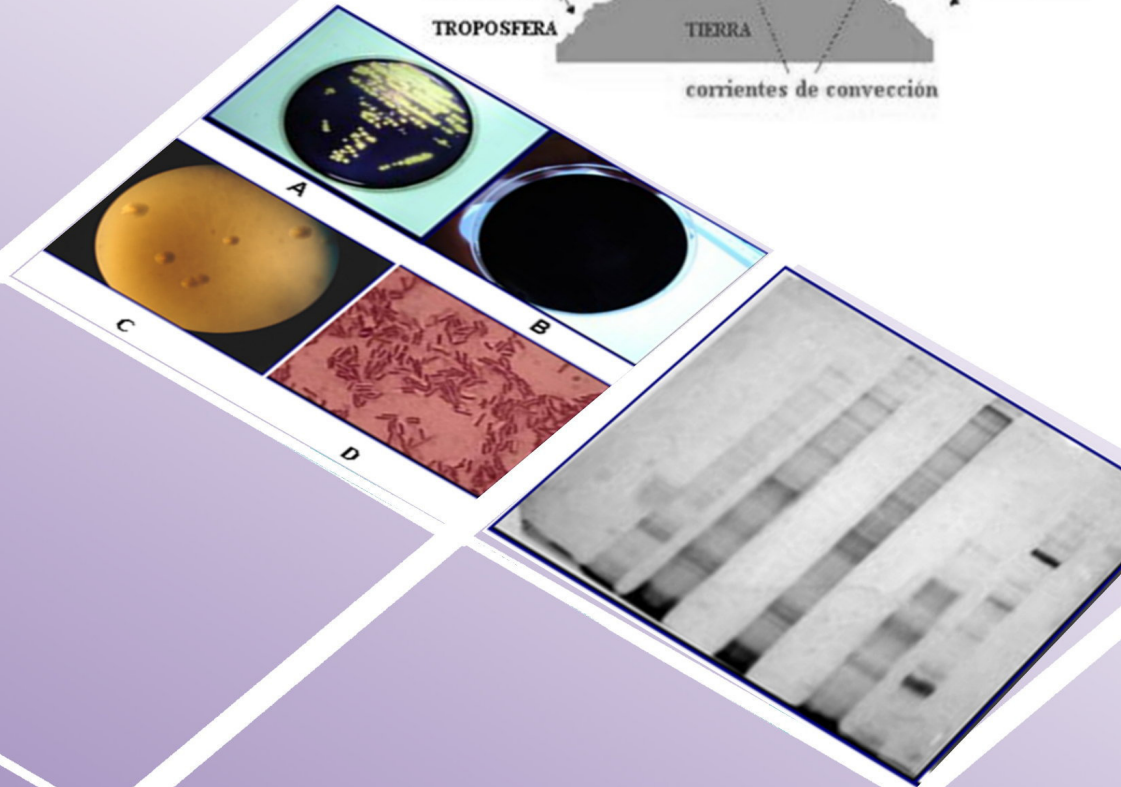
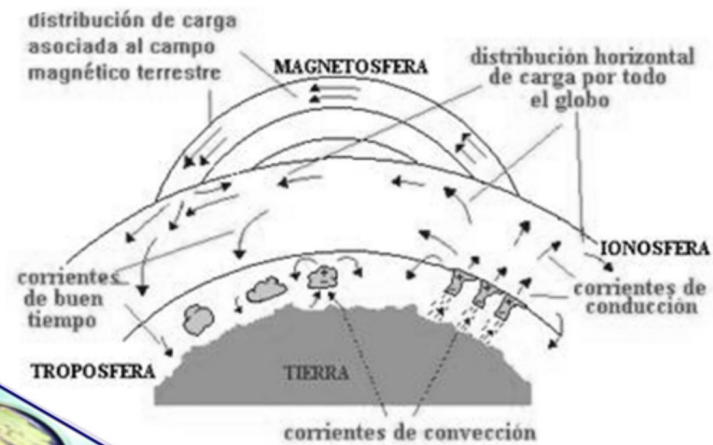


de Ciencias y Tecnología

Biotecnología - Física



ENZIMAS EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA: SU USO EN LA SÍNTESIS MICROBIOLÓGICA Y QUIMIOENZIMÁTICA DE FÁRMACOS Y EN TERAPÉUTICA MÉDICA: UNA REVISIÓN

VARIACIÓN DEL CAMPO ELÉCTRICO ATMOSFÉRICO DE LA TROPÓSFERA BAJA EN LA CIUDAD DE VALENCIA (VENEZUELA)

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE AMILASAS PROVENIENTE DE BACTERIAS TERMÓFILAS DEL CENTRO TERMAL LAS TRINCHERAS. VENEZUELA



La revista FARAUTE de Ciencias y Tecnología es una publicación periódica y arbitrada de la Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología de la Universidad de Carabobo, cuyo objetivo es divulgar los resultados de las investigaciones científicas y tecnológicas de la comunidad científica. Se publica un volumen anual en dos números.

Comité Editorial

Editor Jefe

Dr. José Gregorio Rodríguez-Quintal

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo, Venezuela

Junta Editorial

Dr. José Gregorio Marcano
Decano Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo, Venezuela.

Dra. Mariela Contreras
Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo, Venezuela.

Dr. Luis Rodríguez
Departamento de Matemáticas, Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo, Venezuela.

Dr. Pedro Linares
Departamento de Computación, Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo, Venezuela.

Dr. Henry Labrador
Departamento de Química, Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo, Venezuela.

Dr. Reimer Romero
Departamento de Física, Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo, Venezuela.

M.Sc. Elvira Sánchez
Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo, Venezuela.

Editor Fundador

Dr. Oscar Valbuena

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo, Venezuela.

Comité Asesor

Dr. José Rodríguez

Dra. Silvia Pérez

Dra. Sonia Ardito

Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo, Venezuela.

ENVIO DE ARTICULOS Y CORRESPONDENCIA: farautecienciauc@gmail.com

Acreditada en REVENCYT bajo el código RVF008 y en el Directorio Latindex con el número de folio 17789

La revista no se hace responsable ni solidaria de los juicios emitidos por los autores de los artículos publicados en la misma.



UNIVERSIDAD DE CARABOBO

FACULTAD EXPERIMENTAL DE CIENCIAS Y TECNOLOGIA

VOL. 12, N° 2, 2017

CONTENIDO

Enzimas en la industria farmacéutica: su uso en la síntesis microbiónica y quimioenzimática de fármacos y en terapéutica médica: una revisión
 Enzymes in the pharmaceutical industry: its use in microbiological and chemoenzymatic synthesis of medicaments and medical therapeutic: a review
 Oscar Valbuena
03

Variación del campo eléctrico atmosférico de la tropósfera baja en la ciudad de Valencia (Venezuela)
 Variation of the atmospheric electric field of the lower troposphere in Valencia (Venezuela)
 Ronald Millan, Oswaldo Guerra, Nelson Falcon
18

Aislamiento y caracterización de amilasas proveniente de bacterias termófilas del Centro Termal Las Trincheras. Venezuela
 Sugarcane Isolation and characterization of amylases from thermophilic bacteria at Centro Termal Las Trincheras. Venezuela
 Adarelys Andrade, Lellys M. Contreras
25



ENZIMAS EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA: SU USO EN LA SÍNTESIS MICROBIOLÓGICA Y QUIMIOENZIMÁTICA DE FÁRMACOS Y EN TERAPÉUTICA MÉDICA: UNA REVISIÓN.

Enzymes in the pharmaceutical industry: its use in microbiological and chemoenzymatic synthesis of medicaments and medical therapeutic: a review.

Oscar Valbuena

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo.

Valencia, Venezuela

Introducción

Durante el siglo XX, el desarrollo de la bioquímica, microbiología, biología molecular y la biotecnología, posibilitaron la caracterización, métodos de aislamiento, preservación y el uso de enzimas en procesos industriales factibles de utilidad para la sociedad (Inram & Bokharia, 2016). Posteriores avances condujeron a la inmovilización de enzimas (Arroyo, 1998), lo cual permitió el reciclaje de ellas en procesos productivos y un ahorro económico apreciable. Finalmente, los avances en electrónica, ingeniería y química dieron origen a la fabricación de biosensores (González-Rumayor *et al.*, 2005; Serna-Cock *et al.*, 2009), dispositivos capaces de determinar cualitativa y cuantitativamente moléculas y metales importantes para las industrias farmacéuticas y de alimentos (Moral *et al.*, 2015, Torres-Ramírez & Méndez-Albores 2014, Serna-Cock *et al.*, 2009), agropecuarias (González-Rumayor *et al.*, 2005), de diagnóstico clínico (Hamalatha *et al.*, 2013, Torres-Ramírez & Mendéz-

Albores 2014) y de monitoreo ambiental (Torres-Ramírez & Méndez-Albores 2014, Serna-Cock *et al.*, 2009). Actualmente son muchos los procesos biotecnológicos que utilizan células o enzimas aisladas de diferentes orígenes, microbianas (bacterias, hongos), vegetales y animales. Las mayores contribuciones de organismos en la producción de enzimas están relacionadas a hongos con 60%, seguido de bacterias (24%), levaduras (4%), Streptomices (2%), animales superiores (6%) y plantas superiores (4%), (Khan, 2018). La utilización de enzimas es importante en una amplia variedad de actividades industriales, enmarcando la fabricación de fármacos, herbicidas, insecticidas, detergentes, biocombustibles, alimentos, bebidas, papel, telas (Raveendra *et al.*, 2018). Además, su uso es relevante tanto en la diagnosis como en la terapéutica de enfermedades y en el monitoreo y remediación de ambientes naturales. A nivel mundial la producción masiva de enzimas purificadas ésta limitada

a unas 36 empresas (Arroyo *et al.*, 2014), mayoritariamente europeas; siendo los principales productores Dinamarca (38%), Japón (23%), Alemania (13,6%), Países Bajos (12%), Suiza (9,5%), Estados Unidos, Canadá y México (3,8%) (Moral *et al.* 2015); abarcando Dinamarca y Estados Unidos el 75% de las ventas globales (Moral *et al.*, 2015). El 40% de las ventas corresponden a enzimas relacionadas a alimentos y bebidas, el 30% a detergentes, 12% a textiles y papel y 10% a productos químicos, biológicos y medicamentos (Castillo-Rosales & Rodríguez-Alegría, 2014). El uso de enzimas en la industria farmacéutica implica la adopción de principalmente dos estrategias dependiendo del destino que se le asigne a la preparación enzimática; si la enzima va a ser utilizada como un catalizador para sintetizar un fármaco o para formar parte de un biosensor, la molécula debería ser inmovilizada de tal manera de ser utilizada en varios lotes de producción, lo cual ahorrara costos de producción. Si la enzima constituye el fármaco entonces ella debe de suministrarse en forma líquida (solución, suspensión) o sólida (polvo, granulada), lo cual implica su producción continua en relativamente grandes unidades de fabricación requiriendo usualmente reactores de 100.000 a 500.000 litros de capacidad (Madigan *et al.*, 2004).

En este manuscrito se considerarán las estrategias básicas empleadas para el uso de enzimas/microorganismos en la síntesis de fármacos y su utilidad como agentes terapéuticos.

No se pretende una revisión exhaustiva de estas áreas, el objetivo es enfatizar sobre pasos críticos catalizados por enzimas en la producción de reconocidos medicamentos.

Enzimas en la fabricación de fármacos

La elaboración de fármacos enzimáticos a nivel industrial usualmente se efectúa mediante la síntesis quimioenzimática o por biotransformaciones microbiológicas. En el caso de las biotransformaciones microbiológicas, las enzimas implicadas en el proceso pueden ser de origen endógeno del microorganismo o mediante la incorporación de la información genética proveniente de otros organismos, incluido el humano, que codifica la enzima a utilizar en la síntesis del fármaco. Los microorganismos (bacterias y hongos) son capaces, mediante la expresión de actividades enzimáticas endógenas, de transformar moléculas naturales exógenas y producir compuestos de importantes actividades fisiológicas y farmacéuticas (Bhatti & Khera, 2012).

La síntesis quimioenzimática se define como la utilización de enzimas como agentes catalíticos para obtener un producto y en la industria farmacéutica se emplea en uno o varios pasos implicados en la síntesis de fármacos (Espinosa-Kominami, 2015). Este concepto implica el uso de dos estrategias: I-utilización de moléculas producidas por síntesis química orgánica o por moléculas naturales sintetizadas por microorganismos (Donova & Egorova, 2012), las cuales posteriormente son utilizadas como sustratos para adicionar o eliminar grupos químicos mediante la intervención de una enzima y II-la resolución de mezclas racémicas mediante enzimas (Patel, 2000). La ventaja del uso de enzimas en algunos pasos de la síntesis de un compuesto radica en su estereoselectividad (quimio, regio y enantioselectividad) y el proceso puede realizarse a temperatura ambiente y presión atmosférica;

adicionalmente: A: se minimizan reacciones de isomerización, racemización, epimerización y rearrreglos que usualmente ocurren en la síntesis orgánica y que serían no deseables para la producción de fármacos (Patel, 2000), B: la posibilidad de efectuar cambios químicos sin necesidad de grupos protectores como ocurre en la síntesis orgánica convencional; C: disminución de pasos químicos para obtener el producto final; D: más altos rendimientos; E: reducción en la generación de productos secundarios o posibles contaminantes (Espinosa-Kominami, 2015) y F: ahorro en costos y tiempos de producción (Donova & Egorova, 2012). Entre las enzimas más utilizadas están aquellas que intervienen en reacciones químicas donde están implicados centros quirales (carbonos asimétricos). La presencia de un centro quiral da origen a la producción de dos isómeros enantiómeros, R (recto) o S (sinistro), con idénticas propiedades químicas, diferenciándose en la disposición espacial de los 4 diferentes grupos químicos unidos al centro quiral, lo cual se traduce en la propiedad que adquiere la molécula de desviar el plano de la luz polarizada a la derecha o a la izquierda. Esta diferente configuración en un átomo de carbono es importante para ejercer la función que se espera de la molécula sintetizada. Así, receptores de membrana, hormonas, moléculas reguladoras y enzimáticas discriminan en su unión hacia los enantiómeros R o S.

Muchas de las enzimas empleadas en la síntesis quimioenzimática de fármacos son enantioselectivas, es decir poseen la propiedad de generar uno solo de los dos posibles enantiómeros, el R o el S, y son capaces de resolver mezclas racémicas

(preparaciones que contienen los dos enantiómeros). Un ejemplo de la conveniencia de obtener fármacos constituidos por enantiómeros puros, es el caso de la talidomida, una droga diseñada como un analgésico, que fue administrada a mujeres con 1-3 meses de embarazo. Muchas de estas mujeres tuvieron hijos sin brazos y piernas (condición conocida como amelia), con las manos unidas a los hombros, estudios posteriores demostraron que la droga estaba constituida por una mezcla racémica de los enantiómeros R y S; el enantiómero R (eutómero) tiene la propiedad sedante, mientras que el S (diastómero) posee la actividad teratogénica (Arroyo *et al.*, 2014). En otros casos, funciones químicas son incorporadas a átomos específicos, constituyentes de anillos, de manera preferencial (regioselectividad), ubicándose en uno solo de los dos planos que definen el anillo (García *et al.*, 2015), generando uno de los dos posibles estereoisómeros, el α o el β .

El número de enzimas usadas en la síntesis de fármacos es elevado, las penicilin acilasas, las monooxigenasas (hidroxilasas) y las lipasas parecieran ser las más utilizadas. Estas enzimas catalizan diferentes reacciones químicas y comparten la propiedad de ser altamente selectivas, lo cual las capacita para producir isómeros ópticos puros que sirven como precursores moleculares para la síntesis de muchos compuestos de interés en la industria farmacéutica (Melo-Carvalho *et al.*, 2015; Qayed *et al.*, 2015; Jaeger *et al.*, 1994). Otras enzimas utilizadas son las deshidrogenasas, transaminasas, cetoreductasas, esterasas, proteasas, epoxihidrolasas, liasas, transferasas, amino

oxidasas, amidasas (Espinosa-Kominami, 2015; Albarran-Velo *et al.*, 2017).

Las **acilasas** (hidrolasas) catalizan tres tipos de reacciones: adición de componentes orgánicos al núcleo básico de las penicilinas y cefalosporinas (anillo β lactámico) para originar diferentes antibióticos; actividad de amidasa, originando una amina y un ácido carboxílico y actividad de esterasa, originando un ácido y un alcohol (Espinosa-Kominami, 2015). Las **monooxigenasas** (oxidoreductasas), también conocidas como hidroxilasas u oxidasas de función mixta, utilizan O_2 incorporando un átomo de oxígeno al sustrato para originar un alcohol y el otro átomo de oxígeno aparece en el H_2O , requiriendo la presencia de un cofactor reductor, NADH o NADPH. Debido a que su modo de acción, depende de dos moléculas enzimáticas y una coenzima soluble, la síntesis de derivados hidroxilados ha confrontado dificultades, limitando su uso en procesos industriales, los cuales son preferencialmente realizados con cultivos bacterianos o fúngicos (Urlacher & Girhard, 2019).

Para obviar estas dificultades se han diseñado metodologías que acoplan la actividad hidroxilante a la reductora, creando una molécula enzimática mixta (Urlacher & Girhard, 2019; Di Nardo & Gilardi, 2020). Las monooxigenasas son enzimas muy versátiles que pueden catalizar diferentes tipos de reacciones (Kumar, 2010): hidroxilaciones, epoxidaciones N-dealquilaciones, S-dealquilaciones y desaminaciones. Un grupo importante de monooxigenasas está constituido por los **citocromos P450**, conformado por una superfamilia de más de 100 isoenzimas que efectúan reacciones de hidroxilación y que

se denominan por las siglas CYP seguido de un número que designa la familia y se encuentran en todos los seres vivos desde bacterias hasta el hombre (Voet *et al.*, 2008). Entre sus variadas actividades estas enzimas efectúan la metabolización de fármacos y xenobióticos (inactivos) cuyos productos presentan actividad antineoplásica (Kumar, 2010) y tienen papel preponderante en la síntesis de hormonas esteroideas a partir de colesterol (Nelson & Cox, 2000) y otras propiedades fisiológica y farmacológicamente importantes (García *et al.*, 2015). En procariotes las CYP intervienen en la síntesis de antibióticos y esteroides; en plantas y hongos en la síntesis de fitohormonas e inmunosupresores (Di Nardo & Gilardi, 2020).

Las lipasas (hidrolasas) catalizan reacciones en las interfases agua/grasa; su actividad depende del medio donde se encuentren. En medios acuosos e intracelulares hidrolizan las grasas originando ácidos grasos y glicerina; si el medio posee una proporción crítica de un solvente orgánico, la reacción preponderante es la síntesis de ésteres, lo cual permite la producción de moléculas con componentes específicos. De tal manera las lipasas pueden catalizar reacciones de hidrólisis de enlaces éster, esterificaciones, transesterificaciones, interesterificaciones y acilación de glicoles (Ghanam & Aboul-Enein, 2015; Qayed *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2001; Jaeger *et al.*, 1994).

Síntesis de fármacos antimicrobianos β lactámicos

(Arroyo *et al.*, 2014; Castillo-Rosales & Rodríguez-Alegría, 2014; Torres-Bacete, 2005; Espinoza Kominami, 2015).

Las penicilinas y cefalosporinas son los más abundantes antibióticos β lactámicos. La síntesis quimioenzimática de estos antibióticos usualmente implica la producción de las penicilinas G o V y las cefalosporinas G o C por microorganismos. Luego de su aislamiento las penicilinas G, V y cefalosporina G, en condiciones alcalinas, se tratan con la enzima **penicilin acilasa** para generar las moléculas precursoras utilizadas para la síntesis de nuevos antibióticos con propiedades químicas y biológicas mejoradas. Las penicilinas proporcionan el ácido 6 amino penicilánico (6 APA), y la cefalosporina G origina el ácido 7 amino 3 desacetoxicefalospóranico (7ADCA). La cefalosporina C, diferentemente debe ser tratada con una **D amino oxidasa** y la **glutaril amidasa** para generar el ácido 7 amino cefalospóranico (7ACA). Estos tres compuestos (6APA, 7ADCA y 7ACA) son las moléculas precursoras para la síntesis de los nuevos antibióticos, presentando todas ellas el núcleo β lactámico. En presencia de acilasas, estos precursores y moléculas orgánicas diversas (usualmente ácidos) obtenidas por síntesis química y en medio ácido originan en la reacción de síntesis los nuevos antibióticos mediante un enlace tipo amida en el átomo de N del anillo β lactámico precursor. Entre las penicilinas semisintéticas se dispone de ampicilina, amoxicilina, carbonicilina, cloxacilina y clometicilina, entre muchas otras; de las cefalosporinas se sintetizaron la cefalotina, cefamet, cefalexina y cefaclor, entre otras. Los antibióticos β lactámicos actúan al

inhibir la síntesis de la pared celular del microorganismo, específicamente al inhibir la transpeptidación, evento que implica la formación del enlace peptídico entre aminoácidos para formar la capa de peptidoglicano, estructura que evita la lisis de la célula microbiana (Madigan *et al.*, 2004). Otra alternativa para la síntesis de β lactámicos es el uso de la enzima **sintasa ACV**, la cual a partir de una mezcla equimolecular de ácido amino adípico, L cisteína y D valina produce el tripéptido L α amino L cisteinil D valina (LLDAV), precursor lineal del anillo β lactámico, el cual por acción de la enzima **N isopenicilin N sintasa E1** (conocida como **ciclasa**) genera la dimetil penicilina y un derivado de las cefalosporinas, cefanos (Lancini & Lorenzetti, 1993). El enlace -N-CO del anillo β lactámico es imprescindible para la actividad biológica del antibiótico, su ruptura por acción de las **penicilanasas** es la base para la resistencia bacteriana a este tipo de antibióticos (Daza-Pérez, 1998; Fahad-Ullah *et al.*, 2019; Pérez-Cano & Robles-Contreras, 2014; Raja *et al.*, 2011). Para proteger la actividad biológica de estos antibióticos, en algunos medicamentos β lactámicos se adiciona ácido clavulánico, un inhibidor de las β penicilanasas.

Eicosanoicos (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos)

Son derivados del ácido araquidónico, constituyendo hormonas paracrinas implicadas en muchos eventos fisiológicos incluyendo funciones reproductivas (Nelson & Cox, 2000).

Estos compuestos, también quimioenzimáticamente sintetizados, son generados a partir de ciclopentano y sus

derivados en presencia de enzimas, tales como **lipasas** de diferentes orígenes (pancreáticas, micóticas y bacterianas), **esterasas** y **cetoreductasas** de levaduras.

Los derivados del ciclopentano utilizados generalmente constituyen mezclas racémicas, pues son sintetizados químicamente. Estas enzimas adicionan de manera enantio selectiva agrupaciones químicas al núcleo ciclopentano originando moléculas precursoras para los eicosanoicos; la molécula 1, 4 diacetato meso ciclopenteno 2 por acción de **lipasas** de *Mucor meihei*, *Pseudomonas fluorescens* y *Candida rugosa* producen el (1S 4R) 4 hidroxiciclopenteno 2 acetato (el eutómero), precursor de diferentes eicosanoicos (Ghorpe *et al.*, 1999; Kalkote *et al.*, 2000; Melo-Carvalho *et al.*, 2015); otra estrategia usa como molécula precursora ésteres metílicos de ácidos grasos monoinsaturados de longitud de cadena corta y **lipasas** de *Pseudomonas*, *Candida*, *Aspergillus* y páncreas porcino, las cuales acetilan el enantiómero R (eutómero), compuesto intermediario para la síntesis de una serie de análogos de prostaglandinas (Patel, 2000). Derivados del ciclopentano benzoil lactona aldehído constituyen otros precursores para la síntesis de análogos de las prostaglandinas, lo cual se alcanza mediante procedimientos químicos y una reacción final catalizada por la **lipasa** de *Candida rugosa* (Shelnut *et al.*, 2015). Entre las diferentes moléculas análogas de las prostaglandinas se reporta la síntesis de bimatoprost y latanoprost, mediante la molécula precursora lactam benzoato (3aR,4R, 5R, 6aS) y el uso de **esterasas**, **enoato reductasas** y **cetoreductasas** (Patel, 2000; Contente *et al.*, 2015). La epoxidación de ácido linoleico mediante el uso de la

monooxigenasa CYP 102, origina el leukotoxin B (12,13 epoxi 9 octadecenoato), compuesto intermedio en la producción de eicosanoicos (Siegfried *et al.*, 1990; Quiñones *et al.*, 2008) con actividades antibacterianas, depresor cardiovascular y vasoactivo. Adicionalmente los usos terapéuticos de las prostaglandinas incluyen la prevención de úlceras gástricas, mantenimiento del conducto arterial abierto en recién nacidos, inducción del parto, expulsión del feto muerto, abortivo, y mejoramiento de la circulación y embolia pulmonar, glaucoma e hipotricosis de pestañas (Fernández-Duarte *et al.*, 2015).

Esteroides (hormonas)

(Niwa *et al.*, 2015).

Este tipo de fármacos se sintetizan haciendo uso de fitoesteres, moléculas provenientes de plantas (estigmasterol, β sistosterol, diosgenina) y de bilis de animales (ácido desoxicólico, colesterol), (Bhatti & Khera, 2012; Donova & Egorova, 2012). Estos compuestos naturales poseen como rasgo estructural fundamental el núcleo del ciclopentano perhidro fenantreno (CPPHF), un compuesto de cuatro anillos carbonados, el cuál según su origen, presenta diferentes sustituyentes químicos y constituyen las moléculas precursoras de los fármacos a producir. En la síntesis de derivados esteroideos, mediante procedimientos químicos, enzimáticos ó microbiológicos, los diferentes sustituyentes químicos del precursor son eliminados y el núcleo CPPHF se somete a la acción de **monooxidasas (hidroxilasas)**, las cuales introducen funciones alcohólicas de manera regioselectiva en determinadas posiciones y orientaciones del CPPHF para originar los

fármacos deseados (García *et al.*, 2015). Las posiciones y orientaciones más comunes y económicamente deseables involucran la hidroxilación de los carbonos 7 α , 9 α , 11 α , 11 β , 16 α y 17 α , pero ocurren otras 16 posiciones particularmente en microorganismos (Ortega de los Rios, 2018); las notaciones α y β se refieren a la orientación del grupo hidroxilo respecto al plano del núcleo policíclico de CPPHF. La acción fisiológica de los esteroides depende de su estructura: tipo, número, regio y estereo posición de los grupos funcionales atados al núcleo CPPHF: la hidroxilación β en el C11 es esencial para la actividad antiinflamatoria, hidroxilación β en el C17 establece propiedades androgénicas, 3 ceto 5 eno determina actividad corticosteroide y la aromatización del anillo A establece carácter estrogénico (García *et al.*, 2015; Donova & Egorova, 2012). Una alta proporción de los compuestos esteroideos disponibles en la industria farmacéutica se obtienen por métodos microbiológicos, usando una amplia variedad de cepas bacterianas y fúngicas (Bhatti & Khera, 2012; Donova & Egorova, 2012; García *et al.*, 2015,). Del colesterol (C27) se origina la pregnenolona (C21) por acción de la **hidroxilasa 20,22** y posterior clivaje de un fragmento de cinco carbonos (el iso capro aldehído), la cual in vivo da origen a todas las hormonas esteroideas (Niwa *et al.*, 2015). En la industria farmacéutica el estigmasterol se usa para la síntesis de progesterona (C21); la diosgenina para la progesterona, andrógenos (C18), estrógenos (C19) y cortisona (C21); desoxicolato para estrógenos y progesterona; β sistosterol para androstenediona (C19) y de esta se sintetiza testosterona (C18) y estradiol (C19). De la progesterona se puede

obtener hidprogesterona y cortisona (Madigan *et al.*, 2004), mediante hidroxilaciones enzimáticas.

Otra actividad industrial de las **hidroxilasas** es la hidroxilación de la vitamina D3 (colecalfiferol, un compuesto sin actividad, derivado del colesterol y que se produce en la piel) la cual es transformada a 1, 25 dihidroxi vitamina D3 (C27), hormona encargada de regular el metabolismo de Ca y P en hueso, riñón e intestino; in vivo estas hidroxilaciones ocurren secuencialmente en el hígado y el riñón (Nelson & Cox, 2000; Szaleniec *et al.*, 2018).

Un método quimioenzimático transformó el 4 androsteno 3,17 diona (4AD), por acción de una isomerización química seguida de una reducción enzimática mediada por una **cetoreductasa** y una **alcohol deshidrogenasa**, a 3 β hidroxandrost 5 en 17 ona y su acetato (DHEA y DHEA acetato), también conocidos como dehidroepiandrosterona. Ambas enzimas fueron aisladas de *Sphingomonas wittichii*, y el 4AD de estigmasterol de soya.

DHEA es precursor de hormonas estrogénicas y androgénicas y un agente antineoplásico (Fryszkowska *et al.*, 2016). La función de las hidroxilasas in vivo, además de la síntesis de todas las hormonas esteroideas, ésta ligada a la detoxificación de xenobióticos (hidrocarburos y drogas sintéticas). La activación de profármacos (drogas inactivas) antineoplásicos necesita de su hidroxilación por parte de hidroxilasas específicas, originándose drogas alquilantes que atacan células malignas al reaccionar con el ADN e inhibir las topoisomerasas I y II (Quiñones *et al.*, 2008). La función de los esteroides es múltiple, constituyen las hormonas sexuales masculinas y femeninas

(testosterona y estrógenos), regulan el ciclo reproductivo (progesterona), la gluconeogénesis (glucocorticoides), el intercambio de Na por K (mineralocorticoides), la fijación de Ca y P en el hueso (vitamina D) y la emulsificación de grasas en el proceso digestivo (sales y ácidos biliares) (Nelson & Cox, 2000). Los fármacos esteroideos se utilizan en una gama amplia de condiciones patológicas, son antiinflamatorios, inmunosupresores y antineoplásicos y se administran en múltiples y variadas insuficiencias. (Gómez-Ordoñez *et al.*, 2007; Bhatti & Khera, 2012; Vega, 2017). Derivados de la testosterona se utilizan como anabolizantes para incrementar la masa muscular (Aguilar *et al.*, 2013) y la progesterona y derivados de estrógenos se utilizan para sintetizar anticonceptivos (Vázquez & Ospino, 2017). Los medicamentos sintéticos antiinflamatorio más utilizados son beclometasona, betametasona, budesónida, deflazacort, dexametasona, flumetasona, metilprednisolona y prednisolona.

Antiinflamatorios no esteroideos (profenos)

Estas drogas actúan mediante la inhibición de las ciclooxigenasas I y II, enzimas implicadas en la síntesis de prostaglandinas (Contente, 2015; Gómez-Ordoñez *et al.*, 2007) y se caracterizan por poseer un núcleo químico denominado profeno (ácido 2 aril propiónico), en algunos casos constituido por un anillo aromático sustituido, en uno de sus carbonos, con un radical de ácido éster metil propiónico (Contente *et al.*, 2015) o por el ácido propiónico (Ruiz-Martínez, 2018). Usualmente el profeno, sintetizado por síntesis orgánica, es una mezcla

racémica, la cual al ser tratada con **lipasas** (fúngicas o pancreáticas) y 1 propanol o 2 propanol, permiten separar los dos isómeros, siendo el compuesto (S) ibuprofen 1 propil ester el que posee la actividad biológica (eutómero) mientras el compuesto (R) ibuprofeno es inactivo (diastómero) (Ruiz-Martínez, 2018). Posteriormente, al núcleo profeno (S) modificado se le adicionan compuestos químicos (sintetizados por síntesis orgánica) para generar los diferentes fármacos con características específicas. Entre los diferentes derivados del profeno (S) se encuentran, entre otros, el ibuprofeno, el naproxeno, el cicloprofeno, el flubiprofeno y el cetoprofeno (Contente *et al.*, 2015). Estos fármacos también exhiben actividad analgésica. La actividad antiinflamatoria también es ejercida por esteroides.

Antineoplásicos

Algunos de estos fármacos atacan al ADN mediante reacciones de alquilación produciendo aductos (bases nitrogenadas metiladas o etiladas) que inhiben las topoisomerasas I y II en la replicación del material genético en células cancerosas. Una de las estrategias para la síntesis de estas drogas implica la hidroxilación de prodrogas (inactivas), tales como la ciclofosfamida (CPA) e ifosfamida (IFA), por acción de enzimas de la familia del **citocromo P450**, por ejemplo, la **hidroxilasa CYP102**, la cual transforma las prodrogas en agentes alquilantes activos, los cuales son los verdaderos agentes antineoplásicos (Kumar, 2010; Quiñones *et al.*, 2008). Otra droga anticancerosa es el paclitaxel, su molécula precursora, un acetato con un sustituyente aromático, es obtenida de la corteza del árbol tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*) como una

mezcla racémica de ambos enantiómeros. Mediante el uso de **lipasas**, se libera un grupo acetilo del isómero diastomero (S), mientras el isómero (R) queda inalterado y constituye el eutómero con actividad biológica (3R cis acetiloxi 4 fenil 2 acetidinona), el cual posteriormente dará origen al paclitaxel por síntesis orgánica (Ruiz-Martínez, 2018; Quiñones *et al.*, 2008; Melo-Carvalho *et al.*, 2015). El paclitaxel interfiere con los procesos mitóticos celulares al estimular el ensamblaje de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina (Ruiz-Martínez, 2018). Otra estrategia usa la hidroxilación de limoneno, mediada por la **hidroxilasa P450 CYP153**, para generar el alcohol perílico, el cual presenta actividad antineoplásica (Shojaei, 2014). Estos compuestos son efectivos en el tratamiento de cáncer testicular, leucemias, glaucoma, retinoblastoma, cánceres de mama, ovario, riñón y pulmón.

Antihipertensivos (derivados del ácido propanoico)

Algunos de estos fármacos, son quimioenzimáticamente sintetizados a partir de moléculas orgánicas (mezclas racémicas) y el uso de **lipasas/esterasas** fúngicas o bacterianas. Las moléculas precursoras son derivados del ácido 3 tio 2 metil propanoico (Contente *et al.*, 2015). Uno de estos derivados es el ácido 3 acetiltio 2 metil propanoico, que luego de la acción enzimática genera el enantiómero (S) mediante la eliminación de ácido acético. En otro protocolo el ácido 3 benzotio 2 metil propanoico sirve como precursor. Otra molécula precursora es el ester diacetato arílico que luego de ser tratado con **lipasa pancreática** porcina produce el monoester

(S), intermediario para la síntesis de monopril (Contente *et al.*, 2015). Estos fármacos, captopril y monopril, son inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), la cual cataliza la transformación de angiotensina I a angiotensina II, ésta última molécula es la responsable de elevar la tensión arterial, así al bloquear su formación se obtiene el efecto antihipertensivo (Contente *et al.*, 2015). La estrategia para la síntesis del antihipertensivo bufuralol (S) implica el uso del bromuro de 7 etilbencenofurano 2 yl etanona como molécula precursora, la cual es convertida al alcohol respectivo (mezcla racémica) que posteriormente tratado con **lipasas** de levadura separan los enantiómeros (R) y (S) de bufuralol, (Nagy et al 2014). Este compuesto también exhibe actividad ansiolítica y antimigraña y es un inhibidor de la testosterona 6β hidroxilasa.

Antihipercolesterolemicos (estatinas)

Drogas que reducen la concentración de colesterol en sangre al inhibir la actividad de la hidroximetil glutaril CoA reductasa (HMGCoA reductasa), enzima que cataliza la conversión de HMGCoA a ácido mevalonico y CoA, reacción intermedia en la síntesis de colesterol.

El núcleo químico común de estos compuestos, denominados estatinas, es el ácido 3(R), 5(R) dihidroxi heptanoico con diferentes sustituyentes aromáticos en el carbono 7 (Contente *et al.*, 2015), lo cual suministra las propiedades específicas de cada fármaco. Para la síntesis de las diferentes estatinas se emplean 4 diferentes enzimas, una **cetoreductasa**, **glucosa deshidrogenasa**, **halohidrina dehalogenasa** y **alcohol deshidrogenasa** (Contente *et al.*,

2015). Entre las estatinas disponibles están: mesovastatina, lovastatina, simvastatina, pravastatina, atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina y rosuvastatina (Contente *et al.*, 2015).

Antiepilépticos

La pregabalina, ácido S3 aminometil 5 metil hexanoico, un antiepiléptico, es un análogo de ácido gamma aminobutírico (GABA, un derivado del ácido hexanoico aminado). La pregabalina actúa al bloquear los canales de Ca en las neuronas. Se obtiene a partir de una mezcla racémica del éster metílico del ácido rac 2 carboxietil 3 ciano 5 metil hexanoico. De esta mezcla racémica se obtiene, mediante el uso de **lipasas**, el enantiómero (S) del ácido 3 ciano 5 metil hexanoico etil éster (el eutómero) precursor de la pregabalina. En otros protocolos el uso de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* y como moléculas precursoras rac Ynitro esters y el ácido rac 2 carboxietil 3 ciano 5 metil hexanoico etil éster, ha sido reportado. La droga también tiene actividad antidepresiva (Ruiz-Martínez, 2018). Otra estrategia para la síntesis de antiepilépticos utiliza la reducción del 4 cloro 3 oxobutanoato de etilo por acción de la enzima **alcohol deshidrogenasa** y posterior sustitución del Cl por un grupo ciano mediante el uso de una enzima **halohidrina deshalogenasa** (Gotor-Fernández & Gómez-Degano, 2017).

Antidiabéticos

La sitagliptina, un agente antidiabético, se obtiene a partir de la prostagliptina mediante aminación reductiva usando isopropil amina y una enzima **transaminasa**, lo cual origina el eutómero enantiómero (R) de la droga y

acetona. El compuesto inhibe la enzima dipeptidil peptidasa 4 (DDP4) (Ruiz-Martínez, 2018). La DDP4 es una enzima proteolítica que hidroliza las hormonas incretinas, GLP1 y GIP, (una fracción de las hormonas secretinas) sintetizadas por el duodeno y yeyuno del intestino delgado, las cuales estimulan la secreción de insulina por el páncreas. (Carretaro-Colomer, 2008).

Antiasmáticos (antileucotrienos)

Drogas también conocidas como antagonistas de leucotrienos o antileucotrienos, bloquean los receptores celulares de los leucotrienos; tienen actividad antiinflamatoria sobre todo a nivel de bronquios, constituyendo drogas antiasmáticas, antiinflamatorias. Son derivados del ácido araquidónico. Uno de los más conocidos es el montelukast, compuesto que inhibe la enzima 5 LOX. En su síntesis se utiliza la enzima **alcohol deshidrogenasa** para reducir la forma cetónica de su molécula precursora a un alcohol, originando el eutómero (S) montelukast (Gotor-Fernández & Gómez-Degano, 2017; Grarafoni *et al.*, 2017). Otro medicamento antiasmático usualmente empleado es el formoterol, una mezcla racémica, esta droga bloquea receptores adrenérgicos beta 2 en músculo liso bronquial, produciendo su relajación. Su preparación se efectúa mediante el acoplamiento de un epóxido (R) aromático y una amina (R) aromática, mediante el uso de **lipasas** fúngicas o bacterianas, que luego de modificaciones químicas, origina el enantiómero eutómero (RR)1 (Campos *et al.*, 2000); entre ellos están disponibles el isoproterenol, salbutamol, terbutalina.

Antidepresivos

Son drogas derivadas de aril propano hidroxilados preparados por acción de **lipasas** bacterianas de *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia*. Una de las moléculas precursoras es el éster metílico del ácido 3 aril 3 hidroxil propiónico que da origen al enantiomero eutómero (R), entre estas drogas se encuentra la atomoxetina, la nisoxetina y la fluoxetina. También muestran actividad antiparasitaria, corrigen la disfunción sexual e incontinencia urinaria, (Borowiecki & Bretner, 2013). Este tipo de antidepresivos se conocen por las siglas ISRS, son inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (un neurotransmisor) y actúan aumentando los niveles de serotonina en el cerebro (Mayo clinic, 2020).

Nitrovasodilatadores

Una estrategia muy utilizada para sintetizar fármacos cardiovasculares activos hace uso del 3 oxiaril 2 hidroxil nitro propano (mezcla racémica) y **lipasas** (*Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia*) para resolver el racemato y originar el enantiomero eutómero (S); estas drogas tienen actividad relajante muscular y cardíaca, y se conocen como nitrovasodilatadores; entre ellos nitroglicerina, dinitrato isosorbide y nicorandil (Pchelka *et al.*, 2001).

Enzimas como agentes terapéuticos

Una vez demostrado *in vitro* el efecto deseado de un posible fármaco, este debe cumplir una serie de propiedades que garanticen el acceso adecuado al sitio diana al cual se quiere dirigir; los medicamentos enzimáticos no escapan a esta premisa. Entre

los aspectos que se deben considerar están los siguientes: 1- el fármaco debe ser estable en el sitio (órgano) donde ejercerá su acción (pH, presencia de enzimas proteolíticas u oxidativas); 2- debe ser estable en su tránsito por el tracto digestivo hasta incorporarse al torrente circulatorio; 3- no debe unirse fuertemente a estructuras celulares o moleculares; 4- debe ser estable a la acción de enzimas, particularmente a las hepáticas encargadas de la detoxificación de drogas; 5- debe permanecer en el organismo el tiempo necesario para ejercer su acción, es decir evitar su prematura excreción renal; 6- debe de atravesar barreras de capilares y membranas celulares para incorporarse al tejido diana o estructuras membranosas (barrera hematoencefálica) si el fármaco va dirigido al cerebro; tener la concentración suficiente para garantizar una dosis adecuada (Voet *et al.*, 2008). Una relación, aunque no exhaustiva, de enzimas que constituyen o forman parte de medicamentos, especificando su uso en determinadas condiciones fisiológicas y/o patológicas se detalla a continuación.

Desoxirribonucleasa: Jones *et al.*, 2003; Enríquez *et al.*, 2012. Fibrosis quística, bronquitis viral, licuefacción de moco (mucolítico).

Bromelina: López-Lugo *et al.*, 1996. Antiinflamatorio.

Pancreatina (mezcla de proteasas, amilasa y lipasas): Christiansen, 2019. Digestivo, pancreatitis, insuficiencia pancreática, pancreatectomía.

Calpaína 3: Jordán *et al.*, 2000; López de Munain *et al.*, 1999. Distrofia muscular.

Aspariginasa: Pérez-Aguilar *et al.*, 2012; Ballon-Cossio, 2011. Inmunodeficiencias, anticancerígeno.

Mananasas: Soni & Kango, 2013. Alimentación (prebiótico).

Fitasas: Frontela *et al.*, 2008. Alimentación (minerales).

Glucocerebrosidasas: Moreno *et al.*, 2019. Megalocefalias, hiperplasia del bazo.

Adenina deaminasa: Tintos-Hernández, 2011. Inmunodeficiencias.

Estreptoquinasa: Gutiérrez-Zárraga *et al.*, 2014. Cirugía cardiovascular, patologías oculares, trombosis venosas, hemorroides.

Uroquinasa: Martín-Lorenzo *et al.*, 2005. Remoción de coágulos en catéteres permanentes.

Hialuronidasa: Fierro-Arias, 2017; Vázquez-Flores & Asz-Sigall, 2011. Dermatología, relleno de arrugas.

Esteroid C25 hidroxilasa: Szaleniec *et al.*, 2018. Deficiencias hepáticas, metabolismo del Ca y P, transformación de vitamina D3 en hormona.

CYP 2B6 (hidroxilasa/monooxigenasa): Kumar, 2010. Glaucoma, gliosarcoma.

Bhatti HN; Khera Ra. 2012. Biological transformations of steroid compounds: A review. *Steroids* 77:1287-1290.

Ballón-Cossio D. 2014. L Aspariginasa, un arma de doble filo pero de vital importancia. *Rev bol ped* 53(1): 24-28.

Borowiecki P, Bretner M. 2013. Studies on the chemoenzymatic synthesis of (R) and (S) methyl 3 aryl 3 hydroxypropionates: the influence of toluene pretreatment of lipase preparations on enantioselective transesterifications. *Tetrahedron: Asymmetry* 24(15-16): 925-936.

Campos F, Bosch MP, Guerrero A. 2000. An efficient enantioselective synthesis of (R,R) formoterol, a potent bronchodilator using lipases. *Tetrahedron: Asymmetry* 11(13): 2705-2717.

Carretaro-Colomer M. 2008. Sitagliptina. Antidiabético Oral. *Offarm* 27(8):118-119.

Castillo-Rosales E, Rodríguez-Alegría ME. 2014. Enzimas aplicadas en procesos industriales. *Rev UNAM Mx* 15(2): art96.

Christiansen S. 2019. The Health Benefits of Pancreatin. For Pancreatic Insufficiency (Such as in Cystic Fibrosis). *Holistic Health > Supplements*.

Contente ML, Zambelli P, Galafassi S *et al.*, 2015. A new chemoenzymatic approach to the synthesis of Latanoprost y Bimatoprost. *J Mol Catalysis B: Enzymatic* 114: 7-12.

Daza-Pérez RM. 1998. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Inf Ter Sist Nac Salud* 22(3): 57-67.

Di Nardo G; Gilardi G. 2020. Natural compounds as pharmaceuticals: the key role of cytochrome P450 reactivity. *Trends in Biochem Sci* 45(6): 511-525.

Donova MV, Egorova OV. 2012. Microbial steroid transformations: current status and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 94:1423-1447.

Bibliografía

Albarrán-Velo J, González-Martínez D, Gotor-Fernández V. 2017. Stereoselective biocatalysis: A mature technology for the asymmetric synthesis of pharmaceutical building blocks. *Biocatalysis and Biotransformation* 35(2): 102-130.

Arroyo M, Acebal C, Mata I. 2014. Biocatálisis y Biotecnología. *Arbor* 190 (768): a156.

Arroyo M. 1998. Inmovilización de enzimas: Fundamentos, Métodos y Aplicaciones. *Ars Pharmaceutica* 39(2): 23-39.

Enriquez A, Chu IW, Mellis C, Lin WY. 2012. Nebulized desoxyribonuclease for viral bronchiolitis in children younger than 24 months. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 11: artCD008395.

Espinosa-Kominami P. (2015). Síntesis quimioenzimática para la obtención de compuestos antiinfecciosos. Universidad Complutense de Madrid.

Fahad-Ullah M, Bhat SH, Tariq M, Abuduhier FM. 2019. *Clinical Significance of Enzymes in Disease and Diagnosis. Biocatalysis* 213-231.

Fernández-Duharte J; Zapata-Blanco E; Santiesteban-Sanqué X et al. 2015. Uso y Abuso de las Prostaglandinas. *Medisan* 19(1): 113-121.

Fierro-Arias L, Campos-Cornejo NG, Contreras-Ruiz J. 2017. Productos enzimáticos (hialuronidasa, colagenasa y lipasa) y su uso en dermatología. *Dermatol Rev Mex* 61(3): 205-219.

Frontela C, Ros G, Martínez C. 2008. Empleo de fitasas como ingredientes funcionales en alimentos. *Arch Latinoamer Nutr* 58(3): 215-220.

Fryszkowska A, Peterson J, Davies N et al. 2016. Development of a chemoenzymatic process for hydroepiandrosterone acetate synthesis. *Org Process Res Dev* 20:1520-1528.

García JL, Ramos R, Gómez J, et al. (2015). Biotransformación de esteroides con diferentes microorganismos. *Rev mex cienc farm* 46 (1):17-32.

Ghanem A, Aboul-Enein HY. 2005. Application of lipases in kinetic resolution of racemates. *Chirality* 17(1): 1-15.

Ghorpade S, Kharul RK, Joshi RR et el 1999. Desymmatrization of meso cyclopenten cis 1,4 diol to 4(R) hydroxycyclopenten 2 en 1(S) acetate by irreversible transesterification using

Chirazyme. *Tetrahedron: Asymmetry* 10: 891-899

Gómez-Ordoñez S, Gutiérrez-Álvares AM, Valenzuela-Plata EL. 2007. Corticoides: 60 años después, una asignatura pendiente. *Rev Cienc Salud Bogotá (Colombia)* 5(3): 58-69.

González O, Quishpe S, Pozo R. 2012. Biosensores. Pp 1-18. Escuela Politécnica Nacional, Facultad de Ingeniería Eléctrica y Electrónica. Instrumentación Biomecánica.

González-Rumayor V, García-Iglesias E, Ruiz-Galán D, Gago-Cabezas L. 2005. Aplicaciones de biosensores en la agroindustria alimentaria.

Gotor-Fernández V, Gómez-Degano MJH. 2017. Biocatálisis aplicada. Las enzimas como herramientas útiles en síntesis orgánica. *An Quim* 113(1): 27-36.

Grarafoni F, Catanaccio V, Telechea H, Giachato G. 2017. Montelukast en menores de 5 años con sibilancias recurrentes ¿Cuáles son sus beneficios? *Arch Pediatr Urug* 88(3): 168-172.

Gutiérrez-Zarraga J, Mendoza-Gutiérrez E, Rodríguez- Wong U. 2014.

Estreptoquinasas: usos y aplicaciones médicas. *Rev Hosp Jua Mex* 81(3): 161-165.

Hamalatha T, UmaMaheswari T, Krithiga G et al. 2013. Enzymes in clinical medicine: An overview. *Indian Journal of Experimental Biology* 51, Oct: 778-788.

Inram-Bokhari M, Sarwar-Khan N, Rashid N. 2016. Industrial biotechnology. Its applications in food and chemical industries. Chapter 22, pp518-527. En *Applied Molecular Biotechnology*. M Sarwan-Khan, I Ahmed-Khan, D Barh, editores. CRC Press.

Jaeger KE, Ransac S, Dijkstra BW et al. 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev* 15: 29-63.

Jones AP, Wallis C, Kearney CE. 2003. Desoxirribonucleasa humana recombinante

para la fibrosis quística. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 3: artCD001127.

Jordán J, Galindo MF, Ceña V, González-García C. 2000. Cistein proteasas y neurodegeneración. *Rev Neurol* 31(4): 333-340.

Khan NT. 2018. Enzyme Technology-An Emerging Trend in Biotechnology. *Enz Eng* 7(1): 1-3.

Kalkote UR; Ghorpade SR, Joshi RR et al. 2000. A practical and scalable process for 4-(R) hydroxycyclopent-2-en-1-(S)-acetate by desymmetrization of meso-cyclopent-2-en-1,4-diacetate catalyzed by *Trichosporum beigelii* (NCIM 3326) a cheap biocatalyst. *Tetrahedron: Asymmetry* 11: 2965-2970.

Kumar S. 2010. Engineering cytochrome P450 biocatalysts for biotechnology, medicine and biorremediation. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 6(2): 115-131.

Lancini G, Lorenzetti R. 1993. Biological transformations. Chapter 8, pp194-214. En *Biotechnology of Antibodies and other Bioactive Microbial Metabolites*. Springer Science+Business Media LLC.

López-Lugo I, Diaz-Varela J, Merino de Cáceres F. 1996. La bromelina: una proteasa de interés comercial. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 1(2): 17-22.

López de Munain A, Urtasun A, et al. 1999. Alteraciones en las proteínas funcionales. Déficit de calpaína 3. *Rev Neurol* 28(161): 158-164.

Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 2004. Brock Biología de los Microorganismos, 10ª edición. Capítulo 30, pp 140-142, 164, 165, 961-963, 971. Pearson Prentice Hall.

Martín-Lorenzo A, Bartolomé-Rapado MC, Tameron-Nieto A. 2005. La uroquinasa aplicada de forma precoz, “clave” para la obstrucción de catéteres permanentes. *Rev Soc Esp Enferm Nefrol* 8(2): 98-102.

Mayo Clinic. 2020. Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS).

Melo-Carvalho ACL, Sousa-Fonseca T, Mattos MC et al. 2015. Recent advances in lipase mediated preparation of pharmaceuticals and their intermediates. *Int J Mol Sci* 16(12): 29682-29716.

Moral S, Ramírez-Coutiño L, García-Gómez MJ. 2015. Aspectos relevantes del uso de enzimas en la industria de alimentos. *Rev Iberoamericana de Ciencias*. 2(3): 87-102.

Moreno B, Kaminski S, Navarro L. 2019. La glucocerebrosidasa y la enfermedad de Gaucher. *Chem Evol*.

Nagy B, Dima N, Paizs C et al. 2014. New chemoenzymatic approaches for the synthesis of (R) and (S) bufuralol. *Tetrahedron: Asymmetry* 25: 1316-1322.

Nelson DL, Cox MM. 2000. Lehninger Principles of Biochemistry. 3rd edition. Worth Publishers.

Pp 378-380, 800, 803, 813.

Niwa T, Murayama N, Imagawa Y, Yamazaki M. 2015. Regioselective hydroxylation of steroid hormones by human P450. *Drug Metab Rev* 47(2): 89-110.

Patel NR. 2000. XIII Prostaglandin Synthesis. En *Stereoselective Biocatalysis*. Chapter 4, pp121-125. N R Patel editor. Marcel Dekker, Inc. New York: Basel.

Pchelka BK, Loupy A, Plenkievicz I et al. 2001. Resolution of Racemic 3Aryl 1 Nitropropane2 ols by Lipase Catalyzed Enantioselective Acetylation. *Tetrahedron: Asymmetry* 12: 2109-2119.

Pérez-Aguilar MC, Gonzáles L, Bonfante-Cabarcas R. 2012. Adenosin deaminasa en el síndrome de inmunodeficiencia combinada severa. *Invest Clin* 53(3): 315-329.

Pérez-Cano HT, Robles-Contreras A. 2014. Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Rev Med MD* 4(3): 186-191.

Qayed WS, Aboraia AS, Abdel-Rahman HM, Youssef AF. 2015. Lipase Catalyzed Enantioselective Kinetic Resolution of Alcohols. *J Chem Pharm Res* 7(5): 311-322.

Quiñones L, Rosero M, Roco A et al. 2008. Papel de las enzimas citocromo P450 en el metabolismo de fármacos antineoplásicos: situación actual y perspectivas terapéuticas. *Rev Med Chile* 136(10): 1327-1335.

Raja MMM, Raja A, Imran MM et al. 2011. Enzyme application in diagnostic prospects. *Biotechnology* 10(1): 51-59.

Raveendran S, Parameswaran B, Beevis S et al. 2018. Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. *Food Technol Biotechnol* 56(1): 16-30.

Ruiz- Martínez L. 2018. Biocatalizadores como herramientas en el desarrollo sostenible de fármacos (I). Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

Serna-Cock L, Zetti-Arenas A, Ayala-Aponte A. 2009. Use of Enzymatic Biosensors as Quality Indices. A Synopsis of Present and Future. Trends in the Food Industry. *Chilean J Agri Res* 69(2): 270-280.

Sharma R, Chisti Y, Chad-Banerjee U. 2001. Production, Purification, Characterization and Applications of Lipases. *Biotechnology Advances* 19: 627-662. Industry. *Food Technol Biotechnol* 56(1): 16-30.

Shelnut EL, Nikas SP, Finnegan DF. 2015. Design and synthesis of novel prostaglandin E₂ ethanolamide and glycerol ester probes for the putative prostamide receptor (S). *Tetrahedron Lett* 56(11):1411-1415.

Shojaei S, Kiumarsia A, Rezaei-Moghadam A. 2014. Perillyl alcohol (monoterpene alcohol), Limonene. Chapter 2, pp7-32. En *Natural Products and Cancer*

Signaling: Isoprenoids, Polyphenols and Flavonoids. F Tamanoi, S Bathaei editores

Soni H, Kango N. 2013. Microbial mannanases: properties and applications. Chapter 4, pp41-46. En *Advances in Enzyme Technology*. P Shukla, BI Pletschke, editores. Springer.

Szaleniec M, Wojtkiewicz AM, Bernhardt R, Borowski T, Donova M. 2018. Bacterial steroid hydroxylases: enzyme classes, their functions and comparison of their catalytical mechanisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 102(19): 8173.

Tintos-Hernández JA, Dávalos-Rodríguez IP. 2011. Deficiencia de Adenosina Deaminasa (ADA): aspectos clínicos, bioquímicos, moleculares y de tratamiento. *Rev Invest Clin* 63(1): 75-83.

Tórrez-Bacete J. 2005. Clonación, separación y caracterización de las penicilasas de *Streptomyces lavandulae* y *Actinoplanes utahensis*. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.

Urlacher VB; Girhard M. 2019. Cytochrome P450 monooxygenases in biotechnology and synthesis biology. *Trends in Biotechnology* 37(8): 882-897.

Vázquez-Flores H, Asz-Sigall D. 2011. Hialuronidasa: aplicaciones dermatológicas. *Dermatología CMQ* 9(4): 292-294.

Vázquez-Award D, Ospino AM. 2020. Anticonceptivos Orales Combinados. *Ginecol Obstet Mex* 88(supl 1): S13-S31.

Vega DM. 2017. Uso clínico de glucocorticoides. Uso de esteroides sistémicos en patologías frecuentes. *Salud y Medicina*

Voet D, Voet JG, Pratt CW. 2008. Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel Molecular. 2ª edición. Editorial Médica Panamericana. Pp389-390



VARIACIÓN DEL CAMPO ELÉCTRICO ATMOSFÉRICO DE LA TROPÓSFERA BAJA EN LA CIUDAD DE VALENCIA (VENEZUELA)

Ronald Millan^{1,2}, Oswaldo Guerra¹; Nelson Falcon¹;

¹Laboratorio de Física de la Atmosfera, Dpto. de Física, FACYT Universidad de Carabobo, ²Dpto de Física, estudios básicos, Facultad de Ingeniería, Universidad de Carabobo.

Correo electrónico: rmillan@uc.edu.ve, ogguerra@gmail.com, nelsonfalconv@gmail.com

Resumen

Estudiar las variaciones locales del campo eléctrico atmosférico ($E \sim 100$ KV/Km en la tropósfera) es importante en los mecanismos microfísicos de aerosoles, disrupción de gotas de lluvia, formación de electrometeoros y descargas nube-tierra. Se presenta detalles de elaboración de “Molinos de Campo”, como medidores de desplazamiento eléctrico, siguiendo la metodología de Carlson y Wilson, mediante un capacitor variable de placas plano-paralelas, cuyas placas sensoras son amplificadas por un circuito operacional. La calibración se efectuó generadores de Van Der Graaff. Los resultados en Valencia a nivel de superficie, arrojaron valores medios del orden de 101 V/m en condiciones de buen tiempo, y del orden de 700 a 2600 V/m en condiciones de tormenta, y con variabilidad horaria compatible con la curva de Carnegie del continente. Se concluye que los valores medios y la variabilidad observada es la característica de regiones tropicales de bajo nivel cerámico.

Palabras claves:

Palabras clave: Electrometeoros, Campo eléctrico Atmosférico, Curva de Carnegie.

Variation of the atmospheric electric field of the lower troposphere in Valencia (Venezuela)

Abstract

Studying local variations of the atmospheric electric field ($E \sim 100$ KV/Km in the troposphere) is important in the microphysical mechanisms of aerosols, raindrop disruption, electrometeor formation, and cloud-ground discharges. Details of the elaboration of "Molinos de Campo" are presented, such as electrical displacement meters, following the Carlson and Wilson methodology, by means of a variable capacitor of plane-parallel plates, whose sensor plates are amplified by an operating circuit. The calibration was carried out with Van Der Graaff generators. The results in Valencia city at surface level, yielded mean values of the order of 101 V/m in good weather conditions, and of the order of 700 to 2600 V/m in stormy conditions, and with hourly use compatible with the curve Continental Carnegie. It is concluded that the average values and the additional observed is the characteristic of the tropical regions of low ceramic level.

Key words: Electrometeors, Atmospheric Electric Field, Carnegie Curve.

1. Introducción

En la atmósfera terrestre existe un campo eléctrico cuasi estático que varía con respecto a la altura. A diferencia del gradiente de presión y temperatura, la variación del campo eléctrico no ha sido bien descrita, y no se conoce con certeza su origen; sin embargo se conoce que esta variación del campo eléctrico local es el responsable de la actividad eléctrica atmosférica (Iribarne y Cho, 1980; Feynmann *et al* 1972; Bering *et al* 1998). Los electrometeoros (Rayos, relámpagos y “Fuegos de Santelmo”) están comúnmente presentes en las nubes de tormentas y son vinculadas a las variaciones del campo eléctrico terrestre a nivel de superficie durante las descargas eléctricas (Uman 1984; Rarkov y Uman 2003).

Diversas hipótesis se han propuesto para modelar el incremento del campo eléctrico local en el interior de las nubes de tormentas, y la formación subsiguiente de las corrientes de avalancha que originan los electrometeoros (rayos y relámpagos) sin que haya alcanzado todavía un consenso o explicación satisfactoria en los mecanismos de cargas de las celdas nubosas (MacGorman y Rust 1998, Rogers 1977, Falcón *et al* 2000).

La expresión empírica para la intensidad del campo eléctrico terrestre válida para la tropósfera inferior en condiciones de “buen tiempo” y latitudes bajas está dada por (Gringel *et al* 1986):

$$\vec{E}(z) = -[93.8e^{-4.527z} + 44.4e^{-0.375z} + 11.8e^{0.121z}] \hat{z} (KV/Km) \quad (1)$$

Existiendo además una variación periódica del campo eléctrico terrestre respecto al tiempo Universal, denominada curva de Carnegie (Fullekrug, M. *et al* 1999); su valor medio superficial varía desde 120 V/m a las 19:00 UT y disminuye hasta 90 V/m a las 04:00 (Figuras 1 y 2).

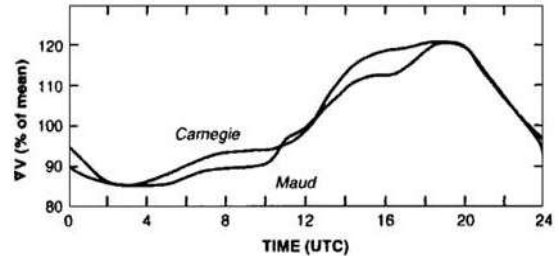


Fig. 1. Curva de Carnegie (Fuente: Fullekrug, M. et al 1999)

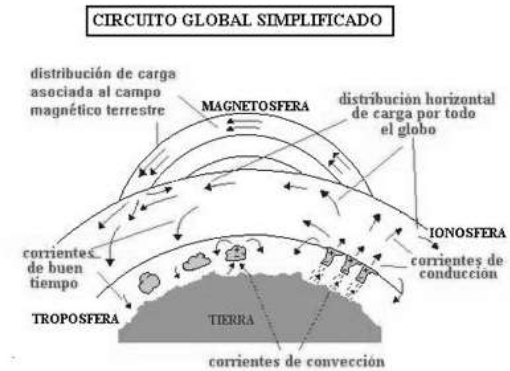


Fig. 2. Esquema de distribución global del campo eléctrico (Fuente: Falcón et al 2000).

2. Materiales y Métodos

Los valores instantáneos a nivel superficial del campo eléctrico terrestre pueden ser “fácilmente” determinados por medio de electrómetros (Cunning, M; Nicholson, H.; y Porto, D. 1981) o colectores de carga iónica (Carlson 1999a), que se fundamentan en condensadores de placas plano-paralelas o cilíndricos especialmente contruidos, aún con materiales de bajo costo (Carlson, 1999b).

En este trabajo se usará el diseño propuesto por Carlson (1999), por ser de fácil elaboración con los materiales en nuestra Facultad; el mismo consta de 2 partes: (a) un colector de cargas basado en un condensador plano paralelo de disco giratorio, elaborado con una carcasa metálica y (b) un circuito amplificador como lo indica la figura 3.

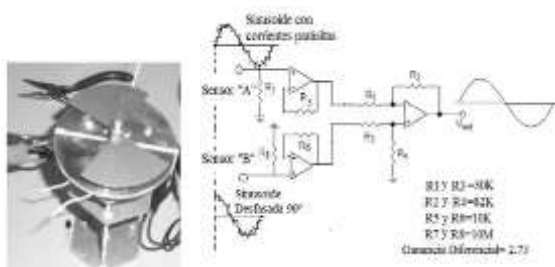


Fig. 3. Colector de cargas (Izq.), Circuito amplificador diferencial (Der.) (Fuente Propia)

El principio de funcionamiento es descrito a continuación: Al enfrentarse la placa pantalla y uno de los sensores se genera entre estos una capacitancia, la cual, al disminuir linealmente por la rotación de aquella, se producirá una disminución proporcional de la carga conforme se traslada de un enfrentamiento total de placas a un enfrentamiento con capacitancia nula, para luego realizar el proceso inverso: de nula a máxima, como se observa en la figura 4.

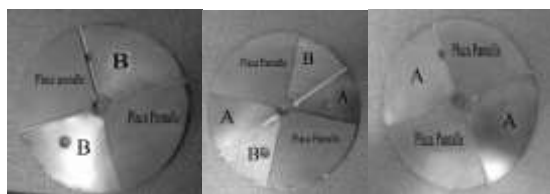


Fig. 4. Apantallamiento del sensor "A" : 100% (Izq.), 50% (Centro) y 0% (Der.) (Fuente Propia)

Dicho giro del disco encima de los sensores, genera una variación de capacitancia por el efecto de apantallamiento del campo eléctrico en los sensores, la cual a su vez genera una variación de carga (y de corriente), donde el período de oscilación de la corriente corresponde al período de oscilación del motor que hace girar el disco, tal como se observa en la figura 5.

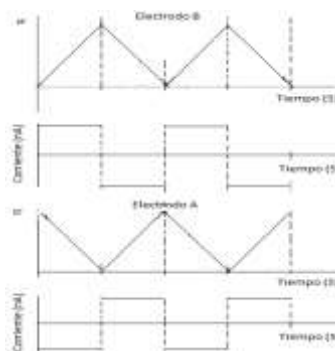


Fig. 5. Corriente inducida, conforme gira el disco, en función del tiempo en los electrodos "A" y "B" (Fuente Propia).

A la salida del diferencial (V_{out}) de la figura 3 (Der.) se obtuvo la señal libre de cualquier corriente parásita y amplificada con un factor de ganancia de 2,73. Las resistencias R7 y R8 cumplen la función de un conversor corriente-voltaje ya que las corrientes inducidas en la placa sensora (del orden de 10^{-9} A) son muy difíciles de detectar con equipos comerciales, luego el empleo de valores de resistencia elevados permiten un voltaje medible. Para determinar dirección (polaridad) de la señal se dispuso del diagrama esquemático de la siguiente figura 6.

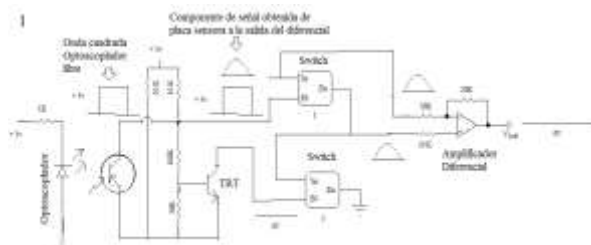


Fig. 6. Diagrama del detector de polaridad del campo eléctrico. (Fuente Propia).

En la figura 6 se observa que, cuando la paleta no bloquea la luz del optoacoplador, se genera una onda cuadrada, hacia por la entrada E0 del switch 1. El funcionamiento del switch consiste en que, al introducir un nivel DC positivo por E0, se cierra y a la salida Zn tendría la señal de la entrada Yn. En cambio cuando tenemos un nivel de 0 V en E0, se abre el switch y no permite que la señal de Yn salga por Zn, cerrándose y dejando pasar la señal de Yn a través de Zn; a la vez que permanece abierto el transistor TRT, lo que ocasiona que a

la entrada de E0 de switch se tenga un nivel de 0 V y por lo tanto permanezca abierto. Esto ocasiona que a la entrada del amplificador diferencial tengamos la misma señal en ambos terminales, por lo que a la salida tendríamos un nivel de 0 V. La señal que se introduce por el terminal Yn del switch 1 es la que viene de la salida del amplificador diferencial de la Fig. 3 (Der.). Para tal fin se usó un chip HEF4066

Luego, debido al giro constante de la placa pantalla y de la paleta del sensor óptico, viene el segundo semiciclo de la señal del sensor, en el momento en el que la paleta bloquea la luz de aquel, por lo que se obtiene un nivel de 0V en el terminal E0 del switch 1 y un nivel DC positivo en el terminal E0 del switch 2. Por lo tanto, ahora, a la entrada del amplificador se tendría en el terminal “-“la componente de la señal de la entrada Yn, y en el terminal “+”un nivel de 0V. Al restarse generarían a la salida del amplificador, la señal de la entrada de Yn, cuyo signo coincide con la polaridad de la señal de entrada del sensor, tal como se observa en la figura 7.

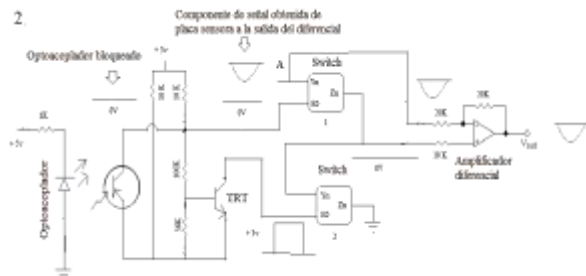


Fig. 7. Diagrama esquemático del detector de polaridad cuando el optoacoplador se encuentra bloqueado. (Fuente propia)

En la figura 8, se aprecia el Molino de Campo ya terminado. El Display LCD muestra la lectura en V. Este molino de campo está diseñado para medir el campo eléctrico atmosférico, por ello es necesaria la conexión a tierra de la carcasa del equipo. Se debe ubicar el molino con los discos electrodos apuntando en dirección a tierra (boca abajo), para medir voltaje entre 2 superficies equipotenciales, lo que implica que si se ubicara boca arriba se medirían las múltiples equipotenciales ubicadas desde la

posición del equipo hacia arriba, lo cual distorsionaría las medidas.



Fig. 8: Dimensiones y partes del prototipo de Molino de campo. (Fuente Propia)

La calibración se realizó con un generador de Van der Graaff, variando las distancias a 30 y a 15 cm, para la detección en el osciloscopio, luego, usando un capacitor de placas plano paralelas, de area 50cm x50 cm, con el dispositivo en su interior, y una fuente DC de 32 Voltios se procedió a la calibración de escalas Voltios Versus V/m.tal como se muestra en la fig. 9.

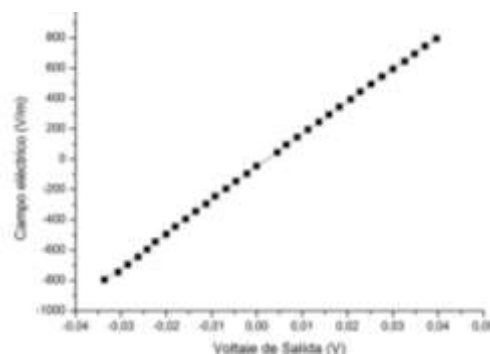


Fig. 9. Calibración de molino de campo

Al realizar un ajuste lineal de la Fig. 9, se obtuvo la ecuación de conversión entre el voltaje de salida del molino de campo (en voltios) a valores de campo eléctrico (en unidades de V/m):

$$E = 21851V_{salida} - 56.40 \quad (2)$$

La tabla 1 resume las características del dispositivo

Rango de operatividad -10°C a 50°C

| | |
|------------------------------|---|
| Retardo en adquisición datos | 1 Segundo. |
| Rango/Resolución: | ±25000 V/m |
| Precisión: | ±10% |
| Ruido: | ±20 V/m |
| Tamaño | 15cm x 10cm x 12cm |
| Peso: | 400 gr |
| Batería: | Batería de 9 V , 6 horas a máximo consumo |

Tabla 1: Especificaciones técnicas del molino de Campo.

3. Resultados y Discusión

Las medidas de campo eléctrico atmosférico fueron realizadas en el municipio Naguanagua Valencia, Edo Carabobo 10°13'35,24" N, 67°58'23,18" W, a 467 m.s.n.m.

Se puede observar en la figura 10 la intensa variación del campo eléctrico durante el desarrollo de una tormenta. Los picos observados en la gráfica corresponden con descargas eléctricas atmosféricas, notándose la estrecha relación entre estas y el campo eléctrico. Finalizando la tormenta a las 21:30, observándose después la estabilización de los valores del campo eléctrico local.

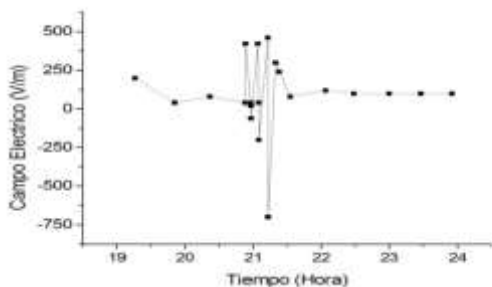


Fig. 10: Variación local de campo eléctrico para tormenta del 20-09-2015. Fuente: propia.

Resultados análogo se obtuvieron al día siguiente, como muestra la figura 11.

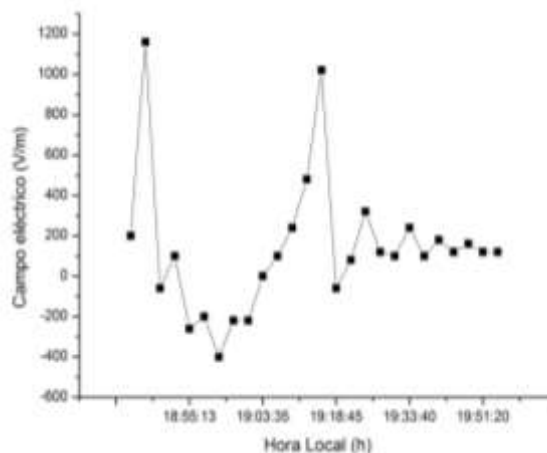


Fig. 11: Variación de campo eléctrico atmosférico en función del tiempo para tormenta eléctrica ocurrida el 21-09-2015 Fuente: propia.

No se observa patrón característico de variabilidad entre tormentas. También se observó que la medida, no dependía estrictamente de la precipitación en sí, debido a que, en la tormenta del día 20 se realizó una medida a las 9:15 pm, con precipitación intensa, es 400 V/m; de la misma forma se realizó una medida en la tormenta del día 21, durante un breve cese de la precipitación a las 19:10 horas, y el valor del campo eléctrico medido a ésta hora se ubicó en 500 V/m. Se reporta valor promedio del campo eléctrico de 200 V/m una vez finalizada la tormenta (Fig. 11).

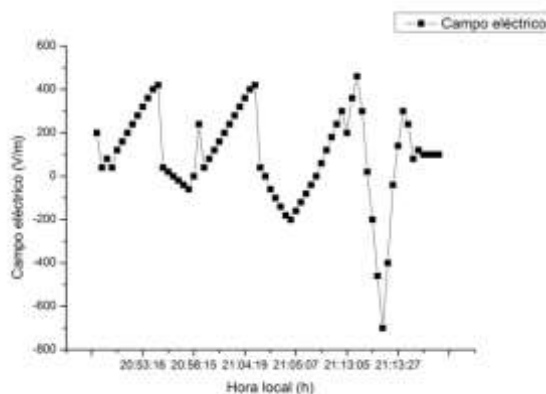


Fig. 12: Campo eléctrico en función del tiempo en condiciones de tormenta del día 26-09-2015.

Se puede observar en la Fig.12 la intensa variación del campo eléctrico durante el desarrollo de la tormenta (Los picos observados en la gráfica corresponden con descargas eléctricas atmosféricas, demostrándose con ello la estrecha relación entre estas y el campo eléctrico) finalizando dicha tormenta a las 21:30, observándose después de dicha hora la estabilización de los valores del campo eléctrico local con promedio de 170 V/m.

Adicionalmente, para descartar perturbaciones del campo eléctrico por efectos parásitos locales se procedió a medir un lugar alejado de fuentes electromagnéticas artificiales y bajo condiciones de buen tiempo, escogiéndose el extremo sureste de la Península de Paraguaná; coordenadas geográficas: 11°49'76.9"N, 70°15'7.30"W a nivel del mar. Se reportan variaciones locales del campo eléctrico del orden de los 80 V/m en la región costera de Venezuela en condiciones de buen tiempo.

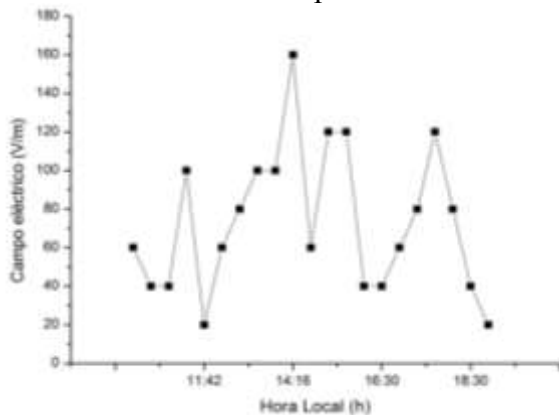


Fig 13. Campo eléctrico en la península de Paraguaná en condiciones de buen tiempo. Tiempo de estudio: 24-08-2015.

4. Conclusiones

Se verificó la efectividad del diseño del molino de campo, en la configuración propuesta por Carlson para elaboración de un electrómetro que permita medir variaciones rápidas y leves del campo eléctrico atmosférico.

Las calibraciones mostraron la sensibilidad y respuesta lineal, así como el bajo ruido electrónico, destacando el uso del molino de campo como una herramienta para el estudio de los electrometeoros.

Se observó, a través de la comparación de las mediciones del campo eléctrico realizadas durante las tormentas de los días 20 y 21-09-2015 variaciones rápidas del mismo (del orden de los segundos), las cuales ocurrieron tanto con precipitación intensa (día 20-09-2015) como sin precipitación (intervalo de tiempo de 10 minutos el día 21-09-2015) lo cual parece indicar que la precipitación en sí misma no influye de manera determinante en las variaciones locales del campo eléctrico.

Se concluye que los valores medios y la variabilidad observada es la característica de regiones tropicales de bajo nivel cerámico, en condiciones de buen tiempo.

5. Agradecimientos

Se agradece el financiamiento a través del FONACIT bajo el N° 2011-000326.

6. Bibliografía

- Bering III, E. A.; Few, A. y Benbrook (1998) The global electric Circuit, Physics Today, October 24-30.
- Carlson, S. (1999a) Taller y Laboratorio: Un Contador de Iones Atmosféricos Investigación y Ciencias 11, 83-85.
- Carlson, S. (1999b) Taller y Laboratorio: Detección de la electricidad Atmosférica Investigación y Ciencias 09, 82-84.
- Cunning, M.; et al (1981) Measurement of the atmospheric electrostatic potential gradient near sea level, Am. J. Ph. 49, 12, 1178-1180.
- Chalmers J.A. (1967), Atmospheric Electricity. Pergamon Press 2da Ed. N.Y., 515-517.
- Ebert, F. (1968) Moderne Messmethoden der

Physik, Edt. Alemana de ciencias VEB, Berlín,.

Falcón N., et al. (2000) Microfísica del Relámpago del Catatumbo, Ingeniería UC, 7, 1, 47-53.

Falcón N. et al (2000) Modelo Electroatmosférico del Relámpago sobre el Río Catatumbo. Ciencia 8, 2, 155-167.

Fullekrug, M. et al (1999) J. Atmos. Solar-Terr. Phys. 61:745-750.

Gringel W. et al (1986) Electrical structure from 0 to 30 Km: in the Earth's Electrical Enviroment. Krider, E.P. y Roble, R.I. Ed. Washington DC National Academy Press, pp 166-182.

Iribarne S.V. and Cho H.R. (1980) Atmospheric Physics. D. Reidel Pub. 129-146.

MacGorman D.R. and Rust W.D. (1998) The Electrical Nature of Storms. Oxford Univ. Press, N.Y.

Uman M.A. (1984), Lightning. McGraw Hill NY.

Rarkov V. y Uman M. (2003), Lightning: Physics and Effects. Cambridge U. Press, pp 10-12.

Shawn, C. (1999) Detección de la electricidad atmosférica, Investigación y Ciencia 276, 82-84.



AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE AMILASAS PROVENIENTE DE BACTERIAS TERMÓFILAS DEL CENTRO TERMAL LAS TRINCHERAS. VENEZUELA.

Adarelys Andrade, Lellys M. Contreras

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela. *valbuenavilchez@gmail.com

Resumen

Geobacillus stearothermophilus, una cepa bacteriana termófila moderada fue aislada de las aguas del manantial geotérmico de Las Trincheras. Su crecimiento en medios de cultivo suplementados con almidón 1% p/v indicó la posible producción de amilasas. El crecimiento bacteriano y la actividad amilolítica máximos ocurrieron a las 40h de cultivo en un medio líquido suplementado con almidón 1% p/v, a 55°C y en aerobiosis. Luego de la preparación de un sobrenadante libre de células y de su precipitación con acetona 50% fría, el precipitado obtenido mostró actividad amilolítica, alcanzando valores de actividad enzimática máximos a 60°C y pH 6,0 en el medio líquido. Los perfiles zimográficos detectaron 3 polipéptidos asociados a la actividad amilolítica con pesos moleculares aparentes de 60-66 kDa y 1 con 22 kDa.

Palabras claves: *G. stearothermophilus*, amilasas, termófilos, aguas termales.

Isolation and characterization of amylases from thermophilic bacteria at Centro Termal Las Trincheras, Venezuela

Abstract

Geobacillus stearothermophilus, a moderate thermophilic bacterial strain was isolated from waters of a geothermal stream localized at Las Trincheras. Its growth in 1% p/v starch supplemented media suggested the possible production of amylases. The bacterial growth and the amylolytic activity achieved maximum values at 40h incubation, 55°C, and aerobiosis in a liquid medium supplemented with 1% p/v starch. After the preparation of a bacterial cell free supernatant and cold 50% v/v acetone precipitation, the precipitate showed amylolytic activity, which exhibited maximum activity at 60°C and pH 6.0. The zymography patterns indicated 3 polypeptides associated to the enzymatic activity, whose apparent molecular weights were 60-66 kDa and 1 of 22kDa.

Key words: *G. stearothermophilus*, amylases, thermophiles, hot springs.

1 Introducción

Las amilasas (E.C.3.2.1.1), endoglucanasas, hidrolizan almidón, glucógeno y polisacáridos relacionados mediante la hidrólisis de enlaces glucosídicos α -1,4 internos (Shaw *et al.*, 1995; Coronado *et al.*, 2000; Mielenz, 1983), encontrándose presentes en una amplia variedad de bacterias, hongos, plantas y animales. Su principal función es la de suministrar maltosa y oligosacáridos, generados por su acción catalítica sobre sus sustratos, para satisfacer las necesidades metabólicas del organismo. La degradación enzimática de almidón a nivel industrial por amilasas ha reemplazado sustancialmente los procesos tradicionales de hidrólisis por catálisis ácida (Pandey *et al.*, 2000; Underkofler *et al.*, 1965). Actualmente las amilasas son utilizadas en una amplia variedad de actividades industriales: en procesos de licuefacción, para la fabricación de maltosa y almibares ricos en fructosa y maltotetrosas, en la fabricación de pan, en procesos fermentativos para la producción de bioetanol, en la eliminación de granos de almidón en textiles, en el tratamiento de aguas residuales conteniendo almidón, en la fabricación de detergentes y como aditivos digestivos en productos para consumo humano y animales (Aiyer, 2005; Inram-Bhokari *et al.*, 2016; Gohol *et al.*, 2013; del Moral *et al.*, 2015; Lukong, 2014-2015). El uso de enzimas termófilas para procesos industriales biotecnológicos las hace particularmente atractivas debido a que mantienen su actividad catalítica a temperaturas relativamente altas, necesarias usualmente para la producción industrial, lo cual no es una propiedad de las enzimas

homólogas mesófilas (Niehaus *et al.*, 1999; Malhotra *et al.*, 2000). Se ha reportado la producción de amilasas por varios géneros bacterianos termófilos, tal vez el más conocido es *Bacillus*, y las especies *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. stearothermophilus*, *B. caldolyticus*, *B. brevis*, *B. acidocaldarius* y *B. thermoamyloliquefaciens* (Ohdan *et al.*, 1999; Campbell, 1995; Malhotra *et al.*, 2000; Egelseer *et al.*, 1995; Mielenz, 1983). Srisvastava & Baruah, 1986, reportan una actividad amilolítica expresada por *B. stearothermophilus* con actividad máxima a 82°C y pH 6,9. Brown *et al.*, 1990, caracterizan una amilasa aislada de la archaeobacteria *Pyrococcus furiosus* con actividad máxima a 100°C. Shaw *et al.*, 1995, reportan una amilasa a 70°C y pH 5,5-6,5 aislada de *Thermus sp.* Igarashi *et al.*, 1998, reportan una amilasa aislada de *B. alcalófilo* trabajando a 55°C y pH 8,0-8,5. Malhotra *et al.*, 2000, aíslan una amilasa de *B. thermooleovorans* NP54 con actividad máxima a 100°C y pH 8,0. Najafi *et al.*, 2005 reportan una amilasa de *B. subtilis* trabajando a 55°C y pH 6,0. Dadas estas consideraciones y considerando que en Venezuela, en la población de Las Trincheras, estado Carabobo, existe un manantial geotermal, considerado uno de los más calientes del planeta (Ojeda, 1995), es factible e importante estudiar las actividades enzimáticas termófilas provenientes de la microbiota presente en este microambiente. En este manuscrito se describe una metodología para aislar y caracterizar bacterias termófilas productoras de amilasas.

2 Materiales y Métodos

1-Aislamiento y selección de la cepa bacteriana.

Muestras de agua termal (55°C y 87°C) se colectaron en termos previamente esterilizados y fueron trasladadas al laboratorio para su posterior procesamiento. La población bacteriana total se obtuvo al filtrar 500 mL de agua termal a través de una membrana (0,45µm tamaño de poro), previamente esterilizada, la cual fue transferida a 50 mL de caldo nutritivo (HIMEDIA) e incubadas en un baño de agua termostataado a 55°C, con agitación (70 rpm) y en aerobiosis; el crecimiento bacteriano se evidenció por desarrollo de turbidez en los cultivos. Alícuotas de 1 mL de estos cultivos, sembrados en placas de agar-almidón (AA-Alm), se incubaron por 24h en las condiciones antes descritas. La actividad amilolítica se determinó cualitativamente mediante tinción con lugol, la aparición de zonas transparentes sobre un fondo azul oscuro evidenció la actividad enzimática. El cultivo que presentó la mayor actividad fue el preparado con agua a 55°C, consecuentemente una colonia de tal cultivo fue elegida y denominada Sist1A para efectuar los experimentos descritos a continuación.

2-Optimización de medio de cultivo para la producción de amilasa.

La cepa Sist1A fue crecida inicialmente en caldo nutritivo (HIMEDIA) o en un medio mineral salino, ambos líquidos y suplementados con almidón 1%p/v (Sigma). Posteriormente y por consideraciones que se explicarán en la

sección de resultados, la cepa fue transferida a fiolas de 500 mL conteniendo 150 mL de un medio líquido suplementado con almidón 1% (medio MA) conteniendo: CuSO₄ 0,00001% p/v, FeSO₄ 0,0001% p/v, MgSO₄.7H₂O 0,00002% p/v, ZnSO₄ 0,00005% p/v, NaCl 0,00005% p/v, NH₄SO₄ 0,0001% p/v, CaCl₂.2H₂O 0,00005% p/v, extracto de levadura 0,3% p/v (Difco Laboratories), triptona 0,3% p/v (Sigma) en tampón fosfato 0,2M, pH7,0. Las incubaciones se realizaron a 55°C con agitación constante (70 rpm), aerobiosis. El crecimiento bacteriano se siguió por absorción a 540 nm en función del tiempo de cultivo.

3-Characterización morfológica e identificación taxonómica de la cepa.

La morfología de las colonias se efectuó visualmente mediante una lupa Konus, por la tinción de Gram (Beveridge & Graham, 1991) y la identificación molecular se realizó por amplificación (PCR) y secuenciación parcial del gen ARN 16S (Colección española de cultivos tipo).

4-Preparación del extracto libre de células y precipitación de la actividad amilolítica.

Después de 37h de incubación a las condiciones indicadas en el aparte 2, cultivos idénticos se centrifugaron a 10000 rpm, a 4°C por 15 min en una centrifuga refrigerada (ALC PK121R), obteniéndose 1L de sobrenadante libre de bacterias (muestra SN), el cual fue concentrado por calentamiento a 55°C hasta un volumen final de 100 mL (muestra SNc). Al extracto concentrado se adicionó acetona fría hasta obtener una concentración de 50% v/v. La operación se efectuó a 4°C, obteniéndose

un precipitado el cual se obtuvo por centrifugación a 10000 rpm por 10 min y se resuspendió en 40 mL de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,0 (muestra P1). Paralelamente, el sobrenadante acetónico obtenido (muestra SNa) se secó a 55°C y el residuo se disolvió en 10 mL de agua desionizada.

5-Determinación de la actividad amilolítica.

La actividad de amilasa se determinó cuantitativamente por el método colorimétrico del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNSA), (Miller, 1995). Las lecturas se efectuaron en un espectrofotómetro (Thermo Spectronic Genesys 10uv) a 540 nm y la cantidad de maltosa generada se calculó en base a una curva de calibración de maltosa (0,1 a 0,8 mg), de acuerdo a la ecuación generada por regresión lineal ($y = 1,0059x$; $R^2 = 0,9871$). Se analizaron alícuotas de 10 μ L de cada muestra incubándose por 1h a 55°C y pH 7,0. En las experiencias del efecto de la temperatura, la actividad se determinó a las temperaturas respectivas y pH 6,0. La unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima requerida para producir un μ mol de maltosa por minuto bajo las condiciones del ensayo.

6-Crecimiento de la cepa Sist1A y expresión de la actividad amilolítica en medio MA.

Alícuotas de cultivos bacterianos crecidos en medio MA e incubados a 55°C durante 96h y retiradas a diferentes tiempos, suministraron las herramientas para determinar su crecimiento y la actividad amilolítica en dicho medio. La

absorbancia a 540 nm suministró el curso de crecimiento del cultivo y la determinación de azúcares reductores indicó la secreción de amilasa al medio de cultivo.

7-Efecto de pH y temperatura sobre la actividad amilolítica.

La actividad enzimática se determinó en el intervalo de pH comprendido entre 4,0 y 9,0, a 55°C, en muestras provenientes de incubaciones con 37h de crecimiento, utilizando en los medios de ensayo los siguientes tampones: acetato de sodio 50 mM para los pHs 4, 5 y 6; tris-HCl 50 mM para los pHs 7, 8 y 9 y glicinato de sodio 50 mM para pH 10.

El efecto de la temperatura se determinó al incubar previamente la muestra enzimática durante 1h a las diferentes temperaturas (4, 25, 40, 50, 55, 60, 70 y 80°C) a pH 6,0.

Para ambos ensayos se utilizó el sobrenadante libre de células sin ningún tratamiento (SN), luego de las incubaciones indicadas, alícuotas de los medios de reacción se sometieron a análisis de azúcares reductores (aparte 5).

8-Determinación de perfiles polipeptídicos y actividad amilolítica de las muestras.

Alícuotas apropiadas de las muestras SN, SNC, P1 y SNa se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida 10% no desnaturizante, aplicando un potencial constante de 100-150 V durante 90 min (Laemmli, 1970). Los geles fueron teñidos con plata (Deustscher, 1990) y las masas moleculares de los polipéptidos separados se calcularon mediante una mezcla patrón de proteínas de pesos moleculares conocidos (β galactosidasa

116,25 kDa; fosforilasa 97,4 kDa; suero albúmina 66,2 kDa; ovoalbúmina 45,0 kDa; anhidrasa carbónica 31,0 kDa; inhibidor de tripsina 21,5 kDa; lisozima 14,4 kDa y aprotina 6,5kDa). Adicionalmente, la actividad amilolítica de los polipéptidos separados se determinó mediante zimografía en geles de poliacrilamida 10% copolimerizados con almidón 0,1% p/v, en condiciones no desnaturizantes. Después de la corrida electroforética el gel fue lavado con tritón X-100 1% durante 10 min, luego se practicaron 5-6 lavados con agua destilada y se incubó por 3h en una solución de tris-HCl 50mM/CaCl₂ 1mM, pH 7,0. Finalmente, el gel se tiñó con lugol, la aparición de zonas blancas sobre un fondo azul oscuro indicó actividad amilolítica.

3 Resultados y discusión.

Morfología bacteriana, actividad amilolítica e identificación taxonómica.

Los cultivos iniciales con bacterias aisladas de aguas a 55 y 87°C (sistemas 1

y 2 respectivamente) mostraron crecimiento bacteriano y actividad amilolítica evidente, pero el cultivo a 55°C superó considerablemente la actividad mostrada en el cultivo a 87°C, consecuentemente se decidió aislar colonias bacterianas del cultivo 1. Esta cepa denominada Sist1A, cultivada en placas AA-Alm, presentó colonias redondeadas, color amarillo pálido, poco brillo, bordes lisos y elevación moderada; la tinción de Gram la identificó como un bacilo Gram+ (figura1).

La secuenciación de un fragmento del gen ARN 16S la asignó, con una semejanza de 99,7%, a la especie *Bacillus stearothermophilus*. La presencia de bacterias con actividad de amilasas en las aguas termales de Las Trincheras fue demostrada por Armado, 1997, al identificar 26 morfotipos bacterianos capaces de degradar almidón.

Crecimiento bacteriano asociado a la actividad amilolítica en medio líquido AM.

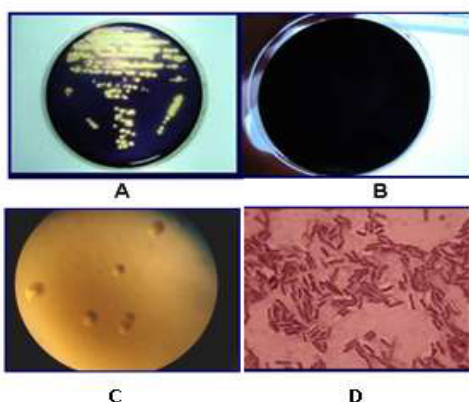


Fig.1. Morfología de la cepa SistA1. A: Placa con inóculo y actividad amilolítica en medio con almidón 1%. Lugol. B: placa sin inóculo bacteriano y con almidón. Lugol. C: Colonias de SistA1. D: Tinción de Gram.

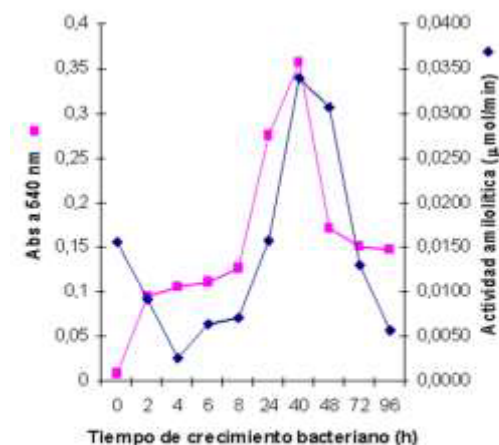


Fig.2. Crecimiento bacteriano y actividad amilolítica de la cepa Sist1A a 55°C en función del tiempo de cultivo

En la figura 2 se muestra el crecimiento de la cepa Sist1A y la actividad amilolítica en función del tiempo de incubación en medio MA. El crecimiento, determinado por absorción a 540 nm, se inició a las 2h de cultivo incrementando considerablemente desde las 24h hasta las 40h, alcanzando valores máximos de 0,35 unidades de absorbancia (Uabs), a las 48h comenzó un ligero descenso que a las 72 y 96h se ubicó en 0,11 y 0,05 Uabs, lo cual indicó la fase de muerte del cultivo.

La actividad enzimática, mínima a las 3h, incrementó paralelamente al crecimiento bacteriano alcanzando valores máximos de 0,035 y 0,030 $\mu\text{mol}/\text{min}$ a las 40 y 48h respectivamente, e iniciar su descenso a valores cercanos a 0,01 y 0,005 $\mu\text{mol}/\text{min}$ a las 72 y 96h de incubación respectivamente.

Parece lógico la sincronización de la división bacteriana con la actividad amilolítica. A tiempos iniciales de cultivo, dextrinas lineales y ramificadas, moléculas no inmediatamente metabolizables, son los productos principales provenientes de la degradación de almidón por una cantidad reducida de amilasas, lo cual provoca una baja tasa de división bacteriana. A tiempos mayores de incubación, las dextrinas son convertidas a maltosa, isomaltosa y glucosa, moléculas rápidamente metabolizadas por las bacterias y adicionalmente es factible el incremento en la cantidad de amilasas presentes, ambos factores podrían sustentar una adecuada velocidad de duplicación. Al agotarse los azúcares metabolizables se instaura la fase de

muerte, la cual también podría estar influenciada por la presencia de proteasas excretadas por las bacterias en respuesta a un empobrecimiento de nutrientes en el medio de cultivo (Armado, 1997).

Efectos del pH y temperatura sobre la actividad amilolítica.

La figura 3 muestra el comportamiento de la actividad de amilasas al variar el pH del

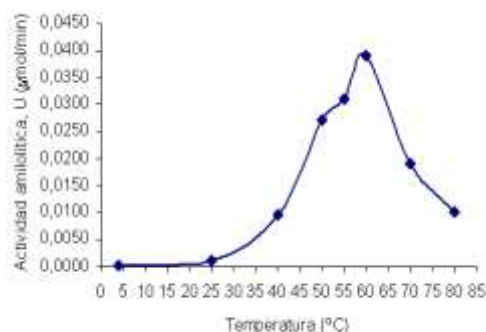


Fig.4. Efecto de la temperatura sobre la actividad amilolítica expresada por la cepa Sist1A a pH 6,0



Fig.3. Efecto del pH sobre la actividad amilolítica expresada por la cepa Sist1A a 55°C

medio de reacción. La actividad máxima (0,014 $\mu\text{mol}/\text{min}$) se detectó a pH 6,0, siendo también apreciable a pH 7,0 (0,01 $\mu\text{mol}/\text{min}$). Valores de pH ácidos (3-5) y alcalinos (8-10) ejercen efectos inhibitorios/desnaturalizantes sobre la actividad enzimática, valores que se ubicaron entre 0,002 y 0,006 $\mu\text{mol}/\text{min}$. Efectos similares han sido reportados por Srivastava *et al.*, 1986; Free, (1993); Shaw *et al.*, 1995; Najafi *et al.*, 2005.

El efecto de la temperatura, mostrado en la figura 4, indicó la actividad máxima (0,04 $\mu\text{mol}/\text{min}$) a 60°C, mostrando actividad apreciable en el intervalo de temperaturas

de 50-55°C; a los 70 y 80°C la actividad descendió a niveles de 0,01-0,02 μmol/min. El aumento de la actividad en el intervalo de 25 a 60°C se debe al

desprotonación (pHs alcalinos) de grupos R de los aminoácidos, constituyentes del sitio activo de las enzimas, induce desplazamientos de grupos esenciales para

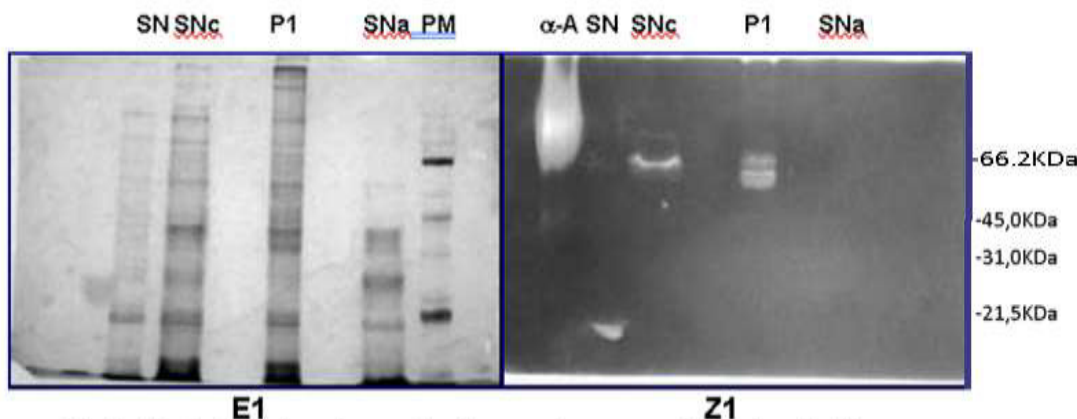


Fig.5. Electroforesis y zimografía de muestras con actividad amilolítica.
α-A: amilasa comercial. SN: sobrenadante libre de células. SNc: sobrenadante concentrado a 50°C. P1: precipitado obtenido por precipitación con acetona. SNa: Sobrenadante de la precipitación con acetona. PM: patrones de peso molecular. **E1:** electroforesis, perfil polipeptídico. **Z1:** zimografía, zonas claras indican la hidrólisis de almidón.

incremento de la energía cinética de las moléculas con el consiguiente aumento del número de choques eficaces entre la enzima y el sustrato, a temperaturas mayores comienzan a aparecer los efectos negativos de la temperatura sobre la estabilidad de proteínas. Efectos similares sobre la actividad amilolítica han sido reportados por Hatman *et al.*, 1995; Igarashi *et al.*, 1998; Najafi *et al.*, 2005, con enzimas aisladas de *B. stearothermophilus*, *Bacillus sp* y *B. subtilis* respectivamente.

En ambos casos, pH y temperatura, los efectos que ejercen estos factores están relacionados a las modificaciones que sufre el sitio activo de la enzima o por la desnaturalización de las mismas. En el caso del pH, la protonación (pHs ácidos) o

el proceso catalítico o la desnaturalización de la molécula al destruir las estructuras secundarias y terciaria de las proteínas (Nelson *et al.*, 2008). Situación similar se produce por el aumento de la temperatura, en este caso vibraciones, rotaciones y desplazamientos de regiones importantes para el proceso catalítico o para la estabilidad de la enzima inducen un descenso o eliminación de la capacidad catalítica.

Perfiles polipeptídicos y amilolíticos mediante electroforesis y zimografía.

En la figura 5 se muestra el perfil polipeptídico y la actividad amilolítica de las 4 muestras descritas en el aparte 4, adicionalmente se analizó una amilasa comercial como control positivo. Al comparar los carriles correspondientes a

SN y SNc se puede concluir que el tratamiento de concentración del sobrenadante libre de células a 55°C fue efectivo en concentrar las proteínas, lo cual es evidente por la cantidad de polipéptidos detectados en el carril SNc (figura 5E1). Adicionalmente, en la figura 5Z1 (zimografía) se detectaron señales de actividad amilolítica ubicadas en la zona de masas moleculares equivalente a 66 kDa correspondientes a SNc y una señal de aproximadamente 22 kDa en el carril SN. Estos resultados constatan el carácter termofílico de la actividad amilolítica y que el tratamiento con acetona y posterior calentamiento no desnaturalizaron, al menos, los polipéptidos ubicados en las zonas señaladas. La muestra P1, al igual que la SNc, mostró un perfil polipeptídico complejo, detectándose 3 señales con actividad amilolítica en la zona de 60-66 kDa (figura 5Z1). La muestra SNa exhibió un perfil polipeptídico complejo, pero ausencia de polipéptidos con masas moleculares superiores a 45kDa, lo cual la diferencia de lo observado en la muestra SNc; en zimografía SNa no mostró señales de actividad enzimática. La presencia del polipéptido de 22 kDa en la muestra SN, pero su ausencia en P1 podría indicar una muy baja resistencia del polipéptido a 55°C y al tiempo de calentamiento. No fue posible establecer una correspondencia entre polipéptidos detectados en la electroforesis y la zimografía, lo que podría indicar una baja cantidad de amilasas excretadas al medio de cultivo, pero suficiente para degradar el almidón ubicado en las zonas correspondientes del gel. Las masas moleculares reportados por

los 3 polipéptidos detectados son similares a los señalados por Shaw *et al.*, 1995, en *Thermus sp.*; Igarashi *et al.*, 1998, en *B. alcalofilo*; Pfueller & Elliot, 1969, en *B. stearothermophilus*; Freer, 1993, reporta una actividad de 70 KDa en *Streptococcus boris*.

4 Conclusión

La cepa SistA1 asignada a la especie *Geobacillus stearothermophilus*, bacilo Gram+, aislada de las aguas termales de Las Trincheras, excretó al medio de cultivo suplementado con almidón 1%p/v, una actividad amilolítica, la cual fue parcialmente purificada mediante precipitación con acetona 50% fría y calentamiento a 55°C. La actividad amilolítica mostró actividad máxima a 60°C y pH 6,0. Mediante zimografía, la actividad amilolítica estuvo asociada a 3 polipéptidos con masas moleculares en el intervalo de 60-66 kDa y 1 polipéptido de 22kDa solo detectado en el sobrenadante libre de células (sin tratamiento previo).

5 Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por Proyecto Pem 2001002268 del Fondo Nacional Venezolano de Ciencias, Tecnología e Innovación.

Al TSU Darío Valbuena por la diagramación del manuscrito.

6 Bibliografía

- Aiyer, PV. (2005). Amylases and their applications. *Afr J Biotechnol* 4(13):1525-1529.
- Armado, A. (1997). Caracterización de actividades enzimáticas de bacterias termófilas provenientes de aguas termales de Venezuela. Tesis de Licenciatura, Departamento de Química, Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo. Valencia. Venezuela
- Beveridge, TJ; Graham, LL: (1991). Surface layers of bacteria. *Microbiol Rev* 55(4):684-705.
- Brown, S; Constantino, H; Kelly, R. (1990). Characterization of amylolytic enzyme activities associated with the hyperthermophilic archaeobacterium. *Pyrococcus furiosus*. *Appl Environ Microbiol* 56(7):1985-1991.
- Campbell, LL. (1995). Purification and properties of an α -amylase from facultative thermophilic bacteria. *Arch Biochem and Biophys* 54:42-45.
- Coronado, MJ; Vargas, C; Mellado, E; Tegos, G; Drainas, C; Nieto, J; Ventosa, A. (2000). The α -amylase gene amyH of the moderate halophile *Halomonas meridiana*: cloning and molecular characterization. *Microbiology* 146:861-868.
- del Moral, S; Ramírez-Coutiño, LP; García-Gómez, MJ. (2015). Aspectos relevantes del uso de enzimas en la industria de los alimentos. *RelbCi* 2(3):87-102.
- Deutscher, MP. (1990). Guide protein purification. *Methods in Enzimology* 182:438, 484-486
- Egelseer, E; Shocher, I; Sára, M; Sleytr, UB. (1995). The S-Layer from *Bacillus stearothermophilus* DSM 2358 functions as an adhesion site for a high molecular weight amylase. *J Bacteriol* 177(6):1444-1451.
- Freer, SN. (1993). Purification and characterization of the extracellular α -amylase from *Streptococcus bovis* JB1. *Appl Environ Microbiol*.59(5):1398-1402.
- Gohol, V; Duan; G; Maisuria, V. (2013). Industrial enzyme applications in biorefining for starchy materials. En: *Advances in Enzyme Technology*. P. Shukla; BI. Pletschke editors. Springer.
- Hatman, P; Wellerson, R; Tetrault, PA. (1995). *Bacillus stearothermophilus*.I. Thermal and pH stability of amylase. *Appl. Microbiol* 3:7-10.
- Inram-Bokhari, M; Sarwar-Khan, N; Rashid, N. (2016). Industrial technology. Its applications in food and chemical industries. En: *Applied Molecular Biotechnology*; Chapter 22, pp518-527. M. Sarwar-Khan, I. Ahmed-Khan, D Barh editors. CRC Press.
- Igarashi, K; Hatada, Y; Hagihara,H; Saeki, K; Takaiwa, M; Uemura, T; Ara, K; Ozaki, K; Kawai,S; Kobayashi, T; Ito, S. (1998). Properties of a novel liquefying α -amylase from an alkalophilic *Bacillus* isolated and entire nucleotide and amino acid sequences. *Appl Environ Microbiol* 64(9):3282-3289.

- Laemmli, UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lukong, CB. (2014-2015). BCH: 301, Applications of enzymes. pages 1-13.
- Malhotra, R; Noorwez, SM; Satyanarayana, T. (2000). Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent α -amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. *Lett Appl Microbiol* 31: 378-384.
- Mielenz, JR: (1983). *Bacillus stearothermophilus* contains a plasmid-borne gene for α -amylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:5975-5979.
- Miller, GL: (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31: 426-428.
- Najafi, MF; Deobagkar, D; Deobagkar, D. (2005). Purification and characterization of an extracellular α -amylase from *Bacillus subtilis* AX20. *Protein Expr and Purif* 41:349-354.
- Nelson, DL; Cox, MM; Hoskins, AA. (2008). *Lehninger Principles of Biochemistry*. p798. 8th edition. Macmillan learning. USA.
- Niehaus, F; Bertoldo, C; Kahler, M; Antranikian, G. (1999). Extremophiles as sources of novel enzymes for industrial application. *Appl Microbiol Biotechnol* 51:711-729.
- Ohdan, K; Kurik, T; Kaneko, H; Shimada, J; Takada, T; Fujimoto, Z; Mizuno, H; Okada, S. (1999). Characteristics of two forms of α -amylases and structural implication. *Appl Environ Microbiol* 65(10): 4652-4658.
- Ojeda, R. (1995). Aguas termales Las Trincheras. Gráficas Hidalgo C.A. Valencia. Venezuela.
- Pandey, A; Nigam, P; Soccol, CR; Soccol, VT; Singh, D; Mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31:135-152.
- Pfueller, SL; Elliot, WH. (1969). The extracellular α -amylase of *Bacillus stearothermophilus*. *J Biol Chem* 244:48-54.
- Shaw, JF; Lin, FP; Chen, SCh; Chen, HCh. (1995). Purification and properties of an extracellular α -amylase from *Thermus* sp. *Bot Bull of Acad Sin* 36:195-200.
- Srivastava, RAK; Baruah, JN. (1986). Culture conditions for production of thermostable amylase by *Bacillus stearothermophilus*. *Appl Environl Microbiol* 52:179-184.
- Underkofler, LA; Danault, LJ; Hou, EF. (1995). Enzymes in starch industry. *Die Starke* 17:179-184.

GUIA PARA LOS AUTORES

La Revista FARAUTE UC de la Facultad de Ciencias y Tecnología (FACYT) considerará, para su difusión, trabajos inéditos relacionados con las ramas de las Ciencias Básicas y la Tecnología, tanto de carácter técnico como de carácter divulgativo, siempre que el mismo sea el producto de un proceso de investigación objetivo y comprobable. Se aceptan artículos o notas en español e inglés.

Tipos de Trabajos

- Artículos científicos con un máximo de doce (12) páginas.
- Artículos divulgativos de investigación con un máximo de doce (12) páginas.
- Notas Técnicas con un máximo de cinco (5) páginas.
- Artículos de Actualización Científica que resuman el “Estado del Arte” de un área específica de las ciencias y tecnología con un máximo de doce (12) páginas.
- Artículos de invitados especiales con un máximo de cinco (5) páginas.
- Cartas al Editor, que consistan en observaciones técnicas de artículos publicados en la revista.

Requerimientos de formato para manuscritos enviados para su evaluación:

El formato del manuscrito debe seguir las siguientes recomendaciones:

- Tipo de letra: *Times New Roman* 12 ptos, a excepción del título en español.
- Texto del artículo a doble columna a excepción del título, la información del(os) autor(es) y el resumen.
- Espaciado: simple
- Tamaño de papel: Carta con márgenes justificado de 2,5 cm por cada lado.
- Los artículos deben constar de las siguientes secciones:
 - **Título:** en español e inglés. El título en español debe ser en letra Times New Roman, tamaño 14, en mayúsculas, negritas, centrado. Dejando una línea de por medio, en letra tamaño 12, el título en inglés, negrita, en mayúsculas únicamente las iniciales de los nombres, pronombres, verbos, adjetivos y adverbios.

Información del(os) autor(es). Colocar el primer nombre completo, inicial del segundo, primer apellido completo e inicial del segundo, en mayúscula y centrado. En la siguiente línea colocar la dirección física de los autores y en la última línea la dirección de correo electrónica. Emplear superíndices numéricos para la identificación de los autores y sus respectivas direcciones. En caso de que varios autores posean correos electrónicos bajo un mismo dominio, utilizar el formato siguiente {login1, login2, ... loginn}@dominio. Ejemplo:

{sardito, hvasquez, jrodrigu}@uc.edu.ve

- **Resumen:** máximo de 150 palabras a una sola columna justificada, sin incluir referencias bibliográficas. Luego colocar entre tres (03) y cinco (05) palabras clave en orden alfabético (el resumen y las palabras clave deben incluirse en idioma inglés).
- **Introducción.**
- **Cuerpo del artículo:** Materiales y métodos (en caso de ser necesario), resultados y discusión.

- **Conclusiones** (opcional).
- **Agradecimientos** (opcional).
- **Bibliografía.** Las referencias bibliográficas serán listadas en orden alfabético, incluirán primer apellido, inicial del nombre y en caso de ser varios autores, inicial del nombre seguido del primer apellido, año de publicación, título de la obra o del trabajo citado (se debe colocar en mayúscula solo la letra inicial de la primera palabra). Ejemplos según sea el caso:
 - Publicaciones periódicas: Autor. Año. Título del artículo. *Nombre de la Revista abreviada*. Volumen (Número): páginas.

Baum, L. E., T. Petrie, G. Soules & N. Weiss. (1970). A maximization technique occurring in the statistical analysis of a probabilistic functions of Markov chains. *Ann. Math. Stat.* 41(1):164–171.

- Libros: Autor. Año. *Título del libro*. Casa editora. Ciudad.

Bernardo, J. & A. Smith. (1994). *Bayesian theory*. Wiley. New York.

- Libros colegiados: Autor. Año. Título del capítulo. In: *Título del libro* (editores), páginas. Casa editora. Ciudad.

Steyermark, J. (1994). Aspectos morfológicos del Parque Nacional Morrocoy. In: Flora del Parque Nacional Morrocoy (B. Manara, ed.), 66-103. Fundación Instituto Botánico de Venezuela y Agencia Española de Cooperación Internacional. Caracas, Venezuela.

- Proceedings o memorias: Autor. Año. Nombre del Evento. Institución donde se realizó el mismo. Ciudad. País. Páginas.

Toyota, M. (1999). Caracterização química e citológica como subsídios à taxonomia de grupos-problema. VIII Reunião brasileira de ficologia. Sociedade brasileira de ficologia. Pernambuco. Brasil. 41.

- Tesis o trabajos de ascenso: Autor. Año. Título. Tipo de Trabajo. Facultad. Universidad. Ciudad, País.

Vera, B. (2000). Estudio ficoflorístico de la región oriental del litoral central de Venezuela, Edo. Vargas, Venezuela. Trabajo de ascenso a la categoría de Asistente. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

- Documento en electrónico: citar según las indicaciones del documento electrónico o seguir los formatos indicados en la norma ISO 690-2, disponible en la dirección:

http://www.ugr.es/~pwlac/G00_Referencias_electronicas.html

- Las referencias deben ser citadas en el artículo, de acuerdo a:
 - **Un solo autor:** se indica el primer apellido del autor seguido por el año de la publicación, todo esto entre paréntesis.

..... (Vargas, 1999)....

- **Dos autores:** se coloca el primer apellido del primer autor, el símbolo & y el primer apellido del segundo autor, seguidamente la fecha de publicación; todo esto entre paréntesis.

..... (Vargas & Rodríguez, 2002).....

- **Más de dos autores:** se coloca el primer apellido del primer autor, luego se coloca “*et al.*”, seguidamente la fecha de publicación; todo esto entre paréntesis.

..... (Vega *et al.*, 2005)

- **Más de dos referencias:** se coloca cada referencia de acuerdo a lo anterior, separados por puntos y comas (;). Se deben ordenar primariamente en orden cronológico y en segundo lugar alfabéticamente, todo esto entre paréntesis. el primer apellido del primer autor, luego se coloca “*et al.*”, seguidamente la fecha de publicación; todo esto entre paréntesis.

..... (Vargas, 1999; Vargas & Rodríguez, 2002; Graterol *et al.*, 2005; Vega *et al.*, 2005)

- Los encabezados de cada sección se escribirán en negritas y deben estar enumerados.
- Las figuras, fotografías, diagramas y gráficos deben denominarse como “Fig.”. Las tablas deben denominarse “Tabla”. Las tablas y figuras deben enumerarse correlativamente y estar citadas en el texto en el mismo formato anterior. Se presentarán insertas en el cuerpo del artículo y además se debe entregar una copia en versión digital de las mismas. Las figuras deben estar en blanco y negro o escala de grises en formato JPEG o TIFF a una resolución de 300 dpi. Para la entrega de la versión final se requieren las imágenes en archivos a parte.
- Unidades de medida. Los valores se deben expresar en el sistema métrico decimal de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI). La mayoría de los símbolos se escriben abreviados, en minúscula, salvo algunas excepciones como aquellos derivados de nombres propios, no llevan punto y se separan del valor numérico por un espacio. Ejemplos: cm (centímetro), h (hora), °C (Celsius).
- Las ecuaciones deben identificarse con un número entre paréntesis correspondiente a la enumeración correlativa de las ecuaciones. Estas deben estar en cursiva. Ejemplo:

$$I_F = I_E = - I_C = A^2 I_{A1} + A I_{A2} + I_{A0} = \frac{-J\sqrt{3}E_A}{Z_1 + Z_2} \quad (1)$$

Las ecuaciones tienen que estar citadas en el manuscrito y deben identificarse como “Ec”.

- Los algoritmos o códigos fuentes de programas se deben identificar con la palabra “Algoritmo” seguida de un número correspondiente a la numeración correlativa de los algoritmos y un título que lo identifique. Estos deben respetar la indentación y en letra courier tamaño 9. Ejemplo:

```
(1) void * sum(void * arg) {
(2) int * p; p = (int *)arg;
(3) pthread_mutex_lock(&m);
(4) s = s + *p;
(5) pthread_mutex_unlock(&m);
(6) }
```

Algoritmo 1. Hilo que efectúa la suma.

- Nombres y coordenadas geográficas. Los nombres geográficos sólo se escriben en mayúscula cuando forman parte de un nombre propio, por ejemplo: Península de Paraguana, Río Cabriales. Las coordenadas deben citarse utilizando las siglas correspondientes: Lat. (latitud), Long. (longitud), N (norte), S (sur), E (este), O (oeste), ejemplo: 10°31'01" Lat. N., 67°06'10" Long. O.

Envío de manuscritos para arbitraje:

Los *manuscritos iniciales* deben ser enviados en formato electrónico PDF o MSWord (al menos en la versión XP) a la siguiente dirección:

farautecienciauc@gmail.com

Hojas de estilo para artículos aceptados para su publicación:

El arte final de los artículos aceptados para su publicación debe respetar todos los requerimientos anteriores. Para ello se ponen a disposición de los autores las hojas de estilo correspondiente a cada formato (LATEX o Microsoft WORD), las cuales pueden ser obtenidas electrónicamente en la siguiente dirección electrónica:

<http://www.facyt.uc.edu.ve/investigacion/faraute>

Hoja de Estilos para LATEX:

CyT UC.sty

CyT UC.tex

Hoja de Estilos para WORD:

CyT UC.doc

Notas finales:

Los artículos serán sometidos a arbitraje en extenso previa publicación. Los artículos arbitrados sujetos a modificación, deben ser corregidos en un plazo de tres semanas para su incorporación en el número correspondiente. En caso de no ser entregados, permanecerán por un período de espera de seis meses como máximo, para la entrega de la versión corregida. Una vez vencido este plazo el trabajo será arbitrado nuevamente previa solicitud por parte del autor.

La Revista Faraute de Ciencias y Tecnología es el órgano de difusión y divulgación de las actividades científicas de la Facultad de Ciencias y Tecnología de la Universidad de Carabobo, la cual es de Acceso Abierto No comercial (AANC).

GUIDE FOR AUTHORS

“Faraute” Journal of the Experimental Faculty of Science and Technology (Facyt) publishes original papers of interest to a broad group of readers from the basic Science and Technology community.

A submission to Faraute UC must be the original contribution of the author(s) and must not be published elsewhere or be under consideration for another publication in its submitted or a substantially similar form in any language. Contributions in Spanish and English in the following categories may be submitted.

Types of contributions

- Research articles with original results in the basic science and technology. Maximum twelve (12) pages.
- Technical notes. Maximum five (5) pages.
- Reviews. Critical surveys of specific field of science and technology in which existing published information is analyzed and discussed. Maximum twenty (20) pages.
- Articles of special guest. Maximum five (5) pages.
- Letters to the editor regarding technical observations of articles published in the journal.

Preparation of text:

The format of the manuscript must follow the following recommendations:

- Type of letter: *Times New Roman* size 12, except the title in Spanish.
- Text of the article in double columns, except the title, the information of the author(s) and the abstract..
- Spacing: single,
- Size of paper: letter, with justified margins of 2.5 cm on either space.
- The article must have the following sections:
 - **Title:** In Spanish and English. The title in Spanish must be in Times New Roman, size 14, in capital letters, bold, centered, leaving one line size 12 between. The title I English will be bold; capital letters are to be used only for the initial the names, pronouns, verbs, adjectives and adverbs. Cursive words are allowed, only when referring to the scientific name of a species. For example:

**DETERMINACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE PROTEASAS
OBTENIDAS DEL FRUTO DE *Thevetia ahouai* (L.) A.DC.**
 - **Information of the author(s).** Place the first name, initial of the second one, last name and initial of the second one, in capital letters and centered. In the following line place the physical address of the authors, and in the last line the electronic address. Use numeric super indexes to identify authors and their addresses. In case of various authors having electronic addresses under the same domain, use the following format: {login1, login2, ... loginn}@domain. For example:

{sardito, hvasquez, jrodrigu@uc.edu.ve

- **Abstract:** The abstract must contain a maximum of 150 words in one column, justified, without including bibliographic references. Afterwards, add between three (3) and five (5) keywords in alphabetical order.
- **Introduction:** This section should provide a comprehensible statement of the problem, a relevant literature of the subject, and the proposed approach or solution.
- **Body of the article:** The paper may include a section of material and methods, if necessary, and must contain both a result and a discussion section.
- **Conclusions:** A conclusions section is optional.
- **Acknowledgments:** This section is also optional.
- **Bibliography:** Bibliographical references will be listed in alphabetical order. They will include, for the first author, first surname and initial of the first name. For the rest of the authors, if there are any, initial of first name followed by first surname. After the authors names it follows the year of publication in parenthesis. The next information should be the title of the work referenced. Only the first letter of the first word should be in capital letters. Examples of possible referenced works are given in the following paragraphs:

- Periodic publications: Author or authors. Year. Title of the article. Abreviated name of the publication (in italics). Volume (Number): pages.

Baum, L. E., T. Petrie, G. Soules & N. Weiss. (1970). A maximization technique occurring in the statistical analysis of a probabilistic functions of Markov chains. *Ann. Math. Stat.* 41(1):164–171.

- Books: Author or authors. Year. Title of book. Publishers. City.

Bernardo, J. & A. Smith. (1994). *Bayesian theory*. Wiley. New York.

- Collaborative books: Author or authors. Year. Title of chapter. In: Title of book (editors), pages. Publishers. City.

Steyermark, J. (1994). Aspectos morfológicos del Parque Nacional Morrocoy. In: Flora del Parque Nacional Morrocoy (B. Manara, ed.), 66-103. Fundación Instituto Botánico de Venezuela y Agencia Española de Cooperación Internacional. Caracas, Venezuela.

- Proceedings or memoirs: Author or authors. Year. Name of presentation. Name of the Event. Institution where the event took place. City. Country. Pages.

Toyota, M. (1999). Caracterização química e citológica como subsídios à taxonomia de grupos-problema. VIII Reunião brasileira de ficologia. Sociedade brasileira de ficologia. Pernambuco. Brasil. 41.

- Thesis or promotion research projects: Author or authors. Year. Title. Type of work. Faculty. University. City, Country.

Vera, B. (2000). Estudio ficoflorístico de la región oriental del litoral central de Venezuela, Edo. Vargas, Venezuela. Trabajo de ascenso a la categoría de Asistente. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

- Document in electronic format: Cite according to indications of the electronic document or follow the formats indicated the norm ISO 690-2, available in the address:

http://www.ugr.es/~pwlac/G00_Referencias_electronicas.html

- The references must be cited in the article according to:
 - **One author:** Indicate the first surname of the author followed by the year of publication, all in parenthesis.

..... (Vargas, 1999).....

- **Two authors:** indicate the first surname of the first author, the symbol & and the surname of the second author, followed by the year of publication, all in parenthesis.

..... (Vargas & Rodríguez, 2002).....

- **More than two authors:** Indicate the last name of the first author, the add “*et al.*”, followed by the year of publication, all in parenthesis.

..... (Vega *et al.*, 2005)

- **More than two references:** Write each reference according to the previous information, separated by semi-colons (;). They should be sorted chronologically firstly and them alphabetically, all in parenthesis.

..... (Vargas, 1999; Vargas & Rodríguez, 2002; Graterol *et al.*, 2005; Vega *et al.*, 2005)

- The headings of each section must be written in bold, and should be numbered.
- Figures, photographs and graphics should be identified “Fig.”. Tables should be called “Table”. These words should be placed under the figure or table aligned to the left. There should follow a description, in Times New Roman letters, size 10. The tables and figures must be numbered correlatively and be cited in the text in the same previous format.
- Figures will be inserted in the body of the article, and a digital copy should be handed in. They should be in JPEG or TIFF, a resolution of 300 dpi, and the file should be name as “Fig”, followed by the corresponding number of the article.
- Units of measure. The values must be expressed in the decimal metric system, according to the Systeme International d’Unités (SI). Most symbols are abbreviated, in common letters, except in some cases, as those derived from proper names, they do not take a period, and are separated from the numeric value by a space. Examples: cm (centimeter), h (hour), °C (Celsius).
- Equations must be identified with a number in parenthesis corresponding to the correlative numbers of the equation. These must be in cursive. For example:

$$I_F = I_B = -I_C = A^2 I_{A1} + A I_{A2} + I_{A0} = \frac{-J\sqrt{3}E_A}{Z_1 + Z_2} \quad (1)$$

To refer these equation in the manuscript should be identified as “Eq”.

- Algorithms or codes of program sources must be identified with the word “Algorithms”, followed by a number corresponding to the correlative number of the algorithms and the title identifies it, all centered in a placed I the lower part. Each line must be numbered as show below. These must respect indentation and be in “Courier” size 9. Example:

```
(1) void * sum(void * arg) {
(2) int * p; p = (int *)arg;
(3) pthread_mutex_lock(&m);
(4) s = s + *p;
(5) pthread_mutex_unlock(&m);
(6) }
```

Algorithm 1. Hilo que efectúa la suma.

- Names and geographical coordinates. Geographical names are only written in capital letters when they are part of a proper name, for example: Península de Paraguana, Río Cabrales. Coordinates must be cited using the corresponding abbreviation: Lat. (latitude), Long. (length), N (north), S (south), E (east), W (west), for example: 10°31’01” Lat. N., 67°06’10” Long. O.

Sending manuscripts for arbitration:

The initial manuscripts must be sent in PDF or MSW electronic format to the following address:

farautecienciauc@gmail.com

Style pages for articles accepted for publication:

The final art of the article accepted for publication must respect all the previous requirements. Therefore, the authors are offered the style pages that correspond to each format (LATEX or Microsoft WORD), which can be obtained at the following electronic address: <http://www.facyt.uc.edu.ve/investigacion/faraute>

For LATEX style pages:

CyT_UC.sty
CyT_UC.tex

For WORD style pages:

CyT_UC.doc

Final notes:

The articles will undergo complete arbitration prior to publication. The arbitrated articles subjected to modifications, must be corrected in three weeks to be included in the corresponding number. In case they are not turned in they will be held for a maximum of six months, awaiting for the corrected version. Once that period expires the article will be subjected to arbitration again upon the author’s request.

Faraute de Ciencias y Tecnología is the organ of diffusion and dissemination of the scientific activities of the Facultad de Ciencias y Tecnología of the Universidad de Carabobo, which is Non-commercial Open Access (AANC).



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD EXPERIMENTAL DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA

AUTORIDADES UNIVERSITARIAS

Jessy Divo de Romero

Rectora

Ulises Rojas

Vicerrector Académico

José A. Ferreria

Vicerrector Administrativo

Pablo Aure

Secretario

AUTORIDADES DE LA FACULTAD
EXPERIMENTAL DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA

Profesor José Gregorio Marcano
Decano

Profesora Elizabeth Perozo
Directora Departamento de Química

Profesora Marilyn Giugni
Directora Departamento de Computación

Profesor Richard Barrios
Departamento de Física

Profesor Luis Rodríguez
Departamento de Matemática

Profesor Rafael Fernández
Departamento de Biología

Profesora Rosa de Muñoz
Coordinadora de la unidad de formación
Socio-Humanística

Profesor Reimer Romero
Director de Investigación

Profesor Juan Carlos Pereyra
Director de Postgrado

Profesor Orestes Montilla
Director de Asuntos Estudiantiles

Profesora Ysmel la Rosa
Directora de extensión

Profesora Miryelis Rojas
Directora de asuntos profesoraes

Profesora Rosa Bravo
Directora de currículum