

Desglicosilación enzimática de flavonoides en líquidos iónicos

Laura Rosana Lopez

-2014-

Prefacio

Esta tesina se presenta como parte de los requisitos para optar al grado académico de la Licenciatura en Química, de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra institución académica. Se llevó a cabo en el Laboratorio de Biocatálisis, dependiente de INCITAP-CONICET- Departamento de Química- FCEyN-UNLPam durante el periodo comprendido entre Octubre 2013- Julio 2014, bajo la dirección de Dr. Javier D. Breccia y bajo la co-dirección del Dr. Pablo Domínguez de María.

Rosana Lopez

Laboratorio de Biocatálisis

INCITAP-CONICET

Departamento de Química- FCEyN

Universidad Nacional de La Pampa

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco a la Universidad Nacional de La Pampa, institución que me abrió sus puertas para formarme como profesional.

Al Dr. Javier D. Breccia por haberme aceptado en su laboratorio como pasante al inicio de mi carrera, y por aceptar la dirección de esta tesina.

A los Licenciados Gisela Weiz y Lucas Braun por ayudarme desinteresadamente en la coordinación y finalización de esta tesina. Muchas Gracias.

A mis amigas que hicieron de esta etapa algo hermoso, por estar y hacer que el estudio sea más leve.

A mi familia, que creyó en mí, y estuvo siempre, gracias por darme la oportunidad de crecer no solo intelectualmente sino también como persona.

A mi padrino, le debo todo. Por su apoyo incondicional y por estar siempre.

Y a todas las personas que directa o indirectamente permitieron la finalización de esta tesina. Gracias.

INDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT	6
1.INTRODUCCIÓN	
1.1 Líquidos Iónicos	8
1.2 Flavonoides	10
1.3 Glicosidos hidrolasas de flavonoides	10
2. MATERIALES Y METÓDOS	
2.1 Producción de biocatalizadores	13
2.2 Síntesis y caracterización de los solventes altamente eutécticos.	13
2.3 Actividad de α -ramnosil- β - glucosidasa	13
3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1 Síntesis y caracterización de los solventes altamente eutécticos.	15
3.2 Solubilidad de los sustratos en solventes altamente eutécticos.	18
3.3 6-O- α -ramnosil- β -glucosidasa en solventes altamente eutécticos.	20
4. CONCLUSIONES	25
5. REFERENCIAS	26

RESUMEN

La insolubilidad en agua de moléculas complejas como los flavonoides suele limitar la catálisis enzimática por la baja disponibilidad del sustrato en el medio acuoso. Los líquidos iónicos (LI) establecen una alternativa a los sistemas acuosos para incrementar la solubilidad de este tipo de sustratos y posiblemente facilitar la función catalítica de las enzimas. Los catalizadores específicos para la desglicosilación de flavonoides 7-*O*- y 3-*O*-rutinosilados se obtuvieron desde el hongo *Acremonium* sp. DSM24697, estas reacciones fueron llevadas a cabo en presencia de LI de tercera generación, los líquidos altamente eutécticos (DES, de su sigla en inglés). Los resultados demostraron que los polialcoholes constituyentes de los mismos presentaron mayor actividad que los DES, sugiriéndose que estos pueden llegar a ser una alternativa interesante en biocatálisis.

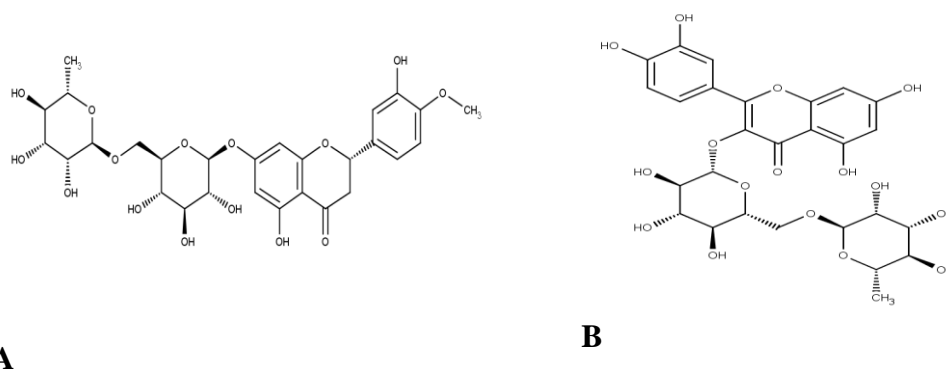


Fig 1.1 Estructura química de los flavonoides: **A-** Hesperidina **B-** Rutina

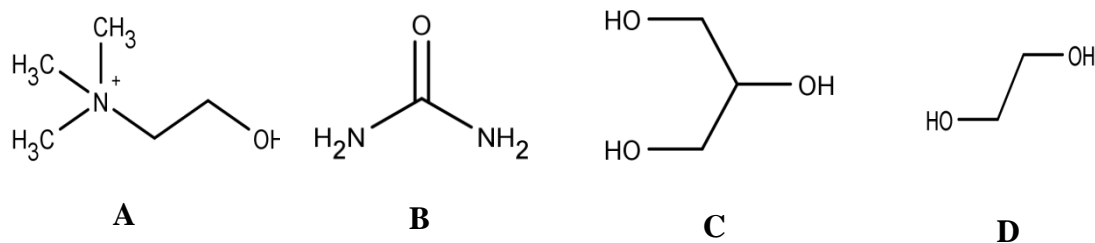


Fig 1.2 Estructura iones de LI: **A-** colina **B:** urea **C:** glicerol **D:** etilenglicol

ABSTRACT

Water insolubility of complex molecules such as flavonoids usually limited enzymatic catalysis by the low availability of the substrate in the aqueous medium. Ionic liquids (IL) provide an alternative to water systems to increase the solubility of such substrates, and possibly facilitating the catalytic function of enzymes. Specific catalysts for deglycosylation flavonoid 7-O- and 3-O-rutinosilados were obtained from the fungus *Acremonium* sp. DSM24697, these reactions were carried out in the presence of LI third generation, deep eutectic solvent (DES). The results showed that DES polyols constituents showed higher activity than DES, suggesting that these may become an interesting alternative in biocatalysis.

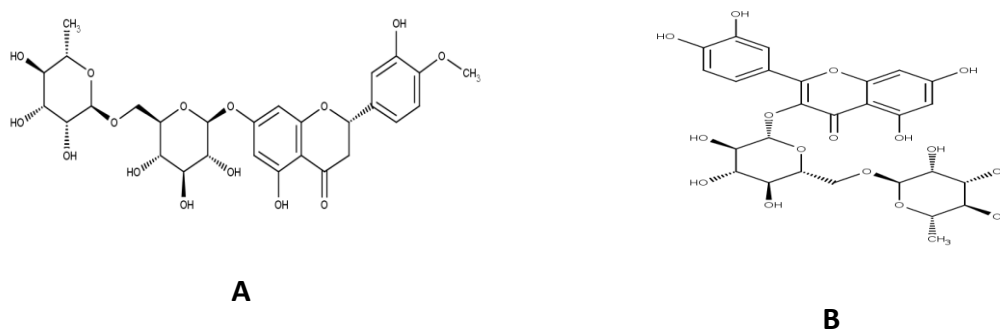


Fig 1.1 Chemical structure of flavonoids A- Hesperidin B –Rutin

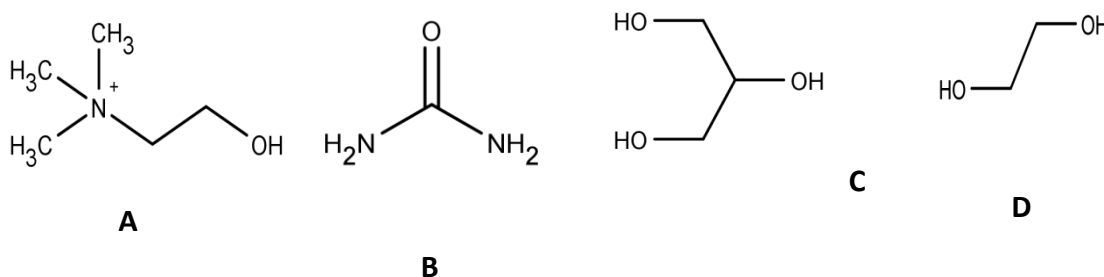


Fig 1.2 LI ion structure: A- choline B: urea C: glycerol D: ethylene

ABREVIATURAS

AH: aceptor de hidrógeno

ChCl: clorhidrato/ cloruro de colina

C:E: colina: etilenglicol

C:G: colina: glicerol

D: debye

DES: (deepeutecticsolvent) solvente altamente eutéctico

DH: donador de hidrógeno

I: inmiscible

I (P): Precipitado

KJ: kilo joule

LB: luria-bertani

LI: líquido iónico

m: miscible

mM: molar

ND: no detectado

$\mu\Omega$: micro-ohms

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Líquidos iónicos

Los LI pueden definirse como sales cuya temperatura de fusión está por debajo de los 100°C. Están compuestos químicamente por un catión orgánico y un anión poliatómico, se clasifican de acuerdo a su estabilidad química:

Entre las propiedades conspicuas de estos líquidos podemos citar la capacidad de solubilizar celulosa, un polisacárido básicamente insoluble en todos los solventes orgánicos y polares conocidos (Maugeriet *al.* 2010). Existen LI descritos desde 1914, la primera patente para disolver celulosa en disolventes piridinium (LI) es suiza y data de los años 30. Varias publicaciones de los años 60 describen los LI de **primera generación** conformados por cationes de cloroaluminatos de piridinio e imidazolio y aniones del tipo tetrafluoroborato, hexafluorofosfato, nitrato, sulfato y acetato. Estos líquidos resultaron ser sensibles al agua y aire. En tanto que para la **segunda generación** se usaron cationes de monoalquilimidazolio y trialquilimidazolio combinándolos con aniones estables en agua como bromuros, cianuros, bisulfuros, yoduros, sulfonatos, tosilatos, tartratos, etc. Los llamados LI de **tercera generación** junto con los solventes altamente eutécticos o DES (de su acrónimo en inglés: deep eutectic solvents), representan una prometedora alternativa porque son simples de preparar, biodegradables y más económicos comparados con los LI de primera y segunda generación. Los DES son una mezcla de sal sólida que funciona como aceptor de hidrógeno (AH) con un compuesto donador de puente hidrógeno (DH) en diferentes proporciones (Wilkes, 2002; Gorke et al., 2010). El siguiente esquema muestra la formación de un DES:

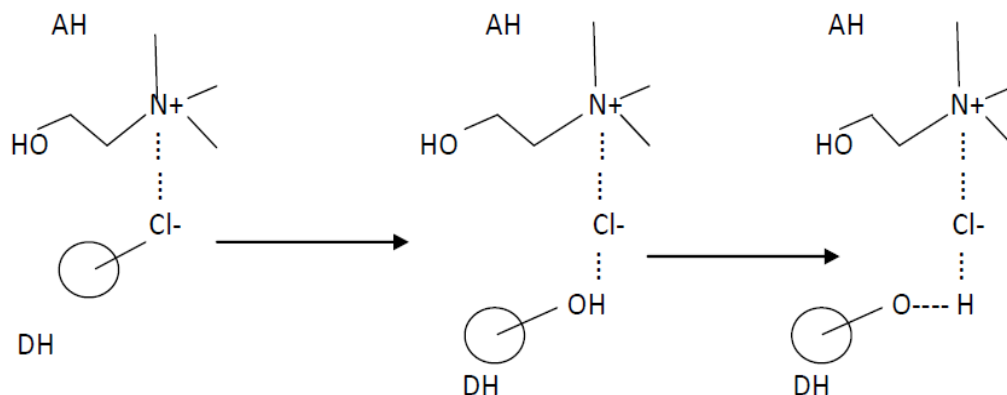


Fig 1.1: Interacciones de puente hidrógeno presentes en las mezclas eutécticas de bajo punto de fusión basadas en clorhidrato de colina (ChCl).

Uno de los componentes más utilizados para la generación de DES es el ChCl (clorhidrato de colina), una sal cuaternaria de amonio que se comporta como un AH, mientras que la urea, ácidos carboxílicos (láctico, cítrico) o polioles naturales (glicerol y carbohidratos) funcionan como DH (Gorke et. al 2010). Un amplio número de LI fueron utilizados con éxito para realizar reacciones catalizadas por enzimas (Maugeri et al. 2013). La posibilidad de utilizar sustratos de baja solubilidad en agua y polaridades diferentes o la posibilidad de realizar reacciones en baja concentración de agua para favorecer las reacciones de síntesis hacen de estos líquidos un sistema atractivo para la biocatálisis.

1.2 FLAVONOIDES

Los flavonoides son metabolitos secundarios de las plantas cuyo esqueleto común es el 2-fenil-1,4-benzo pirano (fig 1.2). Están presentes en casi todas las plantas, fundamentalmente en las partes aéreas, pero varían cualitativamente de una planta a otra. Se han descrito más de 4.000 estructuras diferentes y reciben atención por parte de la comunidad científica, debido a que se les atribuyen propiedades anti-inflamatorias,

antioxidantes y protectora de los vasos sanguíneos. Estas propiedades biológicas los señalan como posibles opciones para el tratamiento de enfermedades vasculares (Blanco Fernández, 2007). Los flavonoides se clasifican según cambios en su estructura básica en varias familias –flavonas, flavonoles, flavanonas, etc.-. Poseen varios grupos hidroxilo (-OH) unidos a su estructura y frecuentemente se encuentran glicosilados en la posición 3 y menos frecuentemente en la posición 7 (fig 1.2). Existen en la naturaleza varios flavonoides diglicosilados, tales como hesperidina y rutina que tienen en común el disácarido rutinosa, formado por los carbohidratos glucosa y ramnosa, diferenciándose en la posición en la que se encuentran diglicosilados. Rutina se encuentra diglicosilada en la posición 3 y hesperidina en la posición 7. El esqueleto carbonado puede estar modificado, y es la porción del flavonoide que se denomina aglicona. Los glicósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales libres que su aglicona. En vista a los múltiples grupos funcionales y estereocentros presentes en los flavonoides, las enzimas representan catalizadores ideales para las reacciones estéreo- y regioselectivas (van Rantwijk *et al.*, 1999; Giffhorn *et al.*, 2000).

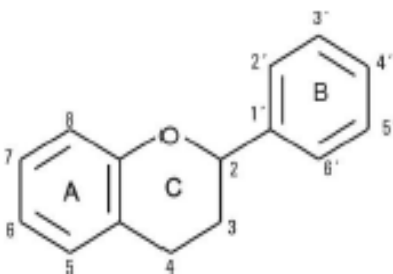


Fig 1.2: Estructura molecular del 2-fenil-1,4-benzo pirano, esqueleto común de los flavonoides.

1.3 Glicosil hidrolasas de flavonoides

Las glicosidasas (EC 3.2.1) son un grupo de enzimas que hidrolizan el enlace glicosídico

entre dos o más carbohidratos, o bien el enlace entre un carbohidrato y un residuo de otra naturaleza (terpenos, flavononas, etc.) (Günata *et al.*, 1998; Ogawa *et al.*, 1997). La hidrólisis enzimática del enlace glicosídico tiene lugar mediante una hidrólisis ácido-base. Estas enzimas son capaces de desglicosilar flavonoides, a través de dos mecanismos, el más común es donde intervienen las monoglicosidasas que reconocen e hidrolizan monosacáridos, liberando los residuos sacarídicos en forma secuencial (Fig 1.3) (Sarry&Guanata, 2004). El segundo mecanismo involucra diglicosidasas, que realizan la desglicosilación en un solo paso dado que catalizan la ruptura de la unión heterosídica (Fig 1.3.1) (Günata *et al.*, 1998; Ogawa *et al.*, 1997).

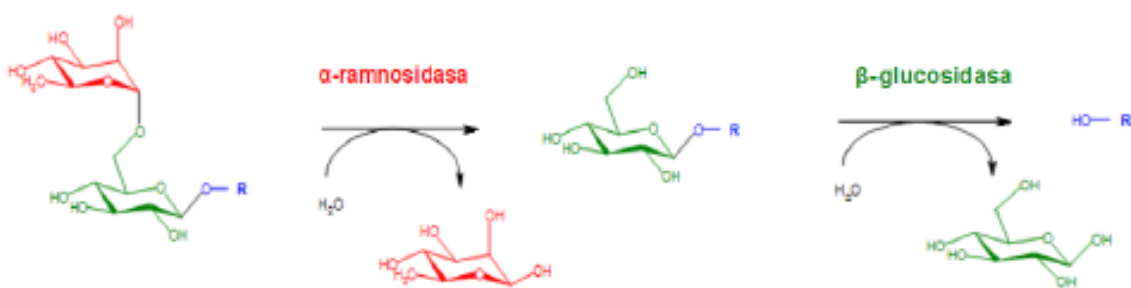


Fig 1.3 Hidrólisis secuencial de metabolitos secundarios de vegetales diglicosilados.

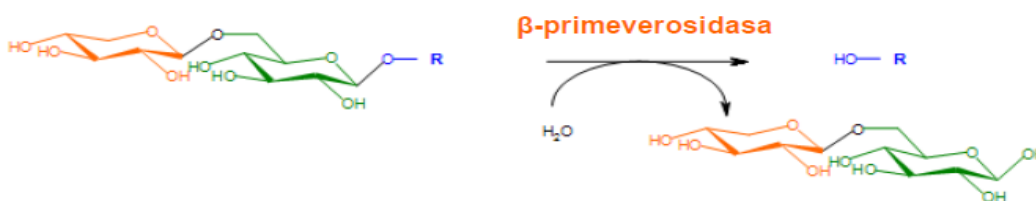


Fig 1.3.1. Desglicosilación de primeverósidos por una diglicosidasa.

OBJETIVOS:

Evaluación de la desglicosilación de flavonoides en medios no convencionales.

2- MATERIALES Y METÓDOS

2.1 Producción de biocatalizadores

El hongo *Acremonium* sp. DSM 24697 aislado en el laboratorio de Biocatálisis-UNLPam (Mazzaferro et al., 2010) se cultivó en 20 ml de medio Luria-Bertani (LB), composición (g/l): 10.0 peptona de leche, 5.0 extracto de levadura y 100 mM buffer fosfato de sodio pH 5. Los cultivos se realizaron a 28 °C en agitador rotatorio (150 rpm) durante 2 días.

Los cultivos sumergidos se realizaron en un fermentador (200 ml, 170 ml de volumen de trabajo, 250 rpm y aireación de 0.4 vvm) a 25°C usando el siguiente medio de cultivo (g/l): 2.5 rutina o hesperidina, 1.0 peptona de leche, 2.0 extracto de levadura y 30 mM de buffer fosfato de sodio. El pH se mantuvo constante (pH 5.0) mediante agregado automatizado de 0.5 M H₂SO₄ o 1M NaOH. El caldo de cultivo se liofilizó y conservó a -18°C para su posterior procesamiento.

2.2 Síntesis y caracterización de solventes altamente eutécticos

Colina: urea: relación molar (1:2), con paleta de agitación 40 rpm a 90 °C por 1 hora.

Colina: glicerol: relación Molar (1:2) sin agitación a 70°C por 30 minutos.

Colina: etilenglicol relación Molar (1:2) sin agitación, sumergido 1 minuto a 80°C

Para la caracterización de los diferentes DES se evaluó sus propiedades físico-químicas: su conductividad ($\mu\Omega/\text{cm}$) y su miscibilidad en relación 1:1 con diferentes solventes (agua, etanol, propanol, acetona, acetato de etilo, tolueno y hexano).

2.3 Actividad α -ramnosil- β -glucosidasa

La reacción se realizó en diferentes líquidos iónicos: colina: urea, colina: glicerol y colina:

etilenglicol y en los solventes que los componen (glicerol y etilenglicol). La mezcla de reacción (1000 μ l) contenía: 950 μ l de hesperidina 1.8 mM y 50 μ l del catalizador. Las soluciones del sustrato que contenían LI se estabilizaron a pH 6.0. La reacción se llevó a cabo durante 1 h a 60°C y los productos se identificaron mediante Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC). Una Unidad Enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μ mol de hesperetina por minuto. La curva de calibrado de hesperetina se realizó utilizando una solución patrón que contenía 1.8 mM de la aglicona en el DES colina: urea. Alícuotas de la misma fueron diluidas en la fase móvil metanol: agua (70:30) y las áreas de los picos de hesperetina (tiempo de retención \approx 10 min) se graficaron en función de la concentración (Fig 2.3).

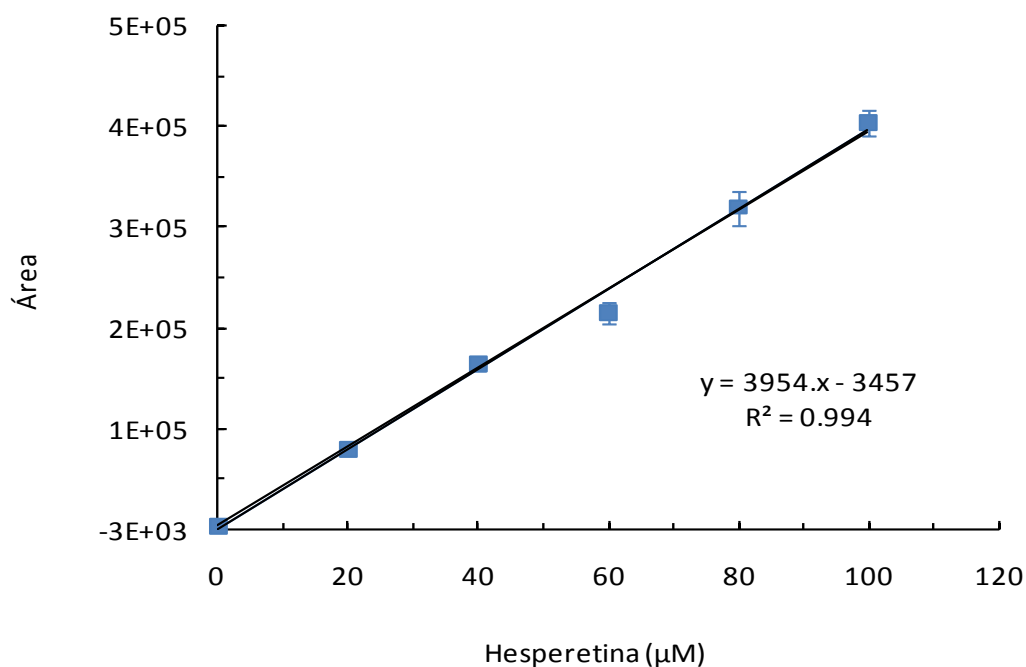


Figura 2.3 Recta de calibrado de hesperetina disuelta en el DES colina: urea

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Síntesis y caracterización de los solventes altamente eutécticos (DES)

Los diferentes DES se sintetizaron mediante una relación molar 1:2 del catión colina – y los aniones urea, etilenglicol y glicerol (Maugeriet.al., 2013). Para la síntesis del solvente colina: urea, se agitó la mezcla durante 1 h a 90 °C para romper los fuertes enlaces que mantienen a estas sustancias en estado sólido y de esa forma generar puentes hidrógeno de tal manera que el DES formado es líquido y permanece en este estado a temperatura ambiente. En el caso de los DES formados por colina:etilenglicol y colina:glicerol, los polialcoholes que conforman el anión se encuentran en estado líquido a temperatura ambiente porque sus fuerzas cohesivas son más débiles que las de urea, por lo tanto el tiempo de agitación y las temperaturas utilizadas fueron menores 1 min y 30 min a 80°C y 70°C respectivamente. En la Fig 3.1 se pueden observar imágenes de los DES formados.

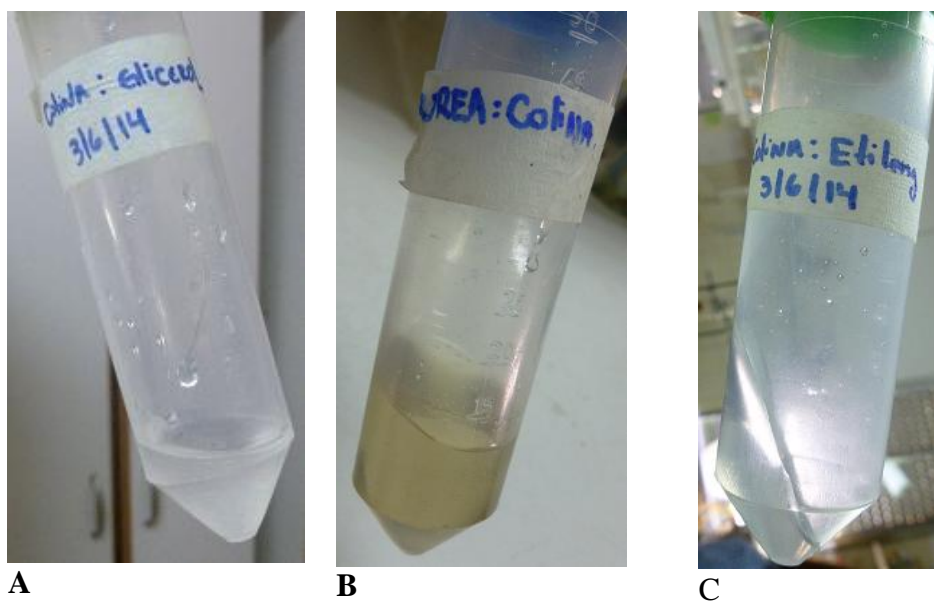


Figura 3.1. (A)- DES colina:glicerol (B) DES colina:urea (C) DES colina: etilenglicol.

La capacidad de los DES de mantenerse como un líquido a temperatura ambiente se debe a que son sales formadas por iones de gran tamaño y asimétricos, por lo que las fuerzas atractivas catión-anión son más débiles que las fuerzas que intervienen en las sales iónicas convencionales (sales fundidas). Al partir de dos iones poco uniformes y uno de ellos, el catión orgánico, asimétrico no puede lograrse un empaquetamiento que dé lugar a una estructura compacta. Basta un aporte energético para separar los aniones y los cationes que configuran el sólido y transformarlo en un líquido (Salvador Romero, 2008). Estos LI presentaron una viscosidad alta, siendo el de mayor viscosidad colina: urea (Yuntao D. *et al.* 2010). Las propiedades físico-químicas de los DES se describen en las tablas 3.1 y 3.2.

DES	Conductividad ($\mu\Omega/\text{cm}$). 10^3
Glicerol	ND
Etilenglicol	ND
Colina: glicerol	0.82
Colina: urea	0.86
Colina: etilenglicol	6

Tabla 3.1 Conductividad eléctrica de los distintos DES. ND: no detectada.

Los componentes de los DES no presentan conductividad eléctrica, sin embargo las sales que se forma con colina mostraron conductividad. El DES compuesto por colina: etilenglicol posee la mayor conductividad, por encima de sus pares colina: urea y colina: glicerol. Estos LI tienen menos conductividad que las disoluciones acuosas concentradas de electrolitos, lo que puede atribuirse a los grandes tamaños de los iones, que limitan la

movilidad de las cargas (Boronat *et al.*, 2010).

Dado que la polaridad es una propiedad físico-química que está directamente relacionada con la solubilidad, se evaluó la miscibilidad de los líquidos iónicos en diferentes solventes para proporcionar información respecto a la interacción que pudieran tener con la enzima y su influencia en la actividad de la misma (Tabla 3.2).

Solvente	C:G	C:E	C:U	Glicerol	Etilenglicol	Urea	Colina
Agua	M	M	M	M	M	M	M
Etanol	M	M	M	M	M	I	M
Propanol	M	M	I	M	M	I(P)	I
Tolueno	M	I	M	I	I	I(P)	I
Acetona	I	I	I	I	M	I(P)	I
Hexano	I	I	I	I	I	I(P)	I
Acetato de Etilo	I	I	I	I	I	I(P)	I

Tabla 3.2: Miscibilidad de los DES y sus constituyentes en diferentes solventes orgánicos. C:G: colina:glicerol, C:E: colina: etilenglicol, C:U: colina: urea. M: miscible, I: inmisible (formación de dos fases), I(P): precipitado.

La capacidad que tenga cada anión componente del DES de generar enlaces puente de hidrógeno con el solvente determina la solubilidad de estos en diversos medios (Boronat *et al.*, 2010). Los DES y sus componentes fueron miscibles en agua y etanol mientras que

en los solventes hexano y acetato de etilo ninguna especie fue soluble. Ahora bien, las conductas de miscibilidad e inmiscibilidad en los tres solventes restantes presentan una correlación compleja. En el caso del propanol la inmiscibilidad de la urea justificaría el mismo comportamiento en el DES colina:urea, mientras que la inmiscibilidad de colina en acetona podría explicar esta misma conducta en todos los DES. Ahora bien, en el caso del tolueno al ser un solvente de baja polaridad con un momento dipolar de 0.36 D todos los componentes por separado son inmiscibles. Sin embargo los DES colina:glicerol y colina:urea son solubles, esto se podría explicar por la capacidad de los electrones π del tolueno para formar puentes de hidrógeno de baja energía (-10 KJ/mol comparado con los puentes de H clásicos de -30 KJ/mol) (Brinkley & Gupta, 2001). Mientras que la inmiscibilidad del DES colina:etilenglicol podría deberse a la elevada conductividad que presenta este LI (tabla 3.1).

3.2. Solubilidad de los sustratos en los solventes altamente eutécticos

Al disponer de un importante número de aniones y de cationes para diseñar los líquidos iónicos permiten lograr combinaciones apropiadas para las condiciones de una determinada aplicación. Así se dispone de un componente responsable del comportamiento químico (el catión) y el anión que aporta la mayor parte de las propiedades físicas (Salvador Romero, 2008). Los DES por su naturaleza química poseen capacidad de solubilizar sustancias orgánicas e inorgánicas. Entre los compuestos orgánicos de baja solubilidad en solventes polares que encuentran en estos líquidos un medio iónico capaz de solubilizarlos, encontramos a los flavonoides (Yuntao Dai *et. al.* 2012). Las imágenes muestran la solubilidad de dos flavonoides hesperidina y rutina en

diferentes solventes (fig. 3.2)



Fig. 3.2. Imágenes de soluciones y suspensiones de los sustratos hesperidina y rutina en diferentes solventes. Rutina 82 mM en: A) DES colina:urea; B) agua. Hesperidina 180 mM en: C) 5 mM fosfato de sodio pH6.0; D) DES colina: urea

La rutina fue soluble en altas concentraciones (82 mM) en el DES colina:urea, mientras que concentraciones 10 veces menores en agua este flavonoide sigue siendo insoluble. Sin embargo si bien el sustrato estaba más accesible (soluble) para el catalizador 3-*O*-rutinosidasa de *Acremonium* sp., en el líquido iónico la actividad enzimática no pudo ser detectada, incluso cuando la mezcla de reacción contenía 30%v/v de buffer citrato de sodio 50mM. Estos resultados nos sugieren que la alta concentración de urea y la concentración de agua insuficiente produjeron un efecto deletéreo para el catalizador.

Por otro lado, la solubilidad de hesperidina se evaluó en los DES de colina con glicerol, etilenglicol y urea. Si bien hesperidina presenta una baja solubilidad en agua (0.324 mM descrita por Mauludin & Müller, 2008) en los DES este flavonoide mostró una tendencia a ser más soluble que en los solventes constituyentes (Fig 3.2.1). Por esta razón, se decidió evaluar el catalizador de *Acremonium* sp. específico para hesperidina, 6-*O*- α -ramnosil- β -glucosidasa, el cual hidroliza los flavonoides 7-*O*-rutinosilados, pero además tiene la

capacidad de transferir el disacárido rutinosa sobre aceptores que contengan hidroxilos primarios, secundarios o fenólicos (Mazzaferro et al. 2012)

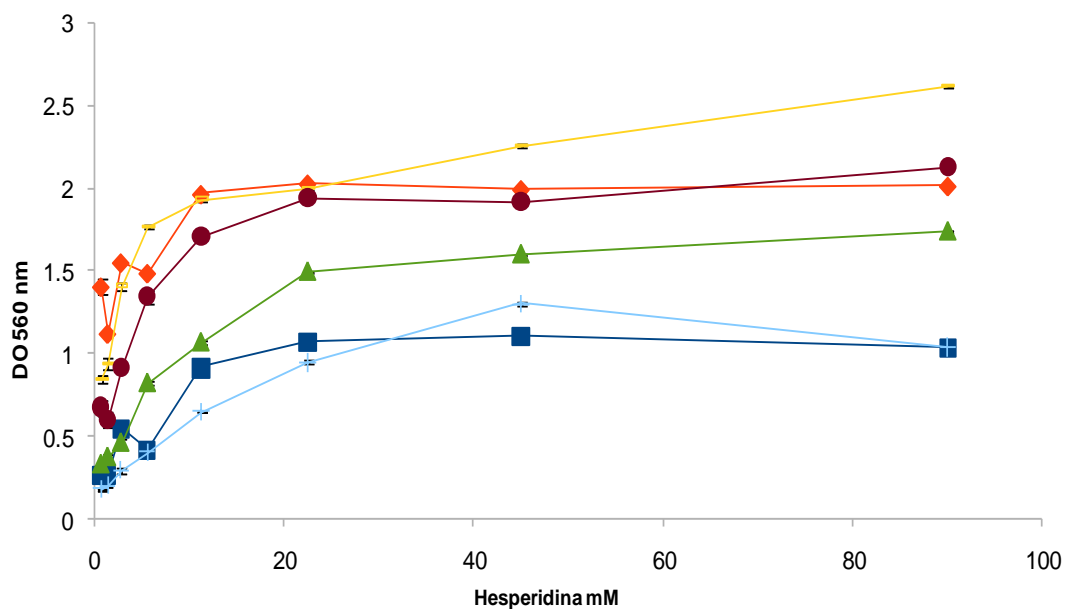


Fig.3.2.1. Densidad óptica de las soluciones-suspensiones de hesperidina en los diferentes solventes: Colina:(●) colina:glicerol; (■) colina:urea; (▲)colina:etilenglicol; (●) Etilenglicol; (◆)Glicerol; (▲) Agua.

3.3. 6-O- α -ramnosil- β -glucosidasa en solventes altamente eutécticos

En la caracterización de la enzima 6-O- α -ramnosil- β -glucosidasa, hesperidina fue descrito como el sustrato que presentó mayor afinidad. Si bien la solubilidad de hesperidina en agua es baja respecto a la chalcona de hesperidina (>300 mM) la afinidad por el sustrato insoluble fue 5 veces mayor (Mazzaferro et al., 2010) (Fig 3.3). Una pregunta difícil de resolver, es saber si la velocidad de disolución del sustrato es lo suficientemente rápida para evitar la catálisis heterogénea o es de hecho una catálisis heterogénea.

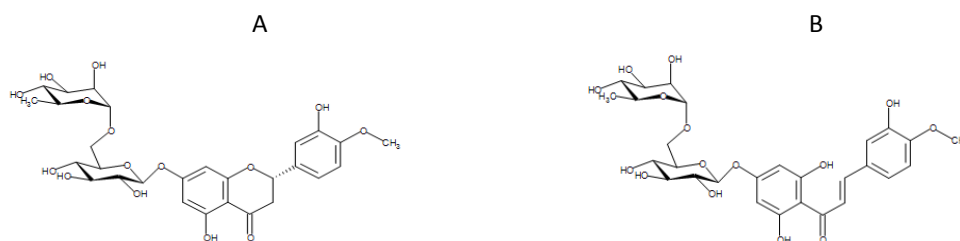


Fig. 3. 3 Estructuras de A) Hesperidina y B) Hesperidina metil chalcona

La actividad de la enzima – medida con el sustrato hesperidina–en presencia de diferentes concentraciones de los DES de colina se muestra en la figura 3.3.1. Si bien en ningún caso este catalizador mostró actividad en la solución formada íntegramente por los solventes altamente eutécticos de colina, las diferencias encontradas en los perfiles de actividad claramente responden al anión utilizado. El catalizador deja de ser activo en concentraciones de DES >40, 60 y 80 %v/v para urea, etilenglicol y glicerol respectivamente. La necesidad de un requerimiento mínimo o crítico de agua para mantener su estructura activa está demostrada (Hernández, 2008).

Al igual que la enzima 3-*O*-rutinosidasa el DES colina:urea fue deletéreo para este catalizador, sin poder detectar actividad en concentraciones mayores al 40% v/v del LI. Esto puede deberse a que la urea es un conocido agente desnaturizante de proteínas y que la alta concentración de la misma en el DES induciría el desplegamiento del catalizador (Maugeri et. al. 2013, Lindberget .al, 2010).

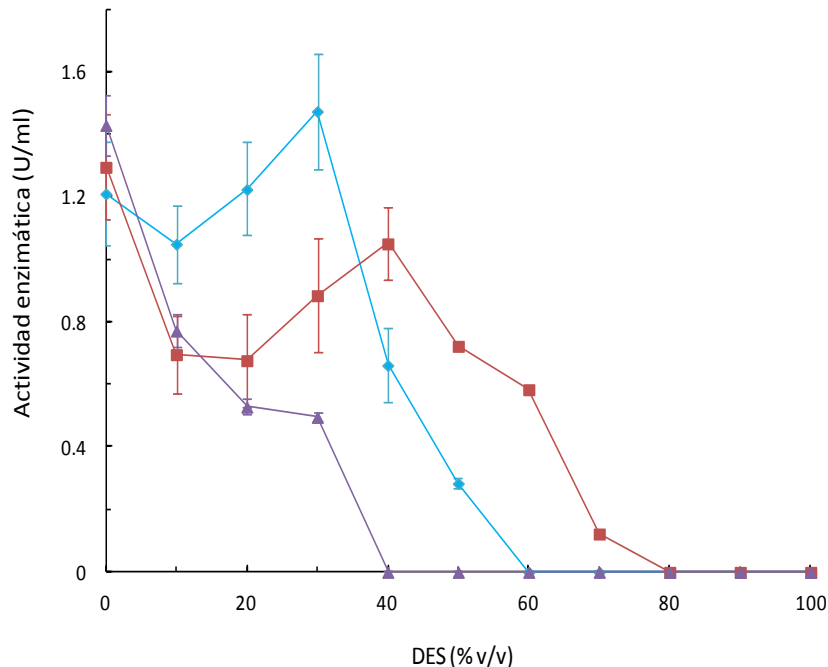


Figura 3.3.1: Efecto de la concentración de los DES sobre la actividad α -ramnosil- β -glucosidasa:(▲) colina:urea;(■) colina:glicerol;(▲) colina:etilenglicol.

Si bien esperábamos un incremento de la actividad dado por la mayor concentración de sustrato soluble, los DES no mostraron un aumento significativo en ninguna de las concentraciones ensayadas. Dado que los 2 líquidos iónicos que mostraron resultados más promisorios están formados por aniones solubles en agua, se realizaron los ensayos de actividad en presencia de concentraciones crecientes de los aniones constituyentes de los mismos (Fig 3.3.2.).

Las actividades enzimáticas se ven influenciadas por la viscosidad del medio de reacción, dado que limita la transferencia de masa dependiendo principalmente de la naturaleza del anión (Lindberg *et al.* 2010, Hua Zhao. *et al.* 2011, Tavares *et al.* 2013). En este trabajo, los DES presentan valores significativamente menores al de los aniones constituyentes, por lo tanto podemos decir que esta variable no explica los perfiles de actividad encontrados con

los líquidos iónicos, dado que las soluciones de sus respectivos aniones mostraron actividades superiores.

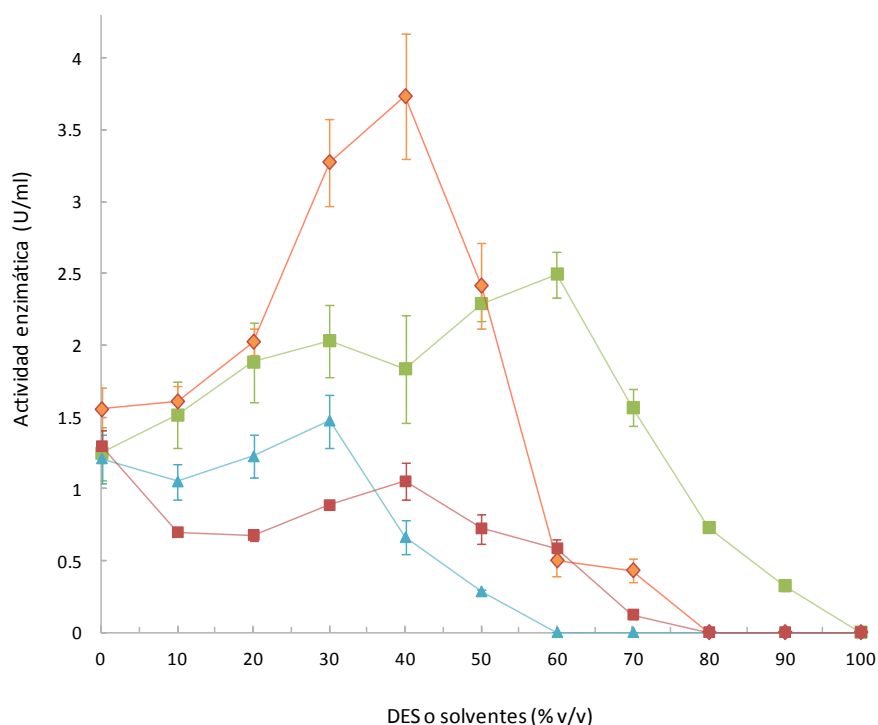


Figura 3.3.2: Actividad enzimática de α -ramnosil- β -glucosidasa en:(■) Colina:Glicerol;(▲) colina:etilenglicol;(■)Etilenglicol;(◆) Glicerol

Ambos solventes mostraron valores de actividad superiores a los encontrados con el sistema acuoso, esta diferencia podría explicarse si estos aditivos fuesen aceptores y la producción de hesperetina fuese la sumatoria de la actividad hidrolítica más la de transglucosilación. Sin embargo, esta última actividad no pudo ser detectada cuando se analizaron los productos de reacción y en caso de ocurrir tendría que ser significativa para poder explicar el incremento de ≈ 2.5 y 4 veces la actividad en presencia de 60% v/v etilenglicol y 40% v/v glicerol respectivamente.

Una explicación a este fenómeno podría ser el incremento de la solubilidad del sustrato en estos medios de reacción. El efecto termoestabilizante de los polialcoholes podría también favorecer el incremento de la actividad enzimática porque estos son excluidos preferencialmente de la superficie de la proteína (Kunihiko.et.al. 1981, Anderssonet. *al.* 2000). Este mecanismo podría verse alterado por la presencia de colina y explicar el efecto deletéreo de los DES en ambos casos. Sugiriendo que colina podría interaccionar con el sustrato (hesperidina) a través de enlaces puente hidrógeno, provocando una disminución de la actividad enzimática.

Por otro lado el glicerol por su naturaleza atóxica, abundante y por su bajo costo dado que se obtiene como subproducto en la elaboración de biodiesel, podría ser una nueva e interesante alternativa para su uso en biocatálisis.

4. CONCLUSIONES:

La solubilidad de los flavonoides (hesperidina y rutina) fue mayor en los DES que en agua.

La actividad enzimática α -ramnosil- β -glucosidasa disminuyó en presencia de los líquidos iónicos de tercera generación.

El glicerol, o eventualmente etilenglicol, pueden ser utilizados como aditivos para incrementar la actividad enzimática de α -ramnosil- β -glucosidasa.

5. Referencias

Andersson MM, Breccia JD, Hatti-Kaul R. **2000**. Stabilizing effect of chemical additives against oxidation of lactate dehydrogenase. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 32: 145–153.

Boronat, M., Climent, M.J., Corma, A., Iborra, S., Montón, R., Sabater, M.J. **2010**. Bifunctional acid-base ionic liquid organocatalysts with a controlled distance between acid and base sites *Chemistry - A European Journal* 16: 1221-1231.

Brinkley R.L., Gupta R.B. **2001**. Hydrogen bonding with aromatic rings. *AIChE Journal* 47: 948–953

Cortés E, Dondero A., Aros H. & Carlesi, C. **2009**. Síntesis del Líquido Iónico bmin HSO₄ mediante una sola Etapa, para Aplicaciones en Hidrometalurgia. *Vol. 21(3), 67-76 (2010)*
doi:10.1612/inf.tecnol.4272bit.09

Díaz-Álvarez A., Pascale, J.F, Cadierno C. & V. **2014**. Recent Advances in the Use of Glycerol as Green Solvent for Synthetic Organic Chemistry. *Span.*

Dominquez de María.P. **2012**. Ionic liquid in biotransformations and organocatalysis: Solvents and beyond. John Wiley & Sons Inc, Hoboken. (Nueva Jersey, EE.UU.)

GalondeN.,Nott K., Debuigne A., Deleu M. ,Jerome C., Paquotb M. & Watheleta J.P.**2012**. Use of ionic liquids for biocatalytic synthesis of sugar derivatives. (Gembloux, Belgium)

Gekkot K., Timasheff S. N. **1981**. Mechanism of Protein Stabilization by Glycerol: Preferential Hydration in Glycerol-Water Mixtures. Massachusetts and Japan.

Hernández Fernández. FJ. **2008**. Desarrollo de nuevos procesos biotecnológicos basados en el uso de líquidos iónicos, fluidos supercriticos y tecnología de membrana. España.

Lindberg D., De la Fuente Revenga M., Widersten M. Deep eutectic solvents (DESs) are viable cosolvents for enzyme-catalyzed epoxide hydrolysis. **2010**. Volume 147, Issues 3–4, Pages 169–171.

Martearena M.R. **2007**. Estudios de síntesis enzimática de ramnósidos y oligosacáridos catalizadas por α -L-ramnosidasas. Universidad Nacional de Salta.

Maugeri Z., Leitner W., & Domínguez de María P. **2013**. Chymotrypsin-Catalyzed peptide synthesis in deep eutectic solvents. Germany.

Maugeri, Z., Domínguez de María, P. **2012**. "Novel choline-chloride-based deep-eutectic solvents with renewable hydrogen bond donors: Levulinic acid and sugar-based polyols". RSC Advances. 2012, 2, 421-425

Mauludin R, Müller RH. **2008**. Hesperidin smart crystals: redispersibility and improved solubility properties. Pharmacogenetics / Pharmacogenomics Virtual J (<http://www.aapsj.org>) 10:S2

Mazzaferro LS, Piñuel L, Erra-Balsells R, Giudicessi SL, Breccia JD. **2012**. Transglycosylation specificity of *Acremonium* sp. α -rhamnosyl- β -glucosidase and its application to the synthesis of the new fluorogenic substrate 4-methylumbelliferyl-rutinoside. Carbohydrate research 347: 69-75.

Mu. N., Zied A., Abbul B.K, Maroof A. **2012**. Effect of ionic liquid on activity, stability, and structure of enzymes: A review. India.

Rojas, N.L. **2009**. Enzimas fúngicas extremófilas de aplicación biotecnológica: Producción y

caracterización de Ramnosidasas alcalofílicas de *Acremonium murorum* y *Acrostalagmus luteo-albus* y poligalacturonasaacidofílica de *Aspergillus kawachii*. *Universidad Nacional de La Plata*.

Salvador R.A. **2008**. Líquidos iónicos a temperatura ambiente: Un nuevo medio para las reacciones químicas. *Rev. R. Acad.Cienc. Exact. Fís .Nat. (Esp) Vol. 102, Nº. 1, pp 79-90*

Vidal Vides C. Juarez F., Garcia Alvarez J. **2014**. Deep eutectic solvents (DES) as green reaction media for the redox isomerization of allylic alcohols into carbonyl compounds catalyzed by the ruthenium complex $[\text{Ru}(\eta^3:\eta^3\text{-C}_{10}\text{H}_{16})\text{Cl}_2(\text{benzimidazole})]$. Volume 44, Pages 76–79.

Tavares A., Rodríguez O. & Macedo E. A. **2013**. New Generations of Ionic Liquids Applied to Enzymatic Biocatalysis.

Wasserscheid, P&Welton,T. **2002**. Ionic Liquids in Synthesis. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA. ISBNs: 3-527-30515-7 (Hardback); 3-527-60070-1 (Electronic)*

Yuntao D., Jaap van Spronsen, Geert-Jan W., Verpoor R., Young HaeC. **2013**. Natural deep eutectic solvents as new potencial media for green technology. *Analytica Chimica Acta 766 (2013) 61– 68*.

Zhao H., Baker G.A., Holmes S. **2011**. Protease activation in glycerol-based deep eutectic solvents. USA.