



Altos de Pipe, 07 de mayo de 2019

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (I.V.I.C.)
CENTRO DE BIOFÍSICA Y BIOQUÍMICA
SERVICIO DE MICROSCOPIA DE LUZ

ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA, ADN, CAPACIDAD
EMULSIFICANTE Y LAS ACTIVIDADES DE LIPASA Y PROTEASA DEL
PRODUCTO BERO™

Víctor Salazar M.Sc
Servicio de Microscopía de Luz
Centro de Biofísica y Bioquímica
Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas IVIC
Telf - 0212-5041172
E-mail - vsalazar@ivic.gob.ve – egeonpruslas@gmail.com

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (I.V.I.C.)
CENTRO DE BIOFÍSICA Y BIOQUÍMICA
SERVICIO DE MICROSCOPIA DE LUZ

ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA, ADN, CAPACIDAD
EMULSIFICANTE Y LAS ACTIVIDADES DE LIPASA Y PROTEASA DEL
PRODUCTO BERO™



Víctor Salazar M.Sc
Servicio de Microscopía de Luz
Centro de Biofísica y Bioquímica
Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas IVIC
Telf - 0212-5041172
E-mail - vsalazar@ivic.gob.ve – egeonpruslas@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Las enzimas son agentes bastante conocidos en el campo industrial; algunas aplicaciones incluyen: procesamiento de productos químicos orgánico, la industria láctea, industria de agroquímicos, procesamiento de productos farmacéutico, formulaciones detergentes, síntesis de biosurfactantes entre otros; sin embargo en el área de recuperación mejorada del petróleo (EOR, por sus siglas en inglés, *enhanced oil recovery*) es bastante nuevo su uso (Sharma et al., 2001; Khusainova et al., 2016).

Se distinguen varios mecanismos que causan aumento de la producción de petróleo después de la aplicación de enzimas asociado a la adsorción éstas de en la superficie mineral: mejora de la humectabilidad superficial de las rocas, emulsificación debido a la disminución de la tensión interfacial, reducción de la viscosidad y remoción de parafinas de alto peso molecular. Además hay otras ventajas para la aplicación de las enzimas en EOR: no tienen impactos deletéreos sobre el medio ambiente y son reusables (Ott et al., 2011; Khusainova et al., 2016; Aurepatipan et al., 2018).

A pesar de los buenos resultados en la aplicación de las enzimas en EOR, el uso de productos que son mezclas de enzimas y otros compuestos hace que sea difícil determinar qué componente de la mezcla, y en que medida, afecta el proceso de recuperación de petróleo. Se ha estudiado varios grupos de enzima para determinar el grupo con mayor potencial para su aplicación en EOR y el grupo de lipasas/esterasas ha demostrado el mayor efecto en la recuperación de petróleo (Khusainova et al., 2016).

Con el propósito de considerar nuevos productos como potencial aplicación en la recuperación mejorada de petróleo, se realizaron diferentes ensayo en el producto BERO™, con el propósito de determinar la existencia de proteínas y ADN, así como sus propiedades de lipasa y de proteasa. BERO™, es uno de los poco productos en mercado con aplicaciones en EOR, el cual es considerado como un catalizador y de poco impacto ambiental (Ott et al., 2011; Khusainova et al., 2016).

MÉTODOS

El análisis de BERO™, se realizó usando métodos histoquímicos y de microscopía de fluorescencia, campo oscuro y de polarización. Para la identificación de material proteico, se trataron alícuotas del producto con isotiocianato de fluoresceína (CI: 45350) a una concentración de 10 µg/mL y eosina Y (CI: 45380) (2', 4', 5', 7'- tetrabromo-fluoresceína) a 100 µg/mL, en una proporción 1: 1 (Boon & Kok, 2004; Hardie et al., 2004); para la identificación de ADN se usó 3,5'- diamidino-fenol-indol a una concentración de 10 µg/mL en una proporción 1:1.

Las concentraciones de proteínas y ADN se determinaron mediante el métodos espectrofotométrico, el de Bradford para proteínas (Bradford, 1976) y el ADN mediante absorción a 260 para ADN.

Capacidad emulsificante de BERO™ sobre aceite y crudo pesado

La capacidad emulsificante de BERO™, fue comprobado por el ensayo E24. Para el ensayo E24 se calculó el índice de emulsificación de acuerdo a Nwinyi et al (2018), adicionando a diferentes tubos de ensayos 5 ml de aceite de ajonjolí y 5 ml de las muestras de BERO™, sin diluir y diluidas desde 1:10 a 1:100000, designadas consecutivamente desde B1 a B6, B7 fue el control y consintió en agua destilada con la que se prepararon las diluciones de BERO™; posteriormente, se homogeneizaron a alta velocidad en un agitador Vortex (Ginie 2 Fisher™) por 2 minutos y se dejaron reposar por 24 horas. El E24 se determinó como el porcentaje de la altura de la capa emulsificada (HEL) dividida por la altura total de la columna de líquido (HS) usando la ecuación $E24 = HEL/HS \times 100\%$. Este mismo procedimiento se realizó usando crudo pesado 8 API (B26) de la faja petrolífera del Orinoco.

Estudio de las variables reológicas

La humectabilidad de emulsiones está asociada a la adherencia, lubricidad y absorción de líquidos y en todos los casos las interacciones entre

las interfaces líquido/sólido juegan un papel preponderante; para estudiar este fenómeno se recurre a determinar el ángulo de contacto (θ) el cual determina el comportamiento de los líquidos en superficies hidrofílicas e hidrofóbicas. El ángulo de contacto tiene dos extremos: a 0° la gota de líquido está completamente esparcida y forma una película delgada (monomolecular) y esta condición es denominada humectabilidad completa; a un ángulo de 180° la gota forma una esfera y toca el sólido en un único punto de contacto y esta condición es denominada deshumeabilidad completa. Para líquido hidrofílico como el agua en una superficie hidrofílica una gota sedente tiene un ángulo de contacto de $\theta_c < 90^\circ$, de $90^\circ \leq \theta_c \leq 150^\circ$ en hidrofóbicas y $\theta_c > 150^\circ$ en superficies super-hidrofóbicas (Gomes et al., 2013)

El ángulo de contacto se determinó en gotas sedentes de acuerdo a la metodología descrita por Gomes et al (2013) para las emulsiones de BERO™ y B26, usando un ocular de 10X y una cámara digital Canon Rebet T3i. Las imágenes se salvaron como archivos TIFF en color de 24-bit. El cálculo del ángulo de contacto se realizó utilizando el plugin `contac_angle.jar` desarrollado por Brugnara (Brugnara, 2006) para el software ImageJ (disponible en <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/contact-angle.html>). La determinación del ángulo de contacto de las emulsiones se realizó en una superficie hidrofílica, vidrio cubierto con poli-lisina grado histológico (Sigma™), una superficie hidrofóbica preparada cubriendo láminas portaobjetos con parafina Paraplast (Leica™) y una altamente hidrofóbica que es hecha a base de politetrafluoroetileno (PTFE) que recubre portaobjetos para inmunohistoquímica (Thermo Scientific™).

La viscosidad de las emulsiones y B26 fueron determinadas por el método del viscosímetro capilar al nanolitro descrito por Srivastava et al., (2005). La tensión superficial se determinó mediante el método de la gota pendiente, usando registro fotográfico de gotas generadas en capilares de 100 μL y usando jeringas Gilson de 1 ml capacidad (Berry et al., 2015); el cálculo de la tensión superficial se realizó utilizando el plugin `Pendent_Drop.jar` desarrollado por Daerr y Mogne (2016) para el software ImageJ (disponible en http://fiji.sc/List_of_update_sites).

Estudio microscópico de las emulsiones de aceite y B26

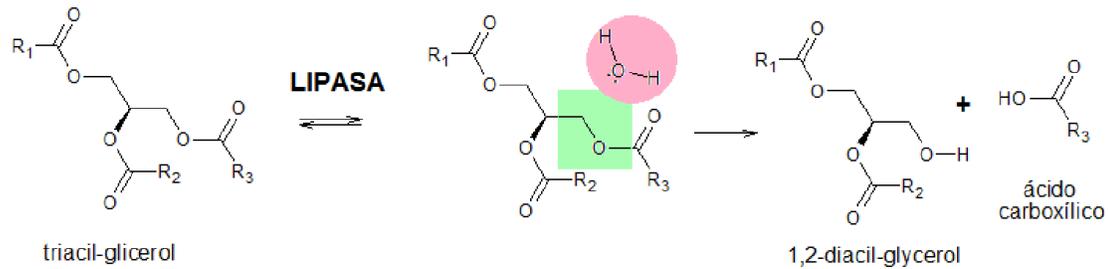
Las emulsiones de aceite y de B26 fueron analizadas usando microscopía de campo oscuro y de polarización; la caracterización de la morfología de las emulsiones y el bitumen se realizaron de acuerdo a emulsiones Thijssen et al., (2011) y Duncke et al., (2016) respectivamente.

Todas las preparaciones procesadas por métodos de tinciones convencionales o fluorescentes se observaron en un microscopio Nikon Eclipse E600 (Nippon Kogaku KK, Tokyo, Japón) y se fotografiaron digitalmente con una cámara SPOT Flex FX1520. Las imágenes de 2048 x 2048 píxeles se guardaron como archivos bitmap TIFF a color de 24 bits. Las preparaciones hechas con tinciones convencionales fueron observadas usando las modalidades de microscopía de claro con los objetivos de 20X, 40X y 100X. Para la epifluorescencia, la iluminación se realizó usando una lámpara de mercurio de 100 W y los cubos UV-2A (330-380 nm), B-2A (450-490 nm) para detectar los fluoróforos DAPI y FITC respectivamente y el objetivo 60XA plan-apocromático de apertura numérica 1,40 e inmersión en aceite. La preparación, análisis de imágenes y mediciones correspondientes se realizaron con el programa ImageJ (versión 1.50i). Para el análisis, las imágenes digitales fueron adquiridas a una misma amplificación y condiciones de iluminación y misma configuración de arreglos de la cámara digital y se consideraron las fotos mejor contrastadas.

Actividad de lipasa

Las lipasas (acil-hidrolasas de triacil-glicerol, EC 3.1.1.3) son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces ésteres presentes en acil-gliceroles y la síntesis de ésteres formados a partir de glicerol y ácidos grasos de cadena larga. Además, pueden catalizar la hidrólisis o síntesis de un grupo amplio de ésteres carboxílicos. Estas enzimas están ampliamente distribuidas en la naturaleza, y se encuentran en microorganismos, plantas y animales. Las muchas aplicaciones de las lipasas incluyen especialmente las síntesis

orgánicas, hidrólisis de grasas y aceites, modificación de grasas, amplificaciones de olores en el procesamiento de alimentos, separación de mezclas racémicas y análisis químicos (Sharma et al., 2001; Okino-Delgado et al., 2016).



Para detectar la actividad de lipasa se usó el método descrito por Reyes-Duarte et al., (2012) con algunas modificaciones: se usó dodecanoato de α -naftilo (laurato) como sustrato, hexazonio de pararosanilina como captador y agarosa como medio solidificante. Las lipasas escinden el éster de α -naftilo, éste último reacciona con el hexazonio de pararosanilina generando un producto coloreado, cuya concentración es proporcional a la actividad de la enzima. Este método resulta más específico que las pruebas usando aceites, puesto que la actividad de lipólisis no puede diferenciarse de la capacidad emulsificante, de un compuesto (Das et al., 2016; Nwinyi et al., 2018). La composición del medio de incubación fue la siguiente: dodecanoato de α -naftilo (disuelto en N,N-dimetilformamida) 3,00 mg, hexazonio de pararosanilina (0,30 ml de hexazonio de pararosanilina 9,7 ml de tampón fosfato 0,1 M pH 7,2), 10,0 ml (Lojda et al., 1979) y agarosa al 1% p/v; la mezcla se calentó suavemente hasta la disolución de la agarosa y se dispensó en cámaras sobre cubreobjetos de 10 μ L de capacidad, se enfriaron en hielo y se colocó en cada cámara 1 μ L de BERO™, y diluciones del producto desde 1:10 a 1:10.000, definiéndose como los grupos 1, 2, 3,4 y 5, en cada caso se hicieron por triplicado. Se usó agua bidestilada en el grupo control. Los portaobjetos se mantuvieron en cámaras húmedas a 37 °C por 5 horas. A diferencia de las esterases, las lipasas son activadas sólo cuando son adsorbidas a una interfase aceite-agua y no hidrolizan sustratos disueltos en un volumen de fluido (Sharma et al., 2001); de esta manera el método

histoquímico en un medio sólido ofrece muchas ventajas sobre los espectrofotométricos

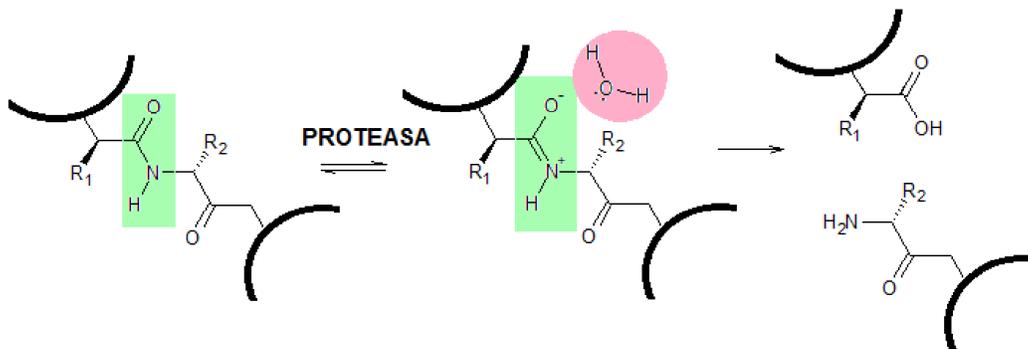
La actividad de lipasa se cuantificó mediante análisis de imágenes usando el programa ImageJ (versión 1.50i); se determinó la intensidad de coloración del producto de reacción para cada grupo (B1 a B7). La intensidad (I) se calculó como $I = 10 \times \sum DOI/A$ siendo, $\sum DOI$ la densidad óptica integrada y A el área de tinción positiva (μm^2) (Corthorn et al., 2007). La DOI se determinó en un superficie circular de 100×100 píxeles ($= 7860 \text{ pix}^2 = 930 \mu\text{m}^2$) a 20X, usando microscopía de campo claro. Las mediciones se realizaron en 10 zonas del área positiva para la reacción enzimática donde se agregó el volumen de BERO™, o sus diluciones y 10 zonas correspondientes al fondo.

Las densidades ópticas integradas se normalizaron y la actividad enzimática se expresó como el coeficiente de la DOI de cada tratamiento con respecto al grupo control y los valores relativos se expresaron como unidades arbitrarias (Tas et al., 2006; Saravia-Otten et al., 2013). La normalización de las densidades ópticas de los tratamientos con respecto a las del control eliminan las variación debidas a proporcionalidad inversa de la absorbancia con respecto a la concentración del producto coloreado, así valores bajos de los coeficientes indican baja actividad enzimática y viceversa.

Actividad de proteasa (EC 3.4.21.-.)

Las proteasas hidrolizan enlaces peptídico de polipéptidos, usando una molécula de agua (mostrado en la figura esquemática); esta actividad se le conoce como proteólisis y es la causa de la degradación de geles y mallas de proteínas. En el sistema internacional para la nomenclatura y clasificación de enzimas (número EC), las proteasas se encuentran en la clase 3, como hidrolasas, subclase 3.4., que escinden enlaces peptídicos; a su vez se dividieron en 13 subclases dependiendo de su mecanismo catalítico (Mechria et al., 2017; Tavano et al., 2018). La degradación de geles y mallas de proteínas nos da un indicio de la capacidad de una proteína como proteasa, pero no mide directamente su actividad proteolítica, además puede confundirse

con un efecto emulsificante (Boulkour Touioui et al., 2015; Mechria et al., 2017). Para una mejor caracterización de la capacidad de BERO™, como proteasas se determinaron su capacidad degradativa y proteolítica en un mismo ensayo.



La determinación de la actividad proteolítica de BERO™, se realizó de acuerdo al método descrito por Hadler-Olsen et al., (2010) con algunas modificaciones; la composición del medio de incubación tiene la siguiente composición: gelatina 7% p/v, Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM, azida sódica 0,20 mM, pH 7,6. Esta mezcla se calentó suavemente hasta la disolución de la gelatina y aún en estado líquido se dispensaron en portaobjetos, con cámaras de 10 µL de capacidad, sobre un calentador a 54 °C, se enfriaron posteriormente en hielo y se colocó en cada cámara 1 µL de BERO™, y diluciones del producto desde 1:10 a 1:10.000 (definidos como grupos 1 a 5) en cada caso se hicieron por triplicado. La incubación fue por 2 horas a 37 °C. La detección de actividad proteolítica se realizó mediante tinciones convencionales usando el método descrito por Takano et al., (2001): después de la incubación, las cámaras de lavaron con agua bidestilada, 3 veces, y se colorearon con ponceau S (Cl: 27195) 0,45 g, ácido tricloroacético 5,00 g, etanol absoluto 75,00 mL y agua destilada, 75,00 mL) por 4 minutos, se lavaron con agua bidestilada, se cubrieron con cubreobjetos y se fotografiaron inmediatamente. La tinción con ponceau S resulta en una coloración de roja para las proteínas intactas y tonalidades claras, e incoloro, para las proteínas degradadas.

La actividad proteolítica fue cuantificada mediante análisis de imágenes usando un esquema similar como en el caso de la actividad de lipasa. Para

calcular la actividad proteolítica, se determinó la densidad óptica integrada (DOI), de las zonas degradadas e intactas, en una región de interés circular de 100 x 100 píxeles (= 7860 pix² = 930 μm²) a 20X, usando microscopía de campo claro, las mediciones se realizaron en 10 zonas coloreadas y 10 zonas correspondientes al fondo. La actividad proteolítica fue definida como unidades arbitrarias del coeficiente entre densidad óptica de las muestras con respecto a la densidad óptica del grupo control (Ghaderian et al., 2010).

Análisis estadístico.

Cada valor se representa como la media ± error estándar de la media. Para establecer diferencias significativas se realizaron los análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido por la prueba *a posterior* de Tukey. Se realizaron las pruebas de correlación de Pearson, y análisis de varianza doble de dos factores. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significantes. Todas las pruebas se realizaron con el programa estadístico PAST (Hammer et al., 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

BERO™ tiene una fase líquida coloidal, sin agregados y muy escaso material particulado al menos hasta los límites del microscopio usando microscopía de campo oscuro; el tamaño de estas partículas varía de 0,15 a 0,25 μm a 10 μm y un tamaño promedio de $0,18 \pm 0,042$ μm. El producto es ligeramente autofluorescente, en el rango de 510-560 nm, filtro G2A del sistema Nikon; en otros rangos no fue fluorescente.

La concentración de proteínas es de $122,035 \pm 3,511$ mg/mL y la de ADN $5830,200 \pm 125,248$ ng/mL. El tratamiento con FITC y eosina revela la presencia de proteínas la fase líquida al hacerse fluorescentes en el rango de 420-490 nm, con ensayo para ADN usando DAPI sólo es observable una fluorescencia de fondo indicando la presencia de ADN disuelto en la matriz.

Capacidad emulsificante

BERO™ tiene un mayor capacidad emulsificante en B26 que con aceite. En la Figura 1 se representan los cambios de E24 para cada tratamiento usando tanto aceite como B26; la capacidad emulsificante disminuye progresivamente a partir de B4 (dilución de 1/1000) para el aceite pero para B26 es a partir de B6 (dilución 1/100000), en ambos casos a partir de estos grupos no se hallaron diferencias estadísticamente significativas con el grupo control (B7) ($P < 0,05$). Tanto para el aceite como para B26 la menor capacidad emulsificante se encuentra en los grupos B1-B3 (Fig. 1).

BERO™, pura o diluida, tuvo la particularidad de ejercer este efecto emulsificante sobre otros compuestos, usados en los ensayos para las actividades enzimáticas, como polivinil-pirrolidona, los cuales fue capaz de disolver; sólo el agar y en segundo lugar la gelatina pudieron mantener sus matrices por tiempos suficiente para poder realizar ensayos en estados sólidos.

Variables reológicas

La determinación del ángulo de contacto permite definir el estado de las emulsiones con respecto a superficies de contacto y probar la eficacia del emulsificante (Thijssen et al., 2011). El ángulo de contacto se determinó usando petróleo pesado (B26), aceite de ajonjolí y las diluciones de BERO™. Para B26 en las superficie hidrofílicas (polilisina), el ángulo de contacto aumenta en la medida que la concentración de BERO™ disminuye (Fig. 2), indicando una disminución de la humectabilidad del crudo pues la cantidad de agua esté disminuyendo, fenómeno se que por la capacidad emulsificante de BERO™; para el caso de la parafina y PTFE, ocurre un patrón similar de aumento del ángulo de contacto, aunque parece bastante anómalo este compartimento hay que tener en cuenta que el bitumen presenta una composición bastante heterogénea, componentes hidrofóbicos y electrofílicos, dando la posibilidad de una variedad de interacciones que se manifiesten en comportamientos muy parecidos con superficies hidrofílicas. En el caso del aceite (Fig. 2) para la polilisina hubo un a tendencia parecida al B26 con un aumento de la humectabilidad en razón de la concentración de BERO™; en el caso de la parafina el ángulo de contacto aumenta y sólo con B1 se presenta el

menor ángulo, la composición más homogénea, fundamentalmente hidrofóbica, del aceite explica la tendencia de disminuir el ángulo al aumentar la tensión superficial en superficies hidrofóbicas con cambios en la humectabilidad, condición que no aplica para PTFE pues el ángulo tiende a aumentar pero manifestando alternancia por cambios que no se pueden asociar a la concentración del BERO™.

La viscosidad de las emulsiones de B26 y BERO™ aumenta con la disminución de la concentración de BERO™. (Fig. 3). A partir de la concentración 1:100000 (grupo B6), la viscosidad no se diferencia estadísticamente de la del grupo control (B7, con agua solamente) y de B26; hay una disminución de la viscosidad estadísticamente significativa hasta la dilución de 1:10000 (grupo B5), siendo las más bajas lograda con los grupos B1 y B2 (Fig. 3). La tensión superficial, fue calculada con respecto al aire a 25 °C; normalmente en muestras de bitúmenes se calcularía con respecto al agua, sin embargo la metodología empleada se necesita obtener una gota pendiente con características apropiadas cuya forma es consecuencia de la tensión superficial, al tratar con agua las emulsiones de los grupos B1 a B5, las gotas se deforman, a consecuencia de la disolución parcial de las gota, funcionando para B6, B7 y B26, ocurre lo contrario si se usan solventes orgánicos, como hexano o tolueno, deformándose las gotas en los grupos B5-B7 y B26, por ello para tener un parámetro de referencia se optó por calcularla con respecto al aire de acuerdo a la metodología descrita por Berry et al. (2015). La tensión superficial disminuyó con el uso de BERO™ (Fig. 4), formándose dos grupos con diferencias estadísticamente significativas: un grupo con baja tensión superficial: B1-B5 y otro que no presentó ningún cambio con respecto al crudo B26: B6-B7. BERO™ disminuyó la tensión superficial al aumentar el contenido de agua dentro de la emulsión, reflejando en los cambios del ángulo de contacto con superficies hidrofílicas.

Estudio microscópico de las emulsiones de aceite y B26

Para B26 se presentó un patrón común para los grupos B1 a B4, donde hay gotas de material emulsificado evidenciándose como gotas birrefringentes

(Fig. 5-1), con microscopía de campo oscuro, o como cuerpos con pseudo-cruces de malta cuando se ve con polarización (Fig. 5-1 C, D), y como cuerpos más pequeños cuerpos birrefringentes con cruces de malta verdaderos que corresponden a asfáltenos (Duncke et al., 2016). A partir de B5, se comienza a separa las fases en la emulsión, apareciendo gotas de agua, grupos de gotas emulsificadas, y la acumulación de asfáltenos en masas dentro de una fase no granular (Fig. 5-2 y 6-1). En B7 el aspecto es la del bitumen sin tratar (Fig. 6-2B). Este comportamiento de los fenómenos asociado a la emulsificación son los responsables de los cambios que se observan en la E24 y en las variables reológicas, sobre todo la viscosidad.

Las emulsiones de aceite se presentaron con un patrón común para los grupos B1 y B2, donde hay grandes gotas de aceite emulsificado y en la superficie se presentan material particulado (Fig. 6-2, C-F) evidenciado con microscopía de campo oscuro; a partir de B3 empieza a disminuir la cantidad de gotas y a desorganizarse progresivamente la emulsión (Fig. 6-1, E-F), estando las gotas en una fase no acuosa como ocurre en B4 y B5 hasta no conseguirse en B6 (Fig. 6-2, E). Una buena parte de la capacidad de mantener la emulsión estable en B1 a B3 es la agregación de partículas en la superficies de las gotas, lo cual se manifiesta principalmente en la disminución de la tensión superficial y la disminución del ángulo de contacto (Thijssen et al., 2011).

Actividad de lipasa

La actividad de lipasa de BERO™, se detectó a todas las diluciones. Todos los grupos presentaron diferencias estadísticamente significativa con respecto al grupo control y a excepción de los grupos B2, B3 y B4 los demás grupos presentaron diferencias estadísticamente significativa entre ellos ($P < 0.01^{***}$) (Fig. 7).

El grupo B1 presentó la mayor concentración de proteína y por lo tanto la mayor actividad enzimática, sin embargo a pesar de que los grupos B2 a B4 poseen diluciones mayores y una menor concentración de proteínas sus actividades fueron iguales ($P > 0.05$) indicando lo es esencial para la acción de

las enzimas, en especial las lipasas, la relación estequiométrica enzima : sustrato : agua para una actividad relativamente alta y en las condiciones experimentales en que se realizaron los ensayos en estos grupo se logró la relación estequiométrica apropiada.

Los grupos 5 y 6 aunque presentando una progresiva disminución de la actividad de lipasa, asociado a una menor cantidad de la enzima en una condición por lo tanto de mayor concentración de sustrato, rompiendo con el equilibrio estequiométrico óptimo para la actividad de la enzima. Este comportamiento puede estar relacionado al modo de actuar de las lipasas. Una característica propia de las lipasas es que actúan sobre sustratos insolubles y agregados, por lo que operan unidas a interfaces lípido-agua, esto es asegurado en el modo de preparación del medio de incubación con un éster poco soluble en agua en un medio sólido como es el agar; bajo estas condiciones, se produce un incremento de la actividad catalítica, respecto a las soluciones con concentraciones por debajo de la concentración micelar crítica, fenómeno conocido como activación interfacial (Okino-Delgado et al., 2016); al asegurar una activación interfacial apropiada, el factor más influyente en la actividad de lipasas es la dilución y por lo tanto la concentración de la enzima. Al ser BERO™, una solución con alta disolución del material orgánico, la condición de una cantidad relativamente alta de enzimas, pueden explicar la alta actividad enzimática en el grupo B1, y la poca cantidad de enzimas a una en los grupos B5 y B6, esto es corroborado por el análisis de varianza doble con dos factores: hubo una interacción estadísticamente significativa entre la dilución y la concentración de proteínas sobre la actividad de la enzima ($p = 0,000$ ***; $P < 0,01$), lo cual indica que la actividad de la enzima desde los grupos depende de la concentración de proteínas, y por lo tanto de enzima. La misma prueba de análisis de varianza doble usando los factores dilución y condición de usarse puro o diluido BERO™, indica una interacción estadísticamente significativa entre estos factores sobre la actividad de la enzima ($p = 0,000$ ***; $P < 0,01$), indicando que independientemente de su estado el compuesto siempre tendrá actividad de lipasa, pero el grado de este depende de la concentración de proteína y está de la dilución del producto.

Actividad de proteasa

La mayores actividades proteolíticas se observó en el grupo B1 y disminuye progresivamente hasta el grupo B5, (Fig. 8). Todas las diluciones presentaron actividad estadísticamente significativas cuando comparadas con el grupo control y entre ellas ($P < 0.01$), salvo el grupo B6 donde la actividad fue menor y no presentó diferencias significativas con respecto al grupo B7 ($P \geq 0,05$). Este patrón es indicativo de que la actividad proteolítica es dependiente de la dilución, concentración de proteínas y por lo tanto de las proteasas en el producto.

El ensayo para el estudio de la actividad proteolítica involucra la formación de una malla de patrón regular a base de gelatina (Fig. 9), la cual fue afectado en diversos grados pero que también fue desordenado por el efecto emulsificante de BERO™, con poca o ninguna acción enzimática. Las zonas degradadas presentaron un color rojo claro y sin presencia de estructura reticular alguna y con la formación de gotas de material degradado (Fig. 9), este patrón es común en todos los grupos con BERO™, por el contrario las zonas intactas presentan un característico patrón en mallas, coloreada intensamente en rojo. El grado en que la malla de gelatina fue disuelta varió en cada grupo con respecto al grupo control así como la intensidad de color tanto en las zonas degradadas e intactas.

Como control, se calculó la actividad proteolítica en las zonas intactas (ZI) la cual fue muy baja; sólo los grupos B2 y B3 presentaron diferencias estadísticamente significativas con grupo control control ($P < 0,05$). Estos resultados indican BERO™, es capaz de ir penetrando la malla de gelatina ejerciendo un efecto proteolítico de modo constante aunque no se manifieste de manera conspicua mediante una zona degradada.

Las actividad proteolítica, fue dependiente de la concentración de proteína y por lo tanto de la dilución de BERO™: el análisis de varianza doble, indica una interacción estadísticamente significativa entre la dilución y concentración de proteínas sobre la actividad proteolítica ($p = 0,000^{***}$; $P < 0,001$); en la zona intacta no hubo una interacción significativa de la dilución de

BERO™ y la concentración de proteínas sobre la actividad enzimática ($P \geq 0,05$). Al considerar la dilución y el estado, si puro o diluido, se halló una interacción estadísticamente significativa de estos factores sobre las actividad proteolítica ($p = 0,000^{***}$; $P < 0.001$).

A una concentración determinada, la actividad de una enzima puede mantenerse en un estado de equilibrio constante, “steady state”, mientras se consume el sustrato; diferentes factores influyen en este proceso, donde la concentración de la enzima es uno de los más importante. No obstante este tipo de consideraciones es muy aplicable en soluciones, en el caso de las proteasas el acceso al sustrato ocurre habitualmente en complejos macromoleculares hallados en superficies, tejidos, matriz extracelular, por el cual el factor acceso a estas estructuras es un factor primordial y de gran importancia al momento de considerar la actividad de proteasas (Rawlings 2013). Otros tipos de ensayos, especialmente espectrofotométricos, sólo pueden determinar la cinética de las enzimas a concentraciones de la enzima y del sustrato muy bajas, las pruebas histoquímicas en medios sólidos no solo permiten determinar la actividad de la enzimas sino otros efectos, derivados de esta actividad, en relación a la masa de sustrato en rangos muy amplios de concentraciones y sin limitante de la naturaleza emulsificante o no de la muestra.

El análisis de correlación indica una interdependencia entre las propiedades de BERO™ y los cambios en los parámetros de emulsificación y variables reológicas: esta interdependencia se da entre E24 de B26 y las actividades de proteasa ($p = 0,033^*$; $R = 0,791$) y lipasa ($p = 0,015^*$; $R = 0,851$), para el aceite la capacidad de emulsificación está relacionada a la actividad de lipasa únicamente ($p = 0,018^{**}$; $R = 0,837$). Los cambios del ángulo de contacto, presentaron correlaciones negativas con las actividades de lipasa y proteasa en la superficie hidrofílicas para B26 (lipasa: $p = 0,0154^*$, $R = -0,8500$; proteasa: $p = 0,0443^*$, $R = -0,7668$), en la superficie hidrofóbica para el aceite (lipasa: $p = 0,0418^*$, $R = -0,7724$; proteasa: $p = 0,0013^{**}$, $R = -0,9449$); para B26 en la superficie hidrofóbica sólo se presentó una relación estadísticamente significativo con la actividad de lipasa ($p = 0,0416^*$, $R = -0,7728$), lo cual está en

concordancia con la estrecha relación entre la actividad de lipasa y la tensión superficial ($p = 0,0035956^{**}$, $R = -0,91745$). Aunque la viscosidad y tensión superficial son interdependientes ($p = 0,00033318^{***}$, $R = 0,96848$) sólo la viscosidad presentó una correlación negativa significativa con las actividades de proteasa y lipasa (proteasa: $p = 0,028568^{*}$, $R = -0,80607$; lipasa: $p = 0,00049616^{***}$, $R = -0,96299$). Los cambios reológicos que ocurren con B26 en relación a la actividad de proteasa pueden relacionarse a que las proteasas tienen un mayor rango de sustratos, con zonas específicas para su acción, que las lipasas, hay que considerar que en los bitumen los asfáltenos, y agregados de éstos, presentan zonas hidrofílicas en su estructura capaces de servir como sustrato a proteasas, lo cual no ocurre en los aceites refinados, siendo este segundo aspecto de gran importancia puesto las capacidades proteolíticas y lipolíticas de BERO™ fueron interdependientes ($p = 0.007^{**}$; $R = 0.889$).

La disminución de la viscosidad y la tensión superficial en B26 por BERO™, se deben a las actividades de proteasa y lipasa de BERO™; la generación de una emulsión estable es una propiedad que se ha observado en este producto hasta concentraciones de 1:10000. Una relación entre estabilidad de emulsiones y viscosidad se ha establecido para diferentes emulsiones de agua y bitúmenes y en todos los casos emulsiones inestables generan emulsiones de mayor viscosidad (Moran, 2007; Boucard et al., 2017), las emulsiones de B26 y BERO™ empiezan a hacerse inestables a diluciones mayores a 1:10000, concentración a la cual disminuyen significativamente las actividades de lipasa y proteasa, lo cual explica las interrelaciones que hemos visto anteriormente. La disminución de la viscosidad ha sido un factor esencial en el problema de la recuperación de crudos, una menor viscosidad mejora el flujo y por lo tanto la recuperación de éste (Naderi et al., 2015). La relación entre la recuperación de bitúmenes con la tensión superficial no ha sido más definitiva. Naderi et al. (2015), han observado que la disminución de la viscosidad de bitúmenes con solventes orgánicos (pentano), aumenta la tensión superficial con respecto al agua y disminuye la eficiencia en la recuperación de bitúmenes; sin embargo He et al. (2014), plantean que la relación entre la tensión superficial y viscosidad de emulsiones de bitúmenes y agua y su influencia en la eficacia en la recuperación de éstos es dependiente

del tipo de solvente y la fuente del bitumen mismo y que en todo caso una menor viscosidad y menor tensión superficial, con respecto al agua, favorecen la eficacia de la recuperación del bitumen. Esta condición de una menor viscosidad con menor tensión superficial sin el uso de solventes orgánicos y altas temperaturas es lograda con BERO™ hasta diluciones de 1:10000.

CONCLUSIONES

BERO™, es un producto con una elevada concentración de proteínas y ADN, y altamente soluble en agua; tiene una elevada actividad de lipasa y de proteasa, en general las actividades enzimáticas estuvieron asociadas a la concentración de proteínas. Aunque el estado de dilución de BERO™ fue el factor que condujo los cambios observados en las actividades de las enzimas, no fue un factor limitante, pues puede ejercer las actividades de lipasa y proteasa a diluciones relativamente altas generando emulsiones estables igual que en preparaciones más concentradas. Es necesario considerar que hay un factor de acceso a sustratos diferentes en el cual BERO™ es muy eficaz, pues a la mayor cantidad de sustratos presentes en el crudo favoreció su desempeño. La disminución de la viscosidad del bitumen y de la tensión superficial fueron dependientes de las actividades de lipasa y proteasa de este producto, así como la generación de emulsiones estables.

REFERENCIAS

Aurepatipan N., V. Champreda, P. Kanokratana, T. Chitov & S. Bovonsombut. 2018. Assessment of bacterial communities and activities of thermotolerant enzymes produced by bacteria indigenous to oil-bearing sandstone cores for potential application in Enhanced Oil Recovery. *J. Petrol. Sci. Eng.*, 163: 295-302. [doi: 10.1016/j.petrol.2017.12.077](https://doi.org/10.1016/j.petrol.2017.12.077)

Berry J.D., M.J. Neeson, R.R. Dagastine, D.Y.C. Chan & Rico F. Tabor. 2015. Measurement of surface and interfacial tension using pendant drop tensiometry. *J. Colloid Interf. Sci.*, 454(3): 226-237. [doi: 10.1016/j.jcis.2015.05.012](https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.05.012)

Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72(1-2): 248-254. [doi: 10.1006/abio.1976.9999](https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999).

Boon M.E. & L.P. Kok. 2004. Confocal microscopy for diagnostic cytology. *Micr. Today*, 12(3): 42-43. [doi: 10.1017/S1551929500052172](https://doi.org/10.1017/S1551929500052172)

Boucard L., V. Gaudefroy, E. Chailleux, F. Farcas & V. Schmitt. 2017. Bitumen emulsion destabilization kinetics: Importance of the crystallized wax content. *Langmuir*, 33(38): 9740-9749. [doi: 10.1021/acs.langmuir.7b01578](https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b01578).

Boulkour Touioui S., N. Zaraï Jaouadi, H. Boudjella, F. Zohra Ferradji, M. Belhoul, H. Rekik, A. Badis, S. Bejar & B. Jaouadi. 2015. Purification and biochemical characterization of two detergent-stable serine alkaline proteases from *Streptomyces* sp. strain AH4. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 31(7): 1079-1092. [doi: 10.1007/s11274-015-1858-6](https://doi.org/10.1007/s11274-015-1858-6).

Brugnara M. 2006 .Contact Angle plugin (for ImageJ software); marco.brugnara@ing.unitn.it; <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/contact-angle.html>

Corthorn J., S. Rey, C. Chacón & G. Valdés. 2007. Spatio-temporal expression of MMP-2, MMP-9 and tissue kallikrein in uteroplacental units of the pregnant guinea-pig (*Cavia porcellus*). *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 5(1): 27. [doi: 10.1186/1477-7827-5-27](https://doi.org/10.1186/1477-7827-5-27).

Daerr A. & A. Mogne. 2016. Pendent_Drop: An ImageJ Plugin to Measure the Surface Tension from an Image of a Pendent Drop. *J. Open Res. Soft.*, 4: e3. [doi: 10.5334/jors.97](https://doi.org/10.5334/jors.97).

Das A., S. Shivakumar, S. Bhattacharya, S. Shakya & S.S. Swathi. 2016. Purification and characterization of a surfactant-compatible lipase from *Aspergillus tamarii* JGIF06 exhibiting energy-efficient removal of oil stains from polycotton fabric. *3 Biotech*, 6: 131. [doi: 10.1007/s13205-016-0449-z](https://doi.org/10.1007/s13205-016-0449-z).

Duncke A.C.P., T.O. Marinho, C.N. Barbato, G.B. Freitas, M.C.K. de Oliveira & M Nele. 2016. Liquid Crystal Observations in Emulsion Fractions from Brazilian Crude Oils by Polarized Light Microscopy. *Energy & Fuels*, 30(5): 3815-3820.
[doi: 10.1021/acs.energyfuels.5b02943](https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.5b02943).

Gomes D.J.C., N.C. de Souza & J.R. Silva. 2013. Using a monocular optical microscope to assemble a wetting contact angle analyser. *Measurement* 46 (9) 3623-3627. [doi: 10.1016/j.measurement.2013.07.010](https://doi.org/10.1016/j.measurement.2013.07.010).

Ghaderian S.M.H., R. Akbarzadeh Najar, A.S. Tabatabaei Panah, G. Rezaie, A. Rezaei Farimani, A. Beigi Harchegani & E. Azargashb. 2010. Matrix metalloproteinase: Investigation from gene to protein as effective factor in myocardial infarction. *J. Thromb. Thrombolys.*, 30(4): 404-411.
[doi: 10.1007/s11239-010-0465-5](https://doi.org/10.1007/s11239-010-0465-5).

Hadler-Olsen E., P. Kanapathippillai, E. Berg, G. Svineng, JO Winberg & L. Uhlin-Hansen. 2010. Gelatin in situ zymography on fixed, paraffin-embedded tissue: Zinc and ethanol fixation preserve enzyme activity. *J. Histochem. Cytochem.*, 58(1): 29-39. [doi: 10.1369/jhc.2009.954354](https://doi.org/10.1369/jhc.2009.954354).

Hammer Ø., D.A.T. Harper & P.D. Ryan. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.*, 4(1): 9pp. (https://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf)

Hardie N.A., G. MacDonald & E.W. Rubel. 2004. A new method for imaging and 3D reconstruction of mammalian cochlea by fluorescent confocal microscopy. *Brain Res.*, 1000(1-2): 200-210. [doi: 10.1016/j.brainres.2003.10.071](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.10.071).

He L., L. Feng, X. Li, Z. Xu & H. Sui. 2014. Enhancing bitumen liberation by controlling the interfacial tension and viscosity ratio through solvent addition *Energ. Fuels*, 28(12): 7403-7410. [doi: 10.1021/ef501963e](https://doi.org/10.1021/ef501963e).

Khusainova A., A. Shapiro & J. Woodley. 2016. Enhanced Oil Recovery with Application of Enzymes. Ph.D. thesis, Technical University of Denmark (DTU), Kongens Lyngby, Denmark.

(http://orbit.dtu.dk/files/128129452/AlsuKhusainova_phd_thesis_Enhanced_Oil_Recovery_with_application_of_Enzymes_Final.pdf)

Lojda Z., R. Gossrau & T.H. Schiebler. 1979. Enzyme Histochemistry. A Laboratory Manual. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg. 339 p. [doi: 10.1007/978-3-642-67234-7](https://doi.org/10.1007/978-3-642-67234-7)

Mechria S., M.B. Elhoul Berrouina, M.O. Benmradi, N. Zeraï Jaouadi, H. Rekik, E. Moujeheda, A. Chebbi, S. Sayadi, M. Chamkha, S. Bejar & B. Jaouadi. 2017. Characterization of a novel protease from *Aeribacillus pallidus* strain VP3 with potential biotechnological interest. Int. J. Biol. Macromol., 94(Part A): 221-232. [doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.09.112](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.112).

Moran K. 2007. Roles of Interfacial Properties on the Stability of Emulsified Bitumen Droplets. Langmuir, 23(8): 4167-4177. [doi: 10.1021/la063290r](https://doi.org/10.1021/la063290r).

Nwinyi O.C., C.G. Ajomiwe & Y.A. Olawore. 2018. Morphological and biochemical characterization of biosurfactants producing bacteria from diesel contaminated soil. Int. J. Agr. Biol., 20(1): 1-7. [doi: 10.17957/IJAB/15.0169](https://doi.org/10.17957/IJAB/15.0169)

Okino-Delgado C.H., D. Zanoni do Prado, R. Facanali, M.M Ortiz Marques, A. Santana Nascimento, C.J. da Costa Fernandes, W.F. Zambuzzi & L. Francisco Fleuri. 2016. Bioremediation of cooking oil waste using lipases from wastes. PLoS ONE, 12(10): e0186246. [doi: 10.1371/journal.pone.0186246](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186246).

Ott W.K., T. Nyo, W.N. Aung & A.T. Khaing. 2011. EEOR Success in Mann Field, Myanmar. Artículo de Conferencia en SPE Enhanced Oil Recovery Conference, 19-21 Julio, Kuala Lumpur, Malaysia. [doi: 10.2118/144231-ms](https://doi.org/10.2118/144231-ms)

Rawlings N.D. 2013. Protease Families, Evolution and Mechanism of Action. En K. Brix & W. Stöcker (eds.), *Proteases: Structure and Function*. Pp. 1-36. Springer-Verlag. Viena. [doi: 10.1007/978-3-7091-0885-7_1](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0885-7_1)

Reyes-Duarte D., M. Ferrer & H. García-Arellano. 2012. Functional-Based Screening Methods for Lipases, Esterases, and Phospholipases in Metagenomic Libraries. Pp. 101-113. En Georgina Sandoval (ed.), *Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, vol. 861. Springer Science -Business Media. New York. [doi: 10.1007/978-1-61779-600-5_6](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5_6).

Saravia-Otten P., B. Robledo, T. Escalante, L. Bonilla, A. Rucavado, B. Lomonte, R. Hernández, J.I. Flock, J.M. Gutiérrez & S. Gastaldello. 2013. Homogenates of skeletal muscle injected with snake venom inhibit myogenic differentiation in cell culture. *Muscle Nerve*, 47(2): 202-212. [doi: 10.1002/mus.23489](https://doi.org/10.1002/mus.23489).

Sharma R., Y. Chisti & U.C. Banerjee. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.*, 19(8): 627-662. [doi:10.1016/s0734-9750\(01\)00086-6](https://doi.org/10.1016/s0734-9750(01)00086-6).

Srivastava N., R.D. Davenport, & M.A. Burns. 2005. Nanoliter viscometer for analyzing blood plasma and other liquid samples. *Anal. Chem.*, 77(2): 383-392. [doi: 10.1021/ac0494681](https://doi.org/10.1021/ac0494681).

Takano S., K. Tsuboi, A. Matsumura, H. Sato & T. Nose. 2001. Localization of gelatinase activities in glioma tissues by film in situ zymography. *Brain Tumor Pathol.*, 18(2): 145-150. [doi: 10.1007/BF02479428](https://doi.org/10.1007/BF02479428).

Tas S.W., N. Hajji, D.J. Stenvers, G.S. Firestein, M.J. Vervoordeldonk & P.P. Tak. 2006 Reduction of proinflammatory cytokine expression in the synovium by targeting IKK β in vivo in a rat model. *Arthritis Rheum.*, 54(11): 3716-3718. [doi: 10.1002/art.22188](https://doi.org/10.1002/art.22188)

Tavano O.L., A. Berenguer-Murcia, F. Secundo & R. Fernandez-Lafuente. 2018. Biotechnological Applications of Proteases in Food Technology. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety*, 17(2): 412-436. [doi: 10.1111/1541-4337.12326](https://doi.org/10.1111/1541-4337.12326).

Thijssen J.H.J., A.B. Schofield & P.S. Clegg. 2011. How do (fluorescent) surfactants affect particle-stabilized emulsions?. *Soft Matter*, 7(18): 7965-768. [doi: 10.1039/c1sm05968h](https://doi.org/10.1039/c1sm05968h)

ANEXOS

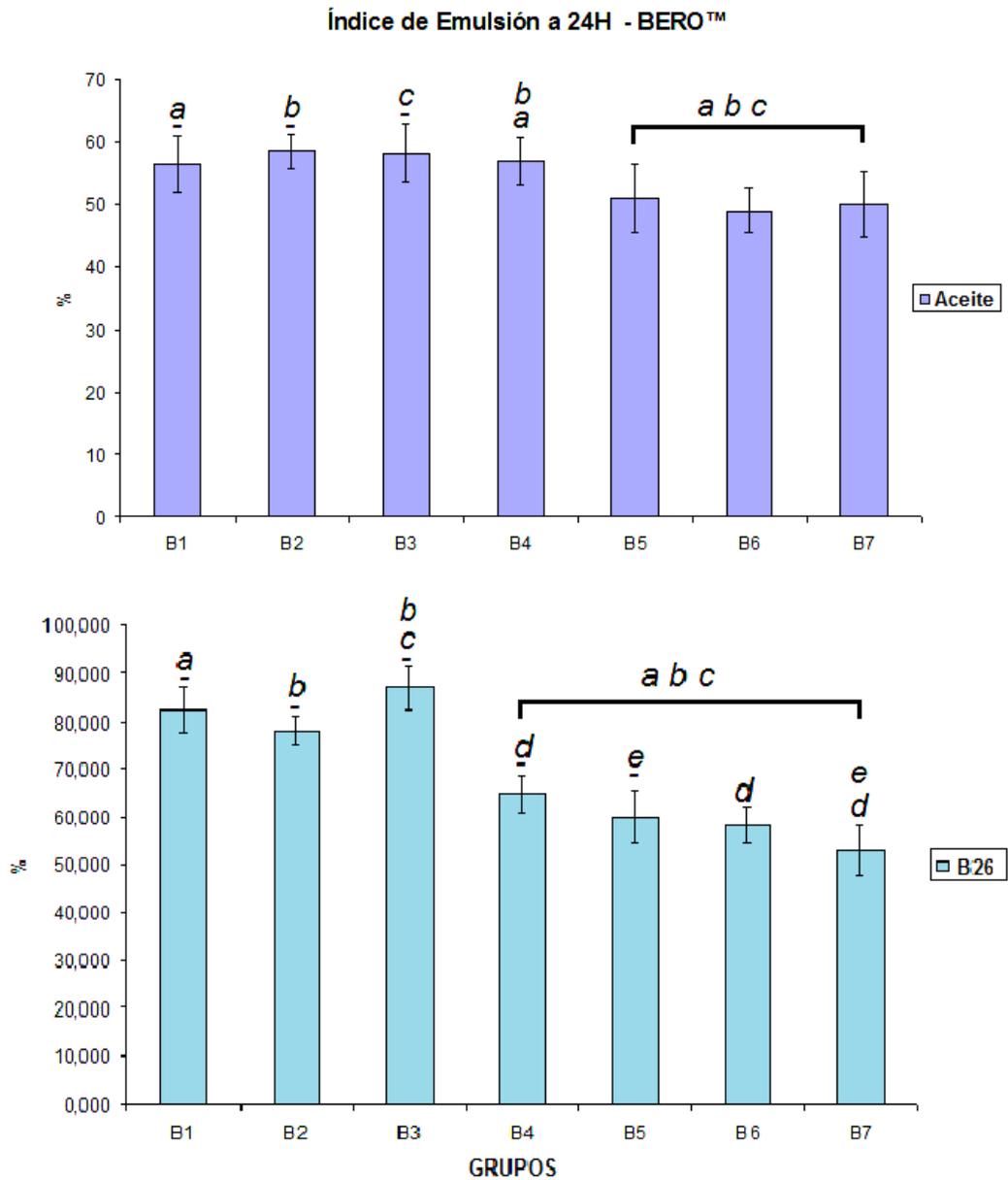


FIGURA 1. Gráfica que representa la capacidad emulsificante de BERO™, representando los cambios en el índice E24 para cada grupo usando aceite de ajonjolí y B26.

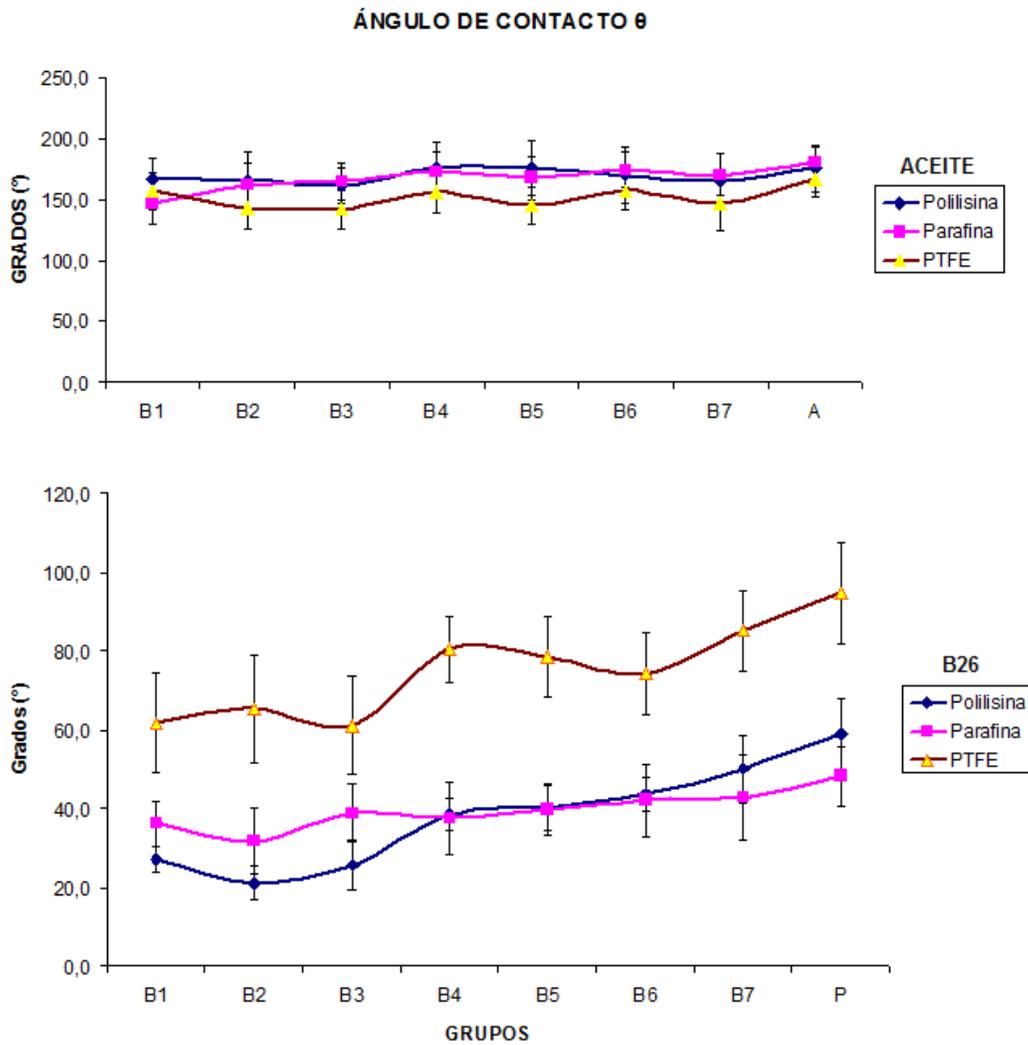


FIGURA 2. Gráficas que representa el ángulo de contacto θ en fracciones emulsificadas de aceite de ajonjolí y B26 con BERO™. P = bitumen puro (B26), A = aceite de ajonjolí puro

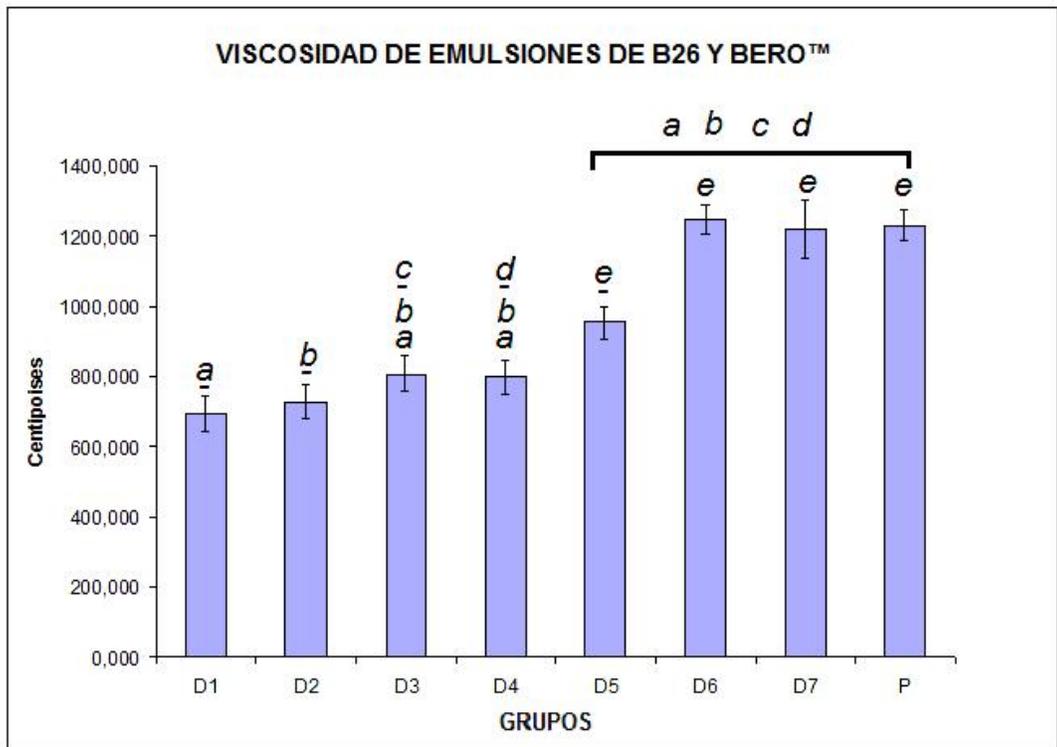


FIGURA 3. Gráficas que representa la viscosidad de las emulsiones de B26 con BERO™ a distintas diluciones. P = bitumen puro (B26).

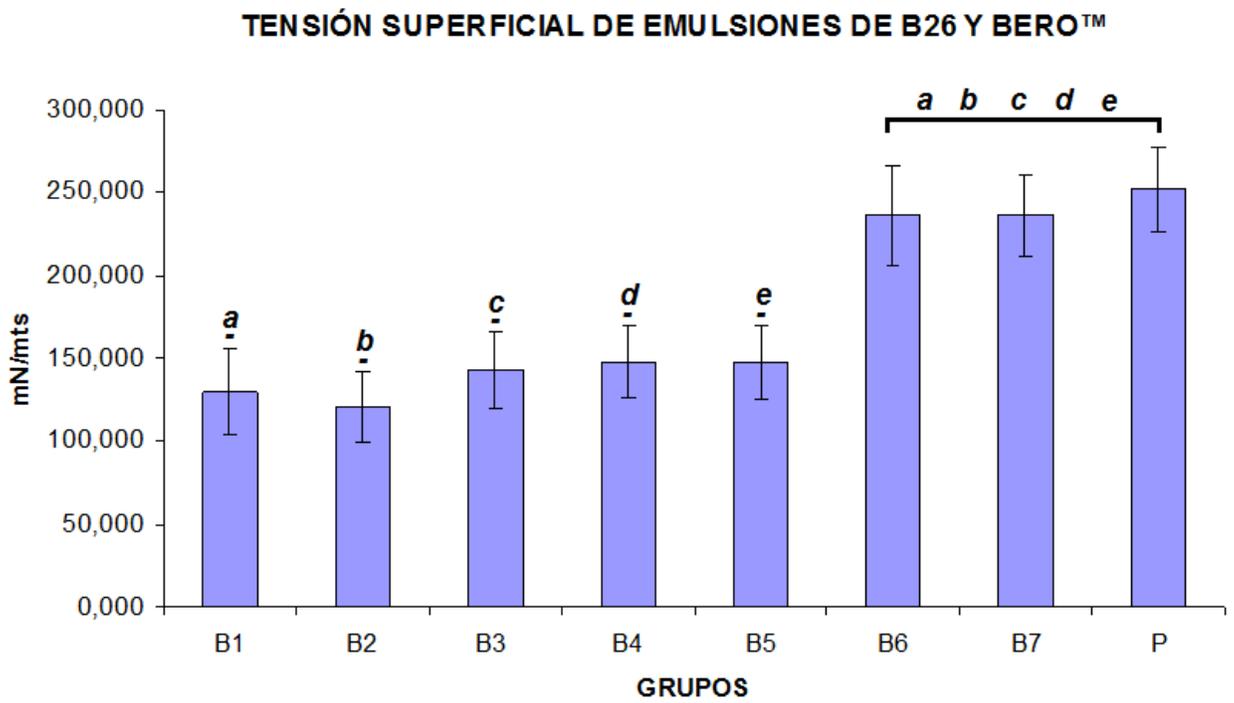


FIGURA 4. Gráficas que representa la tensión superficial de las emulsiones de B26 con BERO™ a distintas diluciones. P = bitumen puro (B26).

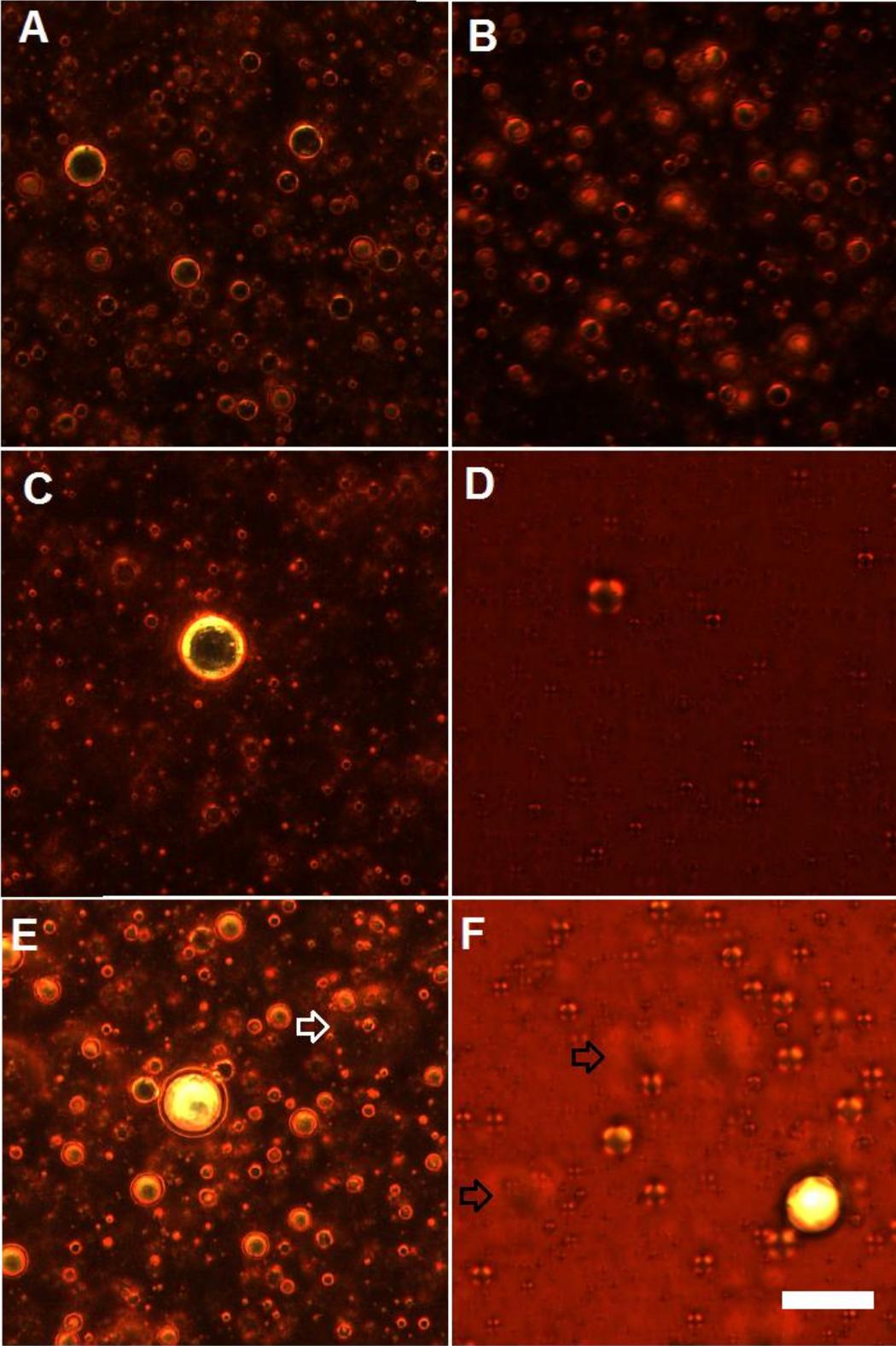


FIGURA 5-1

Fotomicrografía del material emulsionado de B26 y BERO™, visto con microscopía de campo oscuro y polarización. B1 sin diluir (A) y a una dilución de 1:10 (B). (C) B3, visto con microscopía de campo oscuro, detalles de una gota grande y pequeñas D) B3, campo próximo al mostrado en C) visto con microscopía de polarización para mostrar las pseudo-cruces de malta en las gotas. (E) B4 Campo visto con campo oscuro la flecha indica un cuerpo amorfo, correspondiente a gotas de agua. F) B4 campo cercano al mostrado en E), visto mediante luz polarizada, las flechas indican gotas de agua. Tamaño de la barra 10 μm .

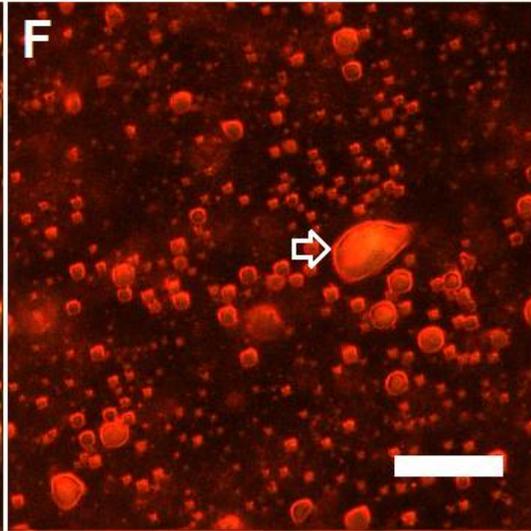
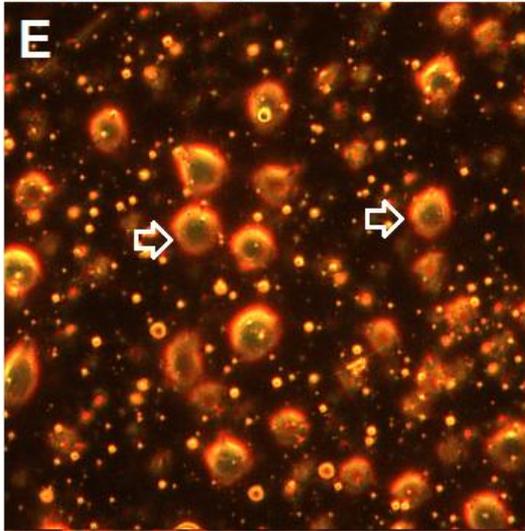
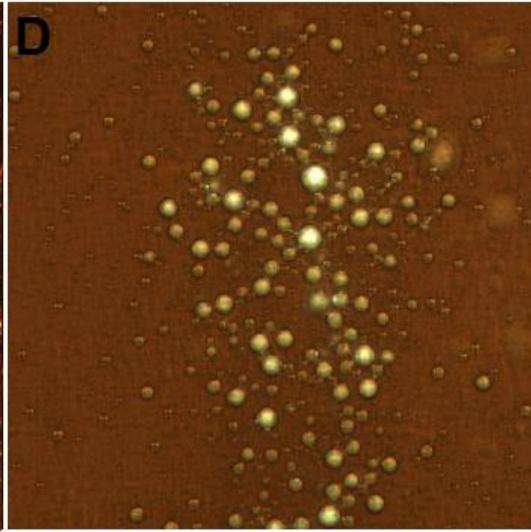
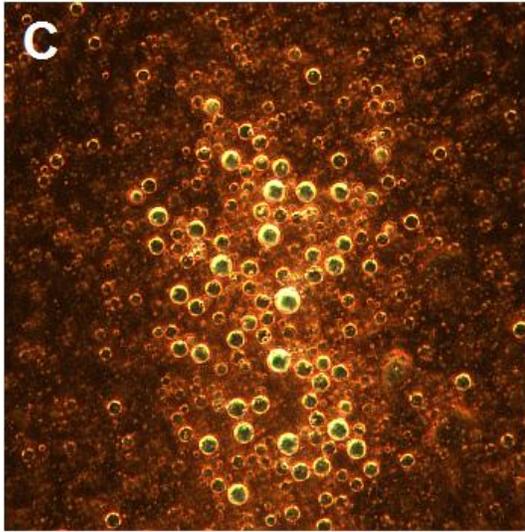
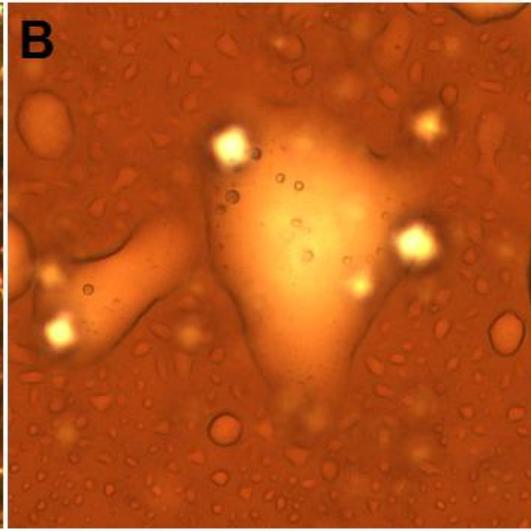
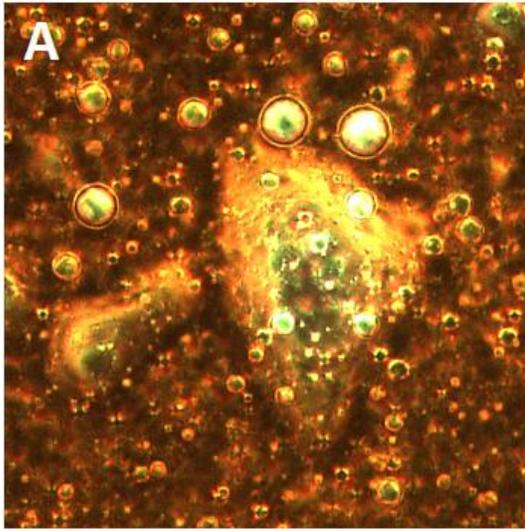


FIGURA 5-2

Fotomicrografía del material emulsionado de B26 y BERO™, visto con microscopía de campo oscuro y polarización. (A) B5 se muestra gotas de emulsión sobre una masa de agua visto mediante campo oscuro. (B) Campo visto en A pero mediante campo claro para observar las gotas de agua diferentes a las de emulsión. (C) B6, visto con microscopía de campo oscuro, se muestra como se separan las gotas de emulsión. (D) Campo observado en C) pero visto con campo claro para observar las gotas de emulsión fusionándose. (E) B6 Gotas de agua visto con campo oscuro las flechas señalan gotas de agua. (F) B7 Gotas de agua predominantes en el campo, la flecha indica una de mayor tamaño. Tamaño de la barra 10 μm .

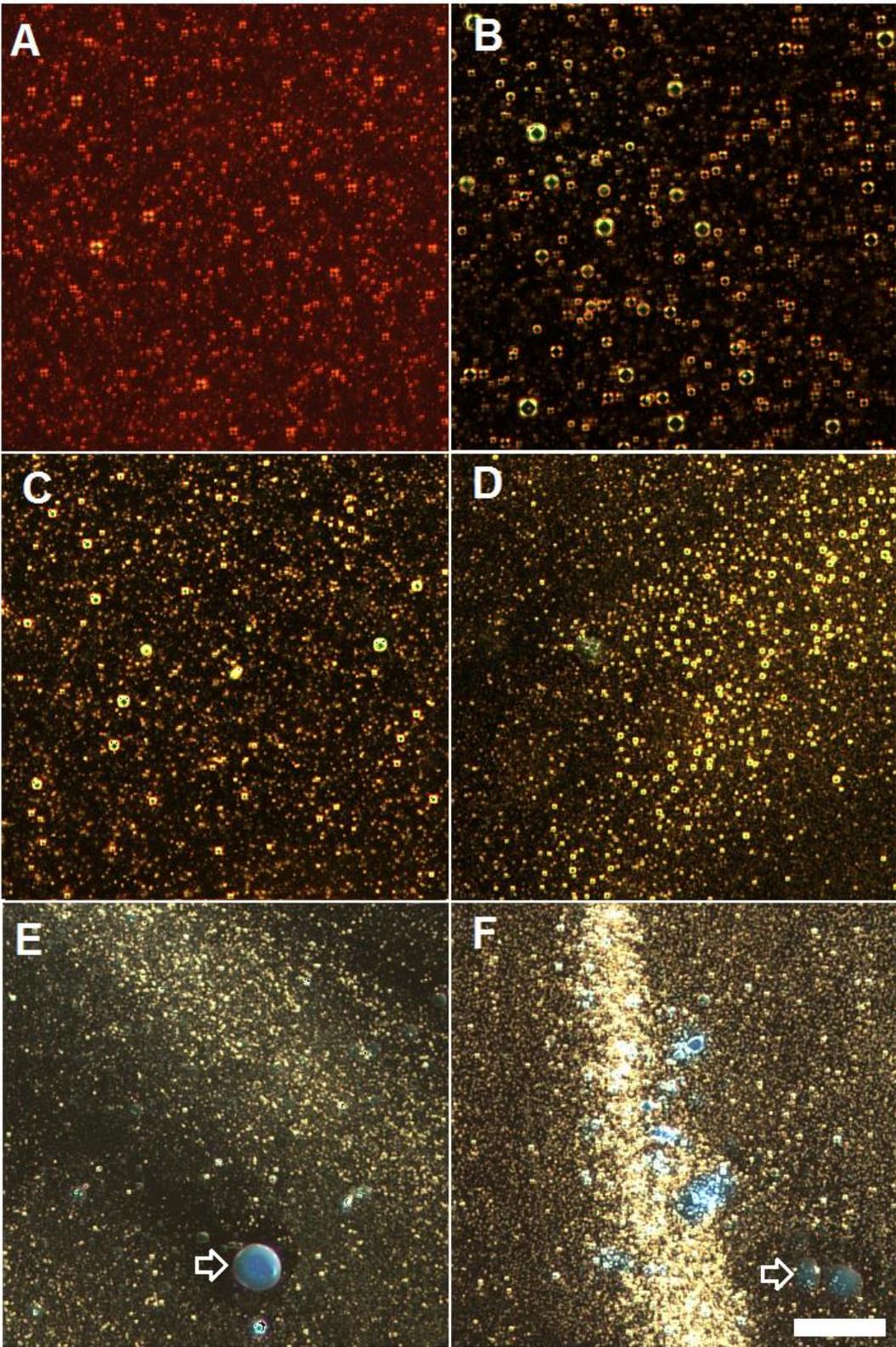


FIGURA 6-1

Fotomicrografía del material emulsionado de B26 y BERO™, visto con microscopía de polarización. (A) B26 P puro se observan cuerpos que presentan la cruz de malta y corresponden principalmente a asfáltenos. (B) B1, se observan formaciones de asfáltenos y grandes gotas de emulsión. (C) B2, al igual que en (B) se observan gotas de emulsión y cuerpos de asfáltenos refringentes dispersos homogéneamente. (D) B3, se empieza a observar agrupaciones correspondientes a asfáltenos y gotas de emulsión; aun hay cierta homogeneidad. (E) B4 acumulaciones de asfáltenos, separación de las fases resinosa y acuosa, la flecha indica una gota de agua. (F) B5, para este grupo la separación es más evidentes y ya se forman masas de asfáltenos junto a gotas de agua. Tamaño de la barra 100 μm para (E) y (F), para el resto de las figuras 50 micras.

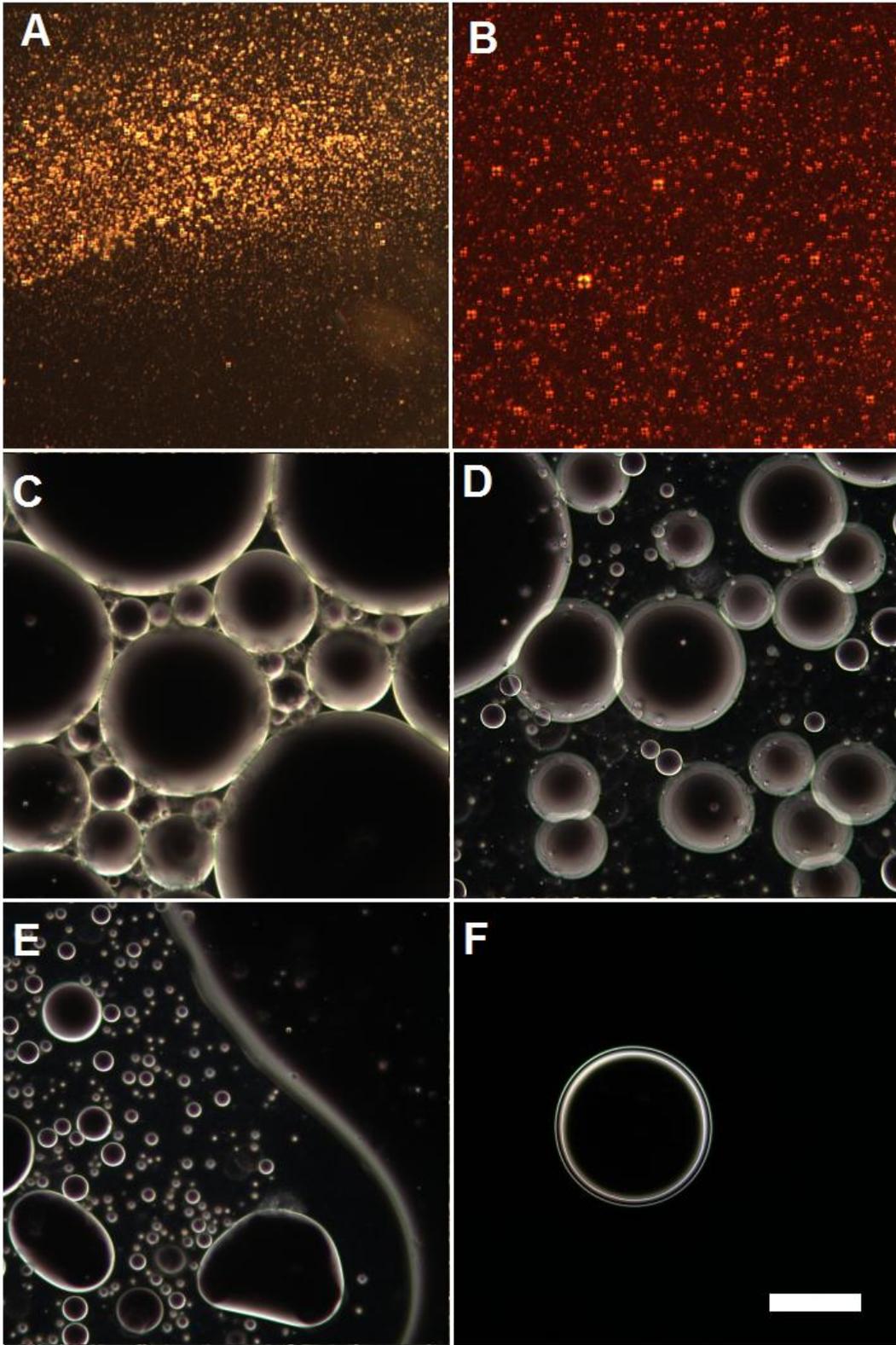


FIGURA 6-2

Fotomicrografía del material emulsionado de B26 y BERO™, visto con microscopía de polarización. (A) B6 se observa una separación de fases con masas de asfáltenos. (B) B7, se observan una morfología parecida al B26 puro con homogeneidad sin separación de fases. (C) B1, emulsión de aceite y B1, con grandes gotas de emulsión (D) B3 se observan gotas de emulsión más pequeñas que en B1 y escasas con una fase lipídica en expansión. (E) B5, se empieza a observar agrupaciones gotas de emulsión en fases separadas y el colapso de la emulsión. (F) B7, se ha eliminado todo rastro de emulsión, en esta foto se observa una gota de aire en una fase lipídica. Tamaño de la barra 100 μm para (A) y (B), para el resto de las figuras 15 micras.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LIPASAS

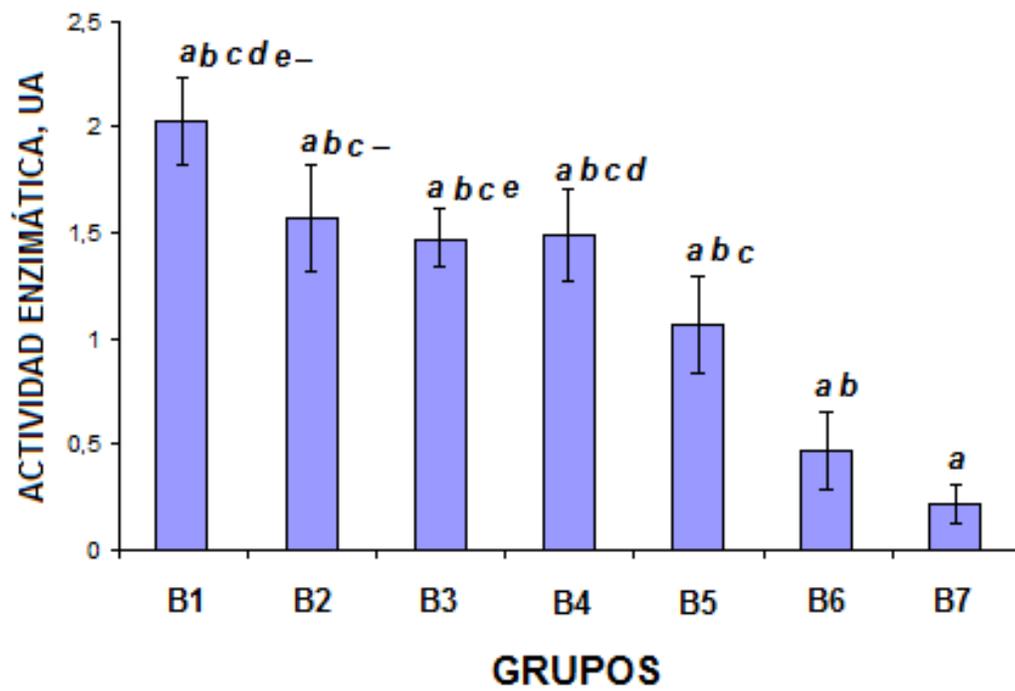


FIGURA 7. Gráfica de la actividad enzimática de lipasa de BERO™.

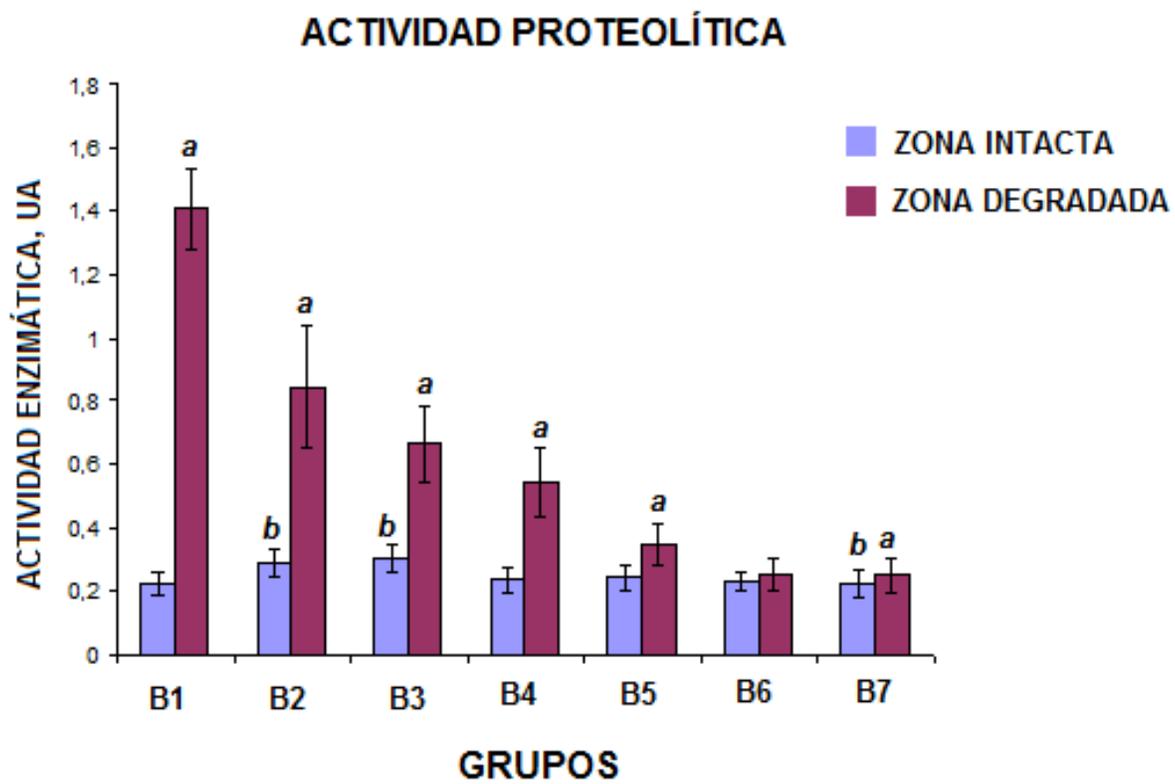


FIGURA 8. Gráficas de la actividad de proteasa de BERO™.

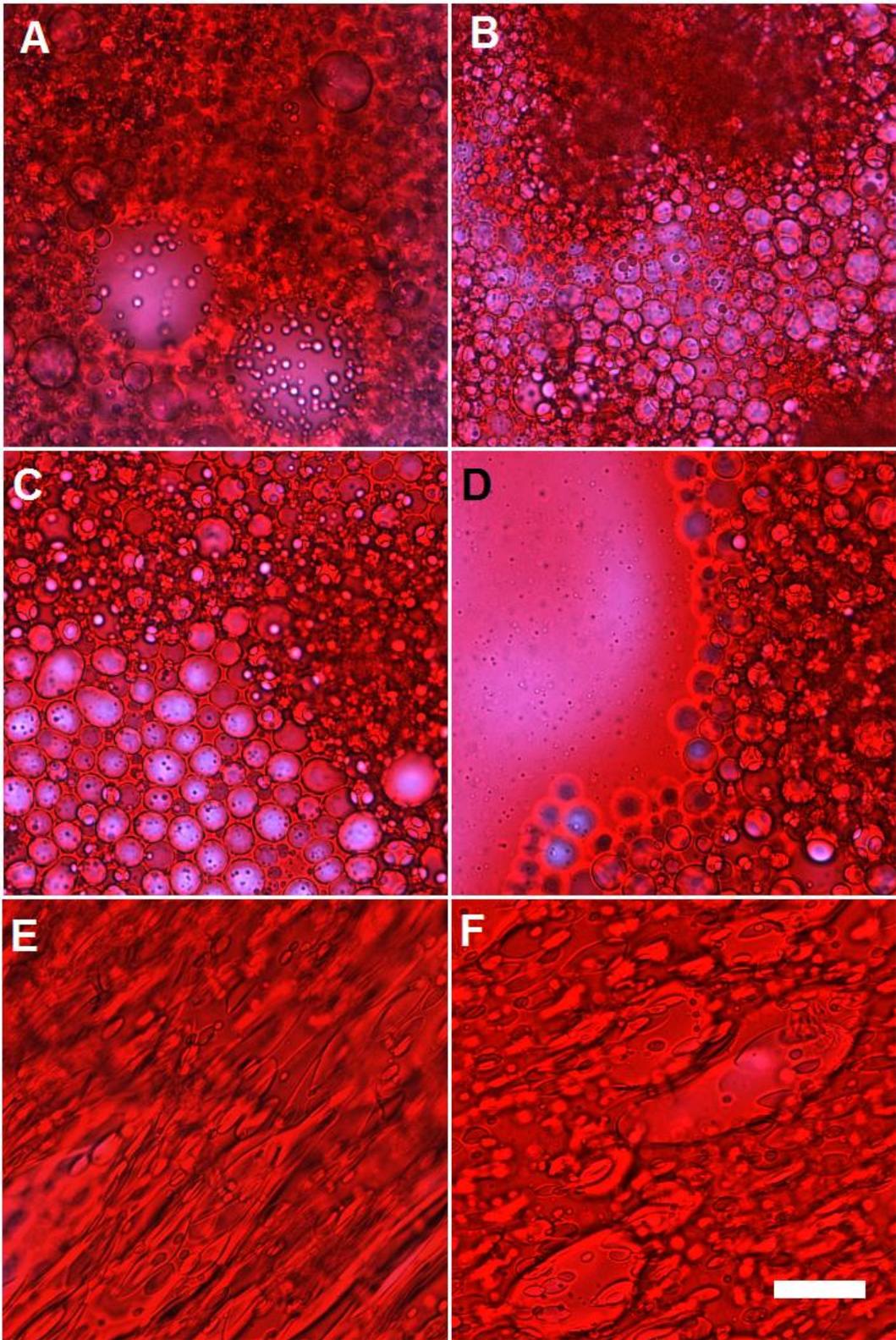


FIGURA 9

Fotomicrografía de las zonas con actividad proteolítica, mostrando el patrón intensidades de tinción para los diferentes tratamientos. A) Grupo B1, BERO™ pura B) Grupo B2, BERO™ a 1:10. C) Grupo B3, BERO™ a 1:100. D) Grupo B4, BERO™ a 1:1000. E) Grupo B5, BERO™ a 1:10000, A) Grupo B6, BERO™ a 1:100000. Tamaño de la barra: 100 μm .