

OBTENCIÓN DE GALATO DE n-PROPILO MEDIANTE TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA CON TANINO, PROPANOL Y TANASA INMOVILIZADA EN QUITINA

Alicia Castillo A., Karina Acuache Q., Antonio Osorio L., César Fuertes R.*

RESUMEN

El galato de n-propilo es un antioxidante para alimentos, aceites y emulsiones; el estudio se realizó teniendo como objetivo sintetizar galato de n-propilo utilizando un sistema formado por ácido tánico, tanasa inmovilizada en quitina y alcohol n-propílico. El método utilizado consiste en una transesterificación enzimática con tanasa que fue inmovilizada en quitina mediante el agente enlazante glutaraldehído; la quitina fue obtenida de las cubiertas de *Cancer setosus* (cangrejo). El tanino aportó el ácido gálico esterificado y desplazado a favor del galato de n-propilo con alcohol n-propílico. El rendimiento de inmovilización fue de 70%, mientras que el producto final alcanzó 74% de rendimiento, determinado por espectrofotometría UV y cromatografía líquida de alta performance (HPLC)

Palabras clave: galato de n-propilo, tanino, tanasa inmovilizada, transesterificación enzimática, quitina, cromatograma HPLC

OBTAINING n-PROPYL GALLATE THROUGH ENZYME TRANSESTERIFICATION WITH TANNIN; PROPANOL AND TANASE IMMOBILIZED IN QUITINE

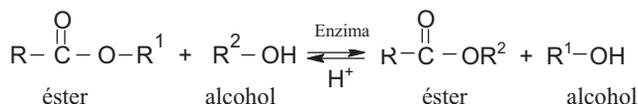
ABSTRACT

The n-propyl gallate is an antioxidant for food, oils and emulsions. The study were carried out to synthesize n-propyl gallate using a system made up of tannic acid, tannase immobilized in quitine and n-propylic alcohol. The method consists of an enzyme transesterification, which tannase that was immobilized with quitine through glutaraldehyde linking agent, quitine was obtained from the decks of *Cancer setosus* (crab). The tannic acid contributed with esterified gallic acid and shifted in favour of npropyl gallate with n-propanol alcohol. The performance of detention was 70%, while the final product reached 74% of yield, determined by UV-spectrophotometry and high-performance liquid chromatography (HPLC).

Key words: propyl gallate, tannic acid, immobilized tannase, enzyme transesterification, quitine, HPLC chromatography.

INTRODUCCIÓN

La transesterificación es una reacción catalizada por ácidos, bases o enzimas; se realiza por la reacción de los alcoholes sobre un éster; la transesterificación enzimática se produce de manera similar a la transesterificación química formando un equilibrio, aunque el mecanismo implica diferente interacción molecular.¹



* Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara"
Facultad de Farmacia y Bioquímica - Universidad Nacional Mayor de San Marcos

El tanino hidrolizable, también denominado ácido tánico, está formado por unidades de α -D-glucopiranososa esterificada en todos los oxhidrilos, por ácido gálico. El galato de D-glucopiranososa constituye una fuente importante para llevar a cabo las transesterificación enzimática. Estos taninos se encuentran distribuidos en las especies vegetales de los géneros *Quercus* y *Caesalpinia*².

La enzima tanin acil-hidrolasa (E.C. 3.1. 1.20) es comúnmente conocida con el nombre de tanasa; es una esterasa responsable de la hidrólisis de enlaces tipo éster galoil de un alcohol, y enlace tipo pépsido galoil éster de ácido gálico³.

La tanasa puede ser obtenida a partir de fuentes vegetales, animales y de los microorganismos; la fuente microbiológica es la más importante para la obtención de tanasa. (tabla 1)⁴.

Tabla 1. Microorganismos utilizados para la producción de tanasa

Bacterias	Hongos
<i>Bacillus pumillas</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Bacillus polymyxa</i>	<i>Aspergillus ficuum</i>
<i>Coryne_bacteriun Spp</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Aspergillus japonicus</i>
<i>Streptococcus bovis</i>	<i>Aspergillus gallonyces</i>
<i>Selenomonas ruminantium</i>	<i>Aspergillus awamori</i>
Levaduras	<i>Penicillium chrysogenum</i>
<i>Candida spp</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Trichoderma viride</i>
<i>Mycotorula japonica</i>	<i>Fusarium solana</i>

Inmovilización de enzimas

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza una enzima de una región definida (soporte sólido), con la finalidad de poder reutilizarla en forma repetida.⁵⁻⁶

Las enzimas inmovilizadas son más robustas, más resistentes que las enzimas en solución, estables a los cambios ambientales y mantiene la estereoquímica de su estructura química.

La enzima se puede inmovilizar por una variedad de métodos, entre los que se encuentran los métodos físicos y los métodos químicos; éstos se clasifican según el tipo de unión covalente, entre cruzamiento y co-entrecruzamiento con sustancias neutras.

Hasta la fecha, diversos procesos basados en enzimas inmovilizadas son económicos y han sido implementados a gran escala, principalmente en el sector alimenticio, y en la fabricación de químicos finos y farmacéuticos.

Las características de las enzimas inmovilizadas son gobernadas por las propiedades de la enzima y del material del soporte. La interacción entre estos dos aspectos genera en la enzima inmovilizada las propiedades fisicoquímicas y cinéticas específicas que pueden ser decisivas para su uso práctico, y así, un soporte elegido a juicio, puede realizar perceptiblemente el funcionamiento operacional del sistema inmovilizado⁷

Los soportes para el uso alimenticio, farmacéutico, médico y agrícola deben carecer de toxicidad; debe ser biodegradable, biocompatible y económico; la quitina es un soporte que reúne las propiedades señaladas.

La quitina es un polisacárido aminoacetilado, formada por unidades β -D-glucosamina, unidas por enlaces β 1 – 4 (figura 1). En la naturaleza se encuentra distribuida en los caparazones de los crustáceos, en las bacterias y especies vegetales.

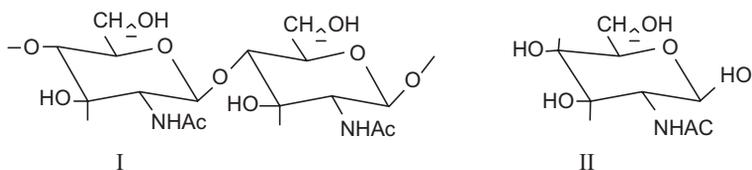


Figura 1. Estructura de quitina (I) y de D-glucosamina N-acetilada (II)

Para ligar la enzima con el soporte, se usa diferentes agentes ligantes, entre los cuales es muy usado el glutaraldehído; éste, por tener dos grupos carbonilos en los extremos forma una base de Schiff tanto con el grupo terminal de la enzima así como con el grupo amino desacetilado de la quitina⁵ (figura 2)

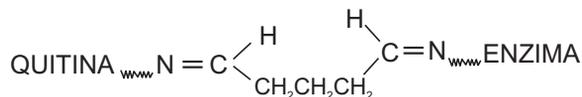


Figura 2. Representación de una enzima inmovilizada con quitina, usando como agente ligante el glutaraldehído y como soporte la quitina.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales y métodos

Las lecturas espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro UV - visible Genesys 20 ThermoSpectromic

La concentración del producto final se determinó en un equipo de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) Lachron Elite 1, con una columna Merck Lichrospher RP-18, 12,5 cm x 4mm, tamaño de partícula 5µm.

El agitador y el baño de circulación fueron construidos por Matricería Moldes Mac EIRL.

La quitina se aisló de los caparazones de *Cancer setosus* (cangrejo peludo) por el método reportado por Peniche⁹

Inmovilización de la tanasa

La tanasa liofilizada (100 mg) fue disuelta en una solución buffer (citrato 100 mM, pH 5,5), hasta alcanzar una concentración de 2mg/mL de tanasa la solución de enzimática (45 mL) sobre el soporte activado, la mezcla se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente y a una velocidad de 100 rpm.

La mezcla se pasó a través de una malla de 200 mesh. El catalizador se lavó de manera sucesiva con una solución de cloruro de sodio 2M (50 mL), buffer acetato 0,015M pH6 (75mL) y solución de cloruro de sodio 2M (50mL). El volumen total de lavados se midió en una probeta.

El catalizador preparado se almacenó en una solución de cloruro de sodio 0,9% (30mL) a 4°C

Síntesis enzimática de galato de n-propilo

En un matraz aforado de 50mL se colocó ácido tánico (53mg), se disolvió con una solución de 1-propanol agua (99: 1%), llevando a una concentración final de 0,62mM; 1-propanol;

seguidamente se puso en contacto con el catalizador; la mezcla se colocó en un agitador por 3 horas a 55°C a una velocidad constante de 100 rpm.

La solución resultante se pasó a través de una malla de 200 mesh; el catalizador fue lavado con agua destilada y almacenado a 4°C con 30mL de solución fisiológica de cloruro de sodio al 0,9%.

El producto obtenido fue analizado espectrofotométricamente y por HPLC

Metodología de análisis

La determinación de proteína enlazada fue llevada a cabo por el método de Bradford^{11,12}; este método utiliza el reactivo azul brillante de Coomassie G-250, como reactivo cromógeno.

La concentración de galato de n-propilo sintetizado se determinó mediante una curva de calibración para concentraciones 4µg/mL, 8µg/mL, 12µg/mL y 16µg/mL. Las absorbancias fueron medidas en el espectrofotómetro a 273 nm¹³

Un segundo método para medir la concentración de galato de n-propilo, se hizo utilizando la cromatografía líquida de alta performance (HPLC)^{14,15}, según las condiciones siguientes:

- Fase móvil ácido acético - metanol - agua (1,01:35:65 v/v)
- Detector espectrofotómetro UV, 273 nm
- Tiempo de desarrollo: 30 minutos
- Volumen de inyección: 20µL
- Standard: se tomó 0,049mg/mL de galato de n-propilo (98% de pureza)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para encontrar la concentración de proteínas en la enzima inmovilizada se usó la siguiente fórmula

Donde: $[St] = (\text{cons St}) \times fd$
 ConcSt = Concentración de proteínas estándar inicial
 St = Concentración de proteínas estándar diluida
 fd = factor de dilución

Concentración de enzima inmovilizada 70,35%

Concentración de galato de n-propilo

Por el método espectrofotométrico, se usó galato de n-propilo estándar para preparar la curva de calibración. (tabla 2).

Tabla 2. Concentración de galato de n-propilo y sus correspondientes absorbancias

Conc. de la muestra µg/mL	Lectura corregida Abs
4	0,2070
8	0,4131
12	0,5826
16	0,7769

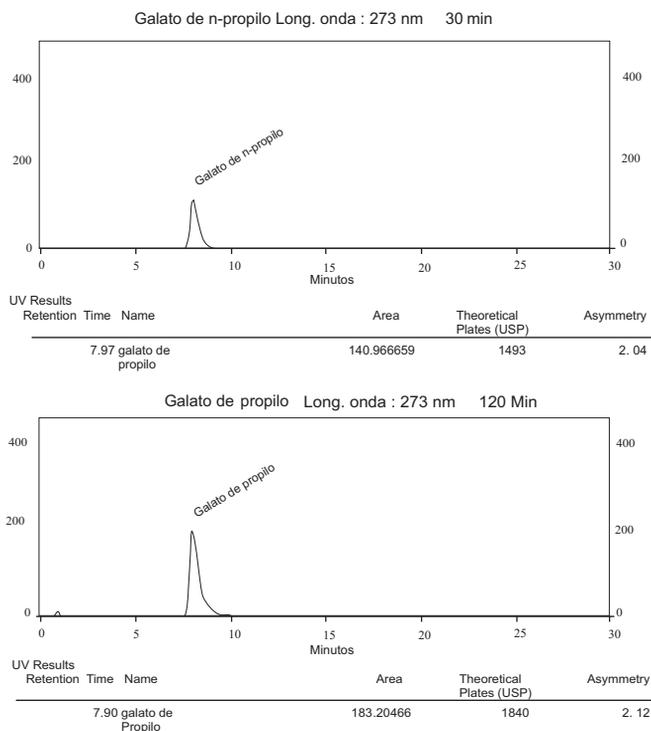
La concentración de galato de n-propilo obtenida a diferentes tiempos de reacción se observa en la tabla 3; valores similares fueron obtenidos hasta en tres repeticiones.

Tabla 3. Porcentaje de galato de propilo obtenidos a diferentes tiempos de reacción

Tiempo en minutos	mmol	% de Producción de galato de propilo
30	0,191	61,02
60	0,209	66,77
90	0,218	69,65
120	0,244	77,96

Método por HPLC, evolución de la síntesis enzimática

En la figura 3 se aprecia el tiempo de retención (TR) del galato de n-propilo y en la tabla 4 el porcentaje de producción de galato de n-propilo. La evolución de la síntesis enzimática fue seguida por HPLC, alcanzando un máximo rendimiento a los 120 minutos.

**Figura 3.** Cromatogramas HPLC de la transesterificación a los 30 y 120 minutos.

La estrategia de utilizar insumos de origen natural, como la quitina, ha tenido resultados significativos; se ha logrado inmovilizar a la tanasa con un rendimiento de 70%.; la inmovilización se produce con el ligante “ambidentado” glutaraldehído, que con los grupos aminos de la tanasa y los grupos aminos libres de la quitina, forma una doble base de Schiff. Estos resultados son superiores a los reportados por Abdel-Naby y col¹⁶ que inmoviliza la tanasa de *Aspergillus oryzae*, obteniendo un rendimiento de 40%.

La inmovilización se realiza bajo los conceptos teóricos de las bases de Schiff; la reacción es tan suave que permite conservar las propiedades esteroquímicas tanto de la quitina como de la tanasa, y en consecuencia, la efectividad del catalizador.

En cuanto a la síntesis de galato de n-propilo, ésta obedece a una reacción enzimática de transesterificación, desde la D-glucosa esterificada con ácido gálico del tanino hacia galato de n-propilo mediado por tanasa inmovilizada y alcohol n-propílico.

Se ha logrado obtener un rendimiento de 74%. La transesterificación química produce pérdida de los reactantes por degradación; además, de no poder controlar el agua que se forma y que impide que el equilibrio se desplace hacia la formación de los productos resultantes.

La reacción de transesterificación se hizo en un solvente formado por alcohol n-propílico-agua, donde el agua se encuentra en una pequeña concentración; es decir, la reacción se produce en un medio orgánico y ofrece muchas ventajas relacionadas a cambios en el equilibrio de la reacción: facilidad de recuperación de productos y biocatalizador, menor riesgo de contaminación microbiana.^{7,10}

La evolución de la síntesis enzimática es seguida por el análisis mediante la cromatografía líquida de alta performance (HPLC) alcanzando su máximo rendimiento a los 120 minutos; tanto el galato de n-propilo estándar como el producto obtenido tienen un tiempo de retención 7,97 - 8,00 minutos, a 273 nm.

Según Yu y Li^{17,18} la reacción de esterificación en presencia de tanasa libre y 1-propanol produce un rendimiento de 62% de galato de n-propilo; si el soporte es celite545, en lugar de quitina se logra 72% de transesterificación. Estos resultados abonan a favor de la obtención del galato de n-propilo, por el método de transesterificación enzimática usando el sistema tanasa inmovilizada en quitina: ácido tánico: 1-propanol en fase orgánica.

CONCLUSIONES

- La tanasa inmovilizada en quitina, usando como agente ligante el gluaraldehído alcanzó un porcentaje de inmovilización del 70%.
- El galato de propilo obtenido por transesterificación entre tanasa inmovilizada y 1-propanol, en solvente orgánico alcanzó un rendimiento de 74%, la evolución de la síntesis fue seguida por HPLC, con una mayor producción a los 120 minutos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Smith M. B. and March J. Marchs Advanced Organic Chemistry Edit. Wiley New Jersey 2007.
2. Cannel R.J.P. Natural Products Isolation Edit. Humana Press Totowa, New Jersey 1988.
3. Lekha P.K. and Lonsane B.K. Production and Application of Tannin Acyl Hydrolase Adv: *Appl. Microbiol* 1997; 44:215-260.
4. Belmares R. Microbial production of tannase: an enzyme with potential use in food industry *Technol.* 2004; 37: 857 – 864.
5. Krajewska B. Application of chitin and chitosan based materials for enzyme immobilizations: a review *Enzyme and Microbiol Technology* 2004; 35 : 126-139
6. Arroyo M. Inmovilización de enzimas, fundamentos métodos y aplicaciones *Ars Pharmaceutica* 1998; 39(2): 23-39.
7. Illanes A. Catálisis enzimática en fase orgánica Biotecnología de enzimas Eds. Universitarias de Valparaíso 1994.
8. Mathur N. K. and Narang Ch. K. Chitin and Chitosan, Verratile Polysaccharides from Marine animales *J. of Chem Education* 1990; 67(11): 938-942.

9. Peniche C. A. Estudios sobre quitina y quitosano. Universidad de La Habana 2006.
10. Tanaka A. and Kawamoto T. Immobilized enzymes in organic solvents protein Immobilization, fundamentals and applications Taylor R. Eds. USA Marcel Dekker Inc. 1991.
11. Zaia D., Zaia C. and Lichtig J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes *Química Nova* 1998; 21(6): 787-793.
12. Tal M. Silberstein A., and Nusser E. why does Coomassie brilliant blue R. Interact differently with different proteins *J. of Biological Chemistry* 1980, 260 (18): 9996-9980.
13. USP 30, NF 25 Farmacopea de los Estados Unidos de America Washinton D.C. vol.1 pag.1325-1326, 2007.
14. Meyer V. R. Practical High Performance liquid Chromatography Ed. Willy New York 1994.
15. Kamata K. and Kazama M. Determinación de galato de propilo en lociones y cremas cosméticas por cromatografía líquida de alto rendimiento. *Japanese Journal Toxicology and Environmental Health*. 1984; 30 (6): 390-392.
16. Abdel-Naby M.A., Sherif A. A., el-tanash a.b. and mankarios a.t. Immobilization of *Aspergillus oryzae* tannase and properties of immobilized enzyme. *J. of Appl. Microbiology* 1999; 87: 108-114.
17. Yux., Li Y. and Wu D. Microencapsulation of tannase by chitosan - alginate complex coacervate membrane. Synthesis of autioxidant propy gallate in biphasic media. *J. of Chem.. Technology and Biotechnology* 2004, 79: 475 - 479
18. Yu X., Y and Wvd. Enzymatic synthesis of acid gallic esters using microencapsulated: tannase effect of organic solvents and enzyme Specificity. *J. of Molecular Catalysis B Enzymatic* 2004; 30:69-73.