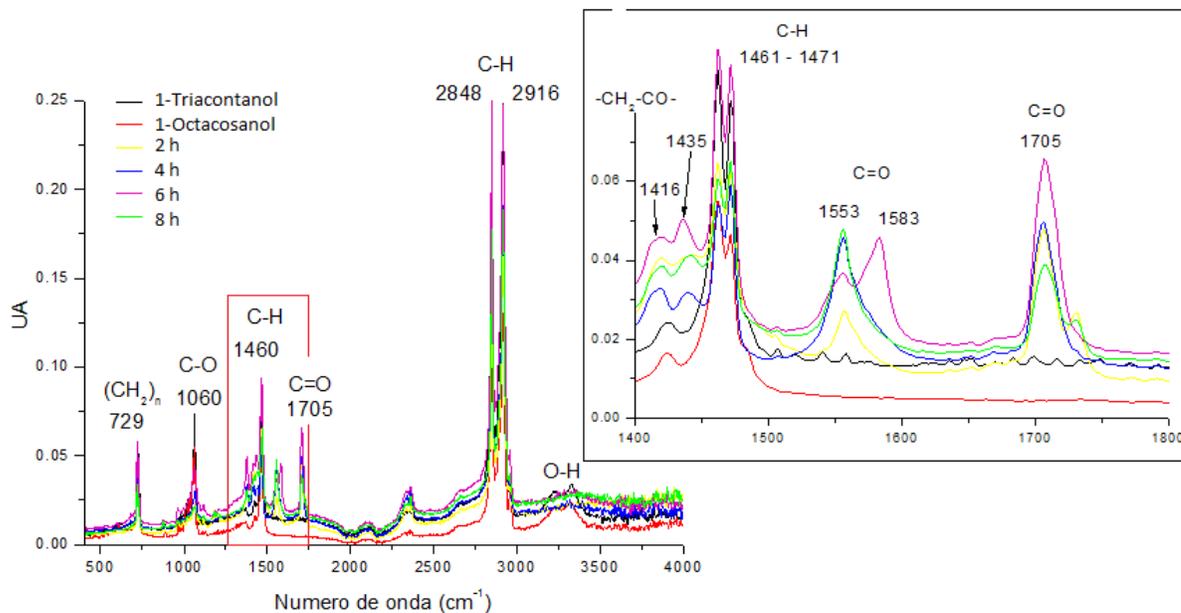


Figura 41. Espectros de FT-IR de policosanol obtenido de coccerina a diferentes tiempos de reacción a 80 °C y de estándares comerciales 1-Octacosanol y 1-Triacontanol.

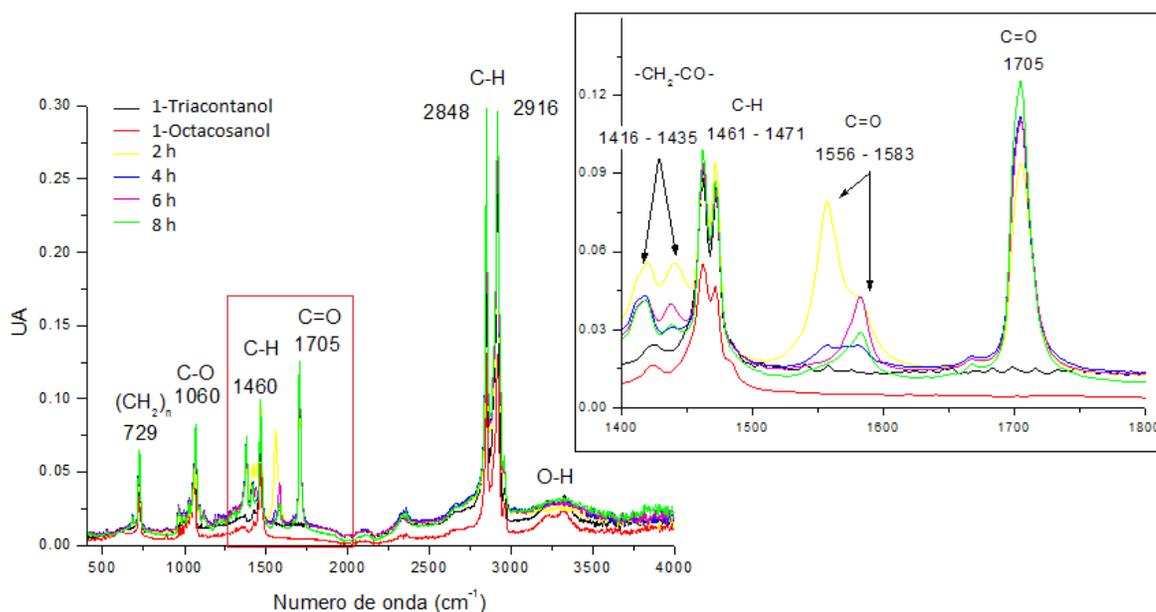


Figura 42. Espectros de FT-IR de policosanol obtenido de coccerina a diferentes tiempos de reacción a 130 °C y de estándares comerciales 1-Octacosanol y 1-Triacontanol.

Anexo 11.5 Espectro de UV-Vis dep-NP

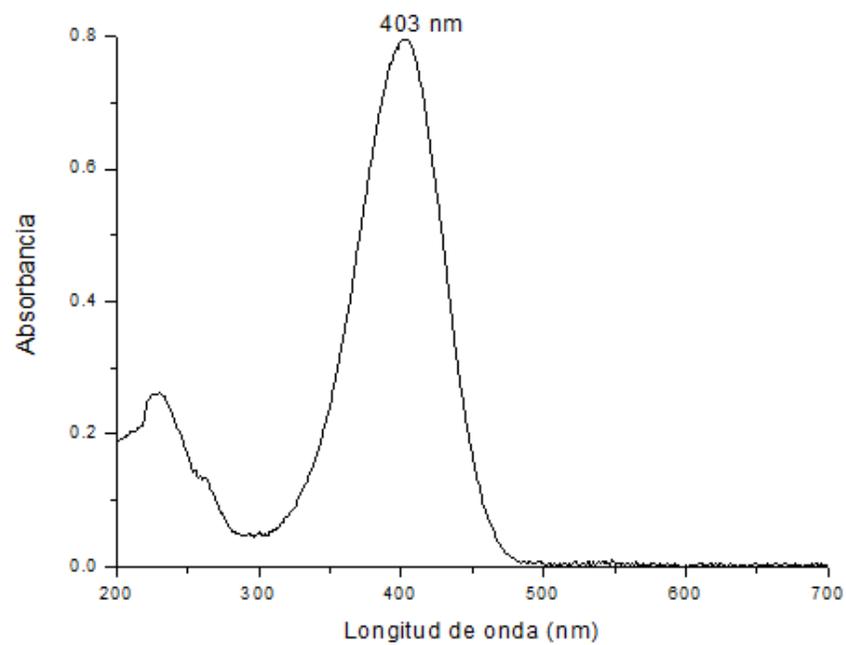


Figura 43. Espectro de UV de pNP