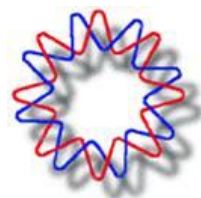




**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---



**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**

**DISEÑO DE UN BIOCATALIZADOR TRICOMPONENTE PARA  
DESULFURACIÓN EN MEDIOS ORGÁNICOS**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO  
DE MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**EDNA LORENA HERNÁNDEZ LÓPEZ**

**TUTOR DE TESIS: DR. RAFAEL VAZQUEZ DUHALT**

**CUERNAVACA, MORELOS 2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**El presente trabajo se realizó bajo la asesoría del Dr. Rafael Vázquez Duhalt en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.**

**Los estudios de maestría fueron posibles gracias a la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).**

**DEDICO ESTE TRABAJO,**

A mi hermosa familia, mis padres Adán y Alba Ruth, y a mi hermanita Marian Lizeth por ser el pilar de mi vida.

Y a mis abuelos, tíos y primos que siempre han estado conmigo.

## **AGRADEZCO,**

De manera muy especial al Dr. Rafael Vázquez Duhalt por haberme permitido ingresar a su laboratorio, por sus enseñanzas y la paciencia durante el desarrollo de mi proyecto de maestría.

A los miembros del comité tutorial, Dr. Eduardo Torres, Dr. Edmundo Castillo y la Dra. Marcela Ayala por los aportes durante cada semestre

A la Dra. Lucia Perezgasga Ciscomani por sus aportes al trabajo.

Al Dr. Sergio Águila por su ayuda en el análisis de datos.

A la Bióloga. Rosa Román por el apoyo técnico en los diferentes experimentos realizados.

A CONACYT por la beca otorgada durante la maestría.

A mis amigos del laboratorio Bere, CrisTo, Cris U, Lore y Abraham, por su apoyo que de alguna manera contribuyó al desarrollo de mi trabajo y también por los buenos momentos compartidos.

Y en general a los recalcitrantes por hacer de nuestro laboratorio un lugar tranquilo y agradable para el desarrollo de nuestro trabajo.

## **AGRADEZCO,**

Primero que todo a Dios por iluminar mi camino día a día para alcanzar la meta propuesta.

A mis padres Adán y Alba Ruth por todo el amor que me han dado, el cual ha sido el pilar para mantenerme lejos de casa, con el ideal de realizar mis estudios de posgrado. Por sus consejos y apoyo durante cada uno de los días de mi vida. A mi hermanita Marian, a quien quiero con todo mi corazón por ser ante todo mi amiga y demostrarme siempre su apoyo en los momentos cotidianos y no tan cotidianos de mi vida.

A mis abuelos Adán, Gildardo, Josefina y Ruby porque desde muy pequeña me enseñaron el valor del trabajo y de luchar por lo que se quiere. A toda mi familia en Colombia quienes siempre estuvieron al pendiente de mi desarrollo profesional. Y a la hermana Gloria por su apoyo espiritual desde que era una niña.

A mi amiga Claudia por su amistad y apoyo incondicional durante todos estos años.

A mi amiga Lilu, por sus enseñanzas, consejos y amistad sincera en este tiempo que llevamos de conocernos.

A mis amigos en Colombia que son una lista grande pero cada quien sabe que está allí, y que fueron parte de este proceso de crecimiento a nivel profesional.

A las Sagima presentes en mi vida desde muy niñas y apoyándonos mutuamente a pesar de la distancia.

A mis amigos mexicanos, en especial Bere, Ale, Sara, Cess, Cris U, Cris To, Lore y Abraham y todos los que entraron en mi grande lista de personas que siempre recordaré por los buenos momentos vividos.

A mis amigos colombianos que se encuentran en México por hacerme sentir como en casa.

## ÍNDICE

1. INTRODUCCION Y ANTECEDENTES .....	1
1.1. Desulfuración de los combustibles fósiles .....	2
1.1.1. Hidrodesulfurización.....	2
1.1.2. Biodesulfurización .....	3
1.2 BIOCATALISIS EN SOLVENTES ORGANICOS.....	5
1.3 PEROXIDASAS EN LA TRANSFORMACION DE COMPUESTOS ORGANOAZUFRADOS.....	6
1.3.1. Cloroperoxidasa.....	8
1.3.2. Peroxidasa de rábano blanco.....	9
1.3.3. Citocromo c.....	10
1.4. INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS .....	11
1.4.1. Tipos de soportes para inmovilización de enzimas .....	12
1.4.2. Polímeros sintéticos .....	13
1.4.3. Polímeros naturales .....	13
1.4.4. Soportes activados con grupos epóxidos para inmovilizar enzimas .....	14
1.4.5. Modelo propuesto de inmovilización “Sistema tricomponente” .....	15
2. HIPOTESIS.....	16
3. OBJETIVOS.....	16
3.1. Objetivo general.....	16
3.2. Objetivos específicos .....	16
4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
5.1. Reactivos y enzimas .....	19
5.2. Equipos.....	19
5.3. Construcción de soportes activados con grupos epóxidos. ....	20

5.4. Inmovilización directa sobre soportes activados con grupos epóxidos [Poli (etileno-co-metil acrilato-co-glicidil metacrilato)].	20
5.5. Inmovilización con hexandiamina mediante carbodiimida sobre soportes activados con grupos epóxidos.	20
5.6. Inmovilización sobre membranas de Nylon mediada por glutaraldehído.	21
5.7. Determinación de cantidad de enzima o proteína inmovilizada.	21
5.8. Determinación de actividad enzimática de los biocatalizadores.	22
5.9. Modificación química de la cloroperoxidasa con quitosano mediada por etilencarbodiimida.	22
5.10. Modificación química con quitosano mediada por etilencarbodiimida de Peroxidasa de rábano blanco.	23
5.11. Modificación química del citocromo c de corazón de caballo con quitosano mediada por etilencarbodiimida.	23
5.12. Modificación química del conjugado con quitosano con polietilén glicol activado con aldehído.	24
5.12.1. Modificación del conjugado CPO-quitosano (cloroperoxidasa) con polietilén glicol activado con aldehído.	24
5.12.2. Modificación del conjugado HRP-quitosano (Peroxidasa de rábano blanco) con polietilén glicol activado con aldehído.	24
5.12.3. Modificación del conjugado Citocromo c-quitosano con polietilén glicol activado con aldehído.	24
5.12.4. Modificación del conjugado cloroperoxidasa-quitosano con polietilén glicol activado con cloruro cianúrico.	25
5.13. Determinación de actividad enzimática antes y después de modificación química de proteínas.	25
5.14. Ensayos en soluciones ternarias con solventes orgánicos.	26
5.15. Determinación de la estabilidad en sistemas ternarios (Hexano-Isopropanol-Agua).	27
5.16. Determinación de la termoestabilidad de la CPO libre y conjugada con quitosano a 60°C.	28
5.17. Determinación del coeficiente de extinción molar para el tiantreno en los sistemas ternarios basados en hexano.	28
5.18. Cromatografía en fase reversa.	29
5.19. Gel de poliacrilamida.	29



5.20. Determinación del tamaño de los bioconjugados .....	29
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
6.1. Inmovilización directa sobre soportes activados con grupos epóxidos (Poli (etileno-co-metil acrilato-co-glicidil metacrilato)), e inmovilización sobre membranas de Nylon parcialmente hidrolizadas de la enzima peroxidasa de rábano blanco.....	31
6.2. Inmovilización directa sobre soportes activados con grupos epóxidos (poli (etileno-co-metil acrilato-co-glicidil metacrilato)) de las enzimas cloroperoxidasa, citocromo c y peroxidasa de rábano blanco.....	33
6.3. Inmovilización sobre soportes de (poli(etileno-co-metil acrilato-co-glicidil metacrilato)) activados con grupos epóxidos con hexandiamina mediada por N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida, clorhidrato de las enzimas cloroperoxidasa, citocromo c y peroxidasa de rábano blanco.....	34
6.4. Evaluación de la actividad enzimática de los biocatalizadores .....	36
6.5. Modificación con quitosano de las tres proteínas; cloroperoxidasa, peroxidasa de rábano blanco y citocromo c.....	39
6.6. Modificación del conjugado con quitosano a través de polietilenglicol aldehído de las tres proteínas; cloroperoxidasa, peroxidasa de rábano blanco y citocromo c.....	39
6.6.1. Conjugación de la Peroxidasa de rábano blanco con quitosano .....	40
6.6.2. Conjugación de la Peroxidasa de rábano blanco – quitosano con Polietilenglicol ..	40
6.6.3. Conjugación del Citocromo c de corazón de caballo con quitosano .....	42
6.6.4. Conjugación del Citocromo c de corazón de caballo - quitosano con Polietilenglicol .....	42
6.6.5. Conjugación de la Cloroperoxidasa con quitosano.....	43
5.6.3. Conjugación de la Cloroperoxidasa-quitosano con polietilenglicol.....	44
6.7. Determinación del grado de modificación de la enzima cloroperoxidasa con quitosano y polietilenglicol mediante la técnica del “light scattering” .....	49
6.8. Evaluación de la actividad de los conjugados en soluciones ternarias utilizando como sustrato tiantreno .....	52
6.8.1. Citocromo c de corazón de caballo .....	52
6.8.2. Peroxidasa de rábano blanco.....	53
6.8.3. Cloroperoxidasa.....	54
6.8.5. Estabilidad de los biocatalizadores .....	60
7. CONCLUSIONES .....	67

8. PERSPECTIVAS .....	69
9. BIBLIOGRAFIA.....	70

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Características de proceso de la desulfurización enzimática y metabólica .....	4
Tabla 2 Inmovilización de la peroxidasa de rábano blanco .....	32
Tabla 3 Inmovilización directa de tres peroxidases sobre polímero.....	33
Tabla 4 Inmovilización de tres peroxidases sobre polímero usando hexandiamina.....	36
Tabla 5 Inmovilización de cloroperoxidasa.....	37
Tabla 6 Inmovilización de citocromo c .....	37
Tabla 7 Inmovilización de la peroxidasa de rábano blanco .....	38
Tabla 8 Modificación de la peroxidasa de rábano blanco .....	41
Tabla 9 Modificación de Citocromo c .....	43
Tabla 10 Modificación cloroperoxidasa (Pegilación pH 5.0) .....	45
Tabla 11. Modificación Cloroperoxidasa (Pegilación pH 7.0) .....	45
Tabla 12 Balance de actividad .....	49
Tabla 13 Tamaños promedio de la enzima CPO y conjugados.....	50
Tabla 14 Actividad Específica para la oxidación de tiantreno por parte de la CPO libre en sistemas basados en hexano.....	56
Tabla 15 Constantes cinéticas de la enzima CPO libre y conjugada con quitosano y polietilenglicol en sistemas ternarios basados en hexano para la oxidación de tiantreno .....	60

## INDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Perfiles de microdestilación de diesel primario no tratado y enzimáticamente tratado. FID Flame ionization detector (detector general). FPD Flame photometric detector (detector selectivo para azufre) CPO (Cloroperoxidasa) [8] .....	5
Ilustración 2. Estructura de la cloroperoxidasa del hongo <i>C. fumago</i> . Fuente: Protein Data Bank, 1-CPO .....	9
Ilustración 3. Estructura de la Peroxidasa de rábano blanco. Fuente: Protein Data Bank, 1HCH.....	10
Ilustración 4. Estructura de la Peroxidasa de rábano blanco. Fuente: Protein Data Bank, 1LC1 .....	11
Ilustración 5. Modelo sistema tricomponente .....	15
Ilustración 6. Determinación de coeficientes de extinción molar para tiantreno en el sistema 1 y 6. ....	29
Ilustración 7. Mecanismo de reacción de la carbodiimida con grupos carboxilo de las proteínas.....	35
Ilustración 8. Porcentaje de actividad de los conjugados enzimáticos de la Peroxidasa de Rábano Blanco .....	41
Ilustración 9. Porcentaje de actividad enzimática de los conjugados de Citocromo c.....	43
Ilustración 10 . Porcentaje de actividad de los conjugados enzimáticos de Cloroperoxidasa.....	46
Ilustración 11. Porcentaje de actividad de los conjugados enzimáticos de Cloroperoxidasa (Pegilación pH 7.0).....	46
Ilustración 12. Porcentaje de actividad de la Cloroperoxidasa después de la modificación con quitosano y PEGactivado con cloruro cianúrico .....	47
Ilustración 13. Gel de Poliacrilamida 12% .....	48
Ilustración 14. Distribución por tamaño de la enzima y sus conjugados .....	51
Ilustración 15. Cromatografía en fase reversa (A y B). Reacción de la peroxidasa de rábano blanco con tiantreno en un 20% de acetonitrilo.....	54
Ilustración 16. Actividad de los bioconjugados en la oxidación del tiantreno en sistemas ternarios basados en hexano.....	57
Ilustración 17. Estabilidad al almacenamiento en refrigeración de la CPO-Q durante 70 días.....	61
Ilustración 18. Cinéticas de termoestabilidad de la CPO, CPO-Q y CPO-Q-PEG .....	62
Ilustración 19. Actividad residual de la enzima libre y conjugada después de una hora de incubación a una temperatura de 60°C.....	63
Ilustración 20. Cinéticas de estabilidad en el medio de reacción para la CPO, CPO-Q y CPO-Q-PEG .....	65
Ilustración 21. Actividad residual de la enzima libre y conjugada después de una hora y media de incubación en un medio compuesto por tres solventes (hexano-isopropanol-agua) .....	66

## ABREVIATURAS

**CPO: Cloroperoxidasa**

**HRP: Peroxidasa de rábano de blanco**

**CITC: Citocromo c**

**CPO-Q: Cloroperoxidasa quitosano**

**HRP-Q: Peroxidasa de rábano blanco quitosano**

**CITC-Q: Citocromo c quitosano**

**CPO-Q-PEG: Citocromo c quitosano polietilenglicol**

**HRP-Q-PEG: Peroxidasa de rábano blanco quitosano polietilenglicol**

**CITC-Q-PEG: Citocromo c quitosano polietilenglicol**

**PEMAGM: (poli (etileno-co-metil acrilato-co-glicidil metacrilato))**

## 1. INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

La contaminación atmosférica es un grave problema y ha generado una serie de impactos en todos los ecosistemas. Las regiones industrializadas son los principales lugares afectados, en donde la emisión de gases, principalmente generada por la utilización de combustible de fósiles, ha llevado a un aumento en la concentración de compuestos tóxicos en la atmósfera [1, 2].

Una de las consecuencias de las emisiones de gases de combustión es la lluvia ácida, la cual es principalmente una mezcla de ácido sulfúrico y ácido nítrico. La lluvia ácida se origina por la reacción de óxidos de azufre y nitrógeno, provenientes de la combustión de combustibles fósiles, con el agua atmosférica produciendo ácidos que bajan el pH de la lluvia. Las precipitaciones pluviales ácidas ocasionan la acidificación del suelo y cuerpos de agua, afectando seriamente los ecosistemas. Además, este fenómeno de la lluvia ácida puede tener también algunos efectos indirectos sobre la salud de los seres humanos. Durante las últimas dos décadas se ha realizado un esfuerzo para reducir la acidificación de los ecosistemas terrestres y acuáticos. En muchos países se ha legislado para disminuir los niveles de los precursores de la lluvia ácida que se encuentran principalmente en el petróleo, mediante los procesos de refinamiento del mismo. Estos precursores son compuestos que contienen átomos de azufre y nitrógeno en su estructura. Las legislaciones de todos los países son cada vez más estrictas en cuanto a los niveles de azufre permitidos en los combustibles fósiles. La remoción del azufre contenido en los combustibles derivados del petróleo es muy costosa, y en algunos casos no factible por medio de los procesos convencionales de refinación. La utilización de nuevas tecnologías, no convencionales, ha cobrado importancia ya que podrían mejorar la eficiencia del refinamiento en términos energéticos y reducir el impacto ambiental de los procesos. Dentro de estas metodologías no convencionales que puede ser introducido a la industria del refinamiento del petróleo se encuentran los procesos biotecnológicos [1, 2]

## 1.1. Desulfuración de los combustibles fósiles

### 1.1.1. Hidrodesulfurización

La tecnología de refinación del petróleo está ahora en un periodo de transición, ya que la demanda de este y sus productos han mostrado un crecimiento en los últimos años, mientras que la disponibilidad de crudos ligeros disminuye drásticamente. Es por esto que las refinerías tienen que implementar procesos que les permitan refinar crudos cada vez más pesados, siendo su principal preocupación convertir el combustible pesado en productos livianos. Los crudos pesados contienen constituyentes indeseables tales como asfaltenos, azufrados, metales pesados y compuestos nitrogenados. Por lo tanto encontrar procesos para la remoción de estos compuestos es de vital importancia para la industria petrolera [3]

El mejoramiento de la calidad del petróleo y sus residuos comienza con la introducción del proceso de hidrodesulfurización. Inicialmente la meta era solo la desulfuración pero en los últimos años los procesos fueron adaptados para obtener además un 10-30% de conversión parcial, con el propósito de alcanzar la desulfuración y obtener fracciones livianas al mismo tiempo, aumentando la severidad en las condiciones de operación [3].

Generalmente la remoción de organoazufrados de los combustibles fósiles es difícil, debido a que el azufre solo puede ser separado de la molécula orgánica cuando ciertos enlaces químicos son rotos. El rompimiento de tales enlaces requiere altas temperaturas y presiones. Una de las actuales tecnologías para reducir azufre es conocido como la hidrodesulfurización (HDS). En la hidrodesulfurización, el átomo de azufre en los compuestos azufrados es reducido a  $H_2S$  sobre catalizadores como  $CoMo/Al_2O_3$  o  $NiMo/Al_2O_3$  en la presencia de gas  $H_2$ . El ácido sulfhídrico generado es luego catalíticamente oxidado a azufre elemental. Dependiendo del tipo de hidrocarburo y el grado de desulfuración, la hidrodesulfurización puede ocurrir a 200-425°C y 150-250 psi en atmósfera de  $H_2$ . Para alcanzar bajas concentraciones de azufre (<15 mg/kg) temperaturas más altas y de presión son requeridas [4].

La hidrodesulfurización del petróleo crudo para obtener un producto con bajo contenido de azufre requiere un reactor de volumen grande, tiempos largos de proceso y entradas sustanciales de hidrogeno y energía. La tecnología de la hidrodesulfurización tiene varios problemas de proceso, lo cual limita su utilidad: a) la aplicación de condiciones extremas

para desulfurizar compuestos refractarios que resultan en la deposición de coque sobre los catalizadores; b) la exposición de fracciones del crudo a varias condiciones incluyendo temperaturas arriba de 360°C, lo que disminuye el valor combustible del producto tratado; c) el proceso de hidrodesulfurización necesita grandes inversiones de capital y/o tiene costos operacionales más altos; d) el H<sub>2</sub>S que es generado envenena el catalizador y acorta su vida media útil; e) la hidrodesulfurización es afectada por los componentes en la mezcla de reacción tales como heterocomponentes orgánicos e hidrocarburos aromáticos [5].

### **1.1.2. Biodesulfurización**

La biodesulfurización es frecuentemente considerada como una alternativa potencial al proceso de hidrodesulfurización convencional usado en las refinerías. En este proceso, los microorganismos remueven compuestos organoazufrados de las fracciones del petróleo sin degradar el esqueleto de carbono de los compuestos organoazufrados [5]. Los átomos de azufre forman de 0.5 – 1% del peso seco de la célula bacteriana por lo tanto los microorganismos requieren azufre para su crecimiento y otras actividades biológicas. El azufre generalmente está en la estructura de algunos cofactores de enzimas (tales como Coenzima A, tiamina y biotina), aminoácidos y proteínas (cisteína, metionina, y puentes disulfuro). Algunos microorganismos pueden consumir el azufre en compuestos tiofénicos tales como el dibenzotiofeno y así reducir el contenido de este en el combustible [4]. Como se mencionó previamente, la hidrodesulfurización puede ser usada para desulfurizar combustibles pesados, pero no lleva a una significativa disminución en el peso molecular. Una combinación de tecnologías es necesaria para dirigir tanto la remoción de heteroátomos y la disminución en el peso molecular para mitigar los problemas ambientales y obtener el mejor producto [6]. La combinación de la hidrodesulfurización y la biodesulfurización puede reducir el contenido de azufre en el diesel de 3358 a <20 µg g<sup>-1</sup> [5]. El primer microorganismo que mostró ser capaz de romper selectivamente los enlaces carbono-azufre en los combustibles crudos, carbón y en un amplio rango de componentes modelo, resultando en una remoción selectiva de azufre y la retención del carbón y valor calorífico, fue *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 (ATCC 53968) [6].



Además de la opción de desulfurización microbiana, la desulfurización enzimática representa una alternativa promisorio para los procesos biotecnológicos aplicados a la industria del petróleo. El uso de microorganismos requiere el mantenimiento de la maquinaria celular completa para regenerar los cofactores y llevar a cabo la desulfurización. Además los microorganismos requieren una fase acuosa para lograr la remoción del azufre, mientras que las enzimas son capaces de funcionar en medios con bajo contenido de agua. Cierta cantidad de agua unida a la proteína es esencial para permitir suficiente flexibilidad de la molécula para ejecutar la catálisis [7].

Existen ventajas y desventajas entre los dos tipos de desulfurización biológica, las cuales se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 1 Características de proceso de la desulfurización enzimática y metabólica [7]

<b>Desulfurización enzimática</b>	<b>Desulfurización metabólica</b>
Actividad en sistemas de bajo contenido de agua	Actividad en fase acuosa
Actividad a altas temperaturas mayores a 100°C	Inactivación a altas temperaturas
Actividad en sistemas tóxicos	Sensible a tóxicos
Actividad solo sobre compuestos organoazufrados	Necesita fuente de carbono
Tiempo de vida depende de la estabilidad de la molécula	Sistema catalítico autogenerado

Es importante tener en cuenta que aunque la eliminación de azufre no es alcanzada en un solo paso enzimático, la transformación mediada por la enzima de componentes que contienen azufre puede facilitar su remoción [7]. En el estudio de Ayala et al. (1998) se evaluó la actividad de la enzima CPO (Cloroperoxidasa) del hongo *Caldariomyces fumago* en diesel primario, en donde se demostró que la mayoría de los compuestos organoazufrados presentes en el combustible fueron significativamente oxidados aumentando considerablemente los puntos de ebullición de los mismos (Ilustración 1)[8].

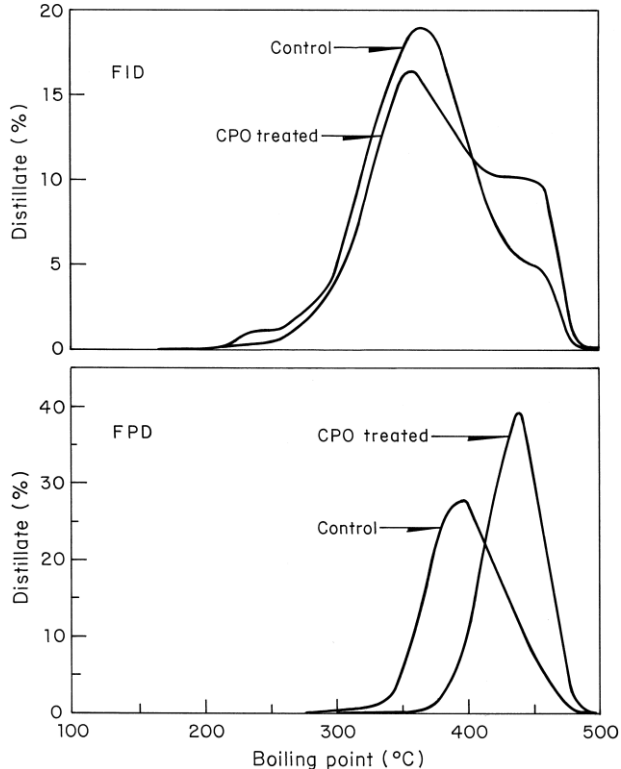


Ilustración 1. Perfiles de microdestilación de diesel primario no tratado y enzimáticamente tratado. FID Flame ionization detector (detector general). FPD Flame photometric detector (detector selectivo para azufre) CPO (Cloroperoxidasa) [8]

El proceso de desulfurización enzimática presenta varias ventajas sobre la desulfurización metabólica, lo que lo hace una alternativa interesante para complementar las metodologías tradicionales. Es por esto que la evaluación de diferentes enzimas para tal propósito ha cobrado importancia dentro del área de la biotecnología.

## 1.2 BIOCATALISIS EN SOLVENTES ORGANICOS

El agua es una de las moléculas más importantes para la vida; sólo en presencia del agua puede existir la vida. Todas las moléculas orgánicas necesarias para la vida son producidas por la actividad catalítica de las enzimas en presencia de agua. Las enzimas son catalizadores altamente específicos que funcionan típicamente en reacciones bajo

condiciones suaves. Esto también puede ser considerado como una desventaja, ya que muchos compuestos comercialmente importantes son insolubles y/o inestables en agua. Esos compuestos orgánicos deben ser sintetizados en solventes orgánicos. Es por esto que cuando un sustrato es insoluble en agua, lo mejor es llevar a cabo la reacción en presencia de un solvente orgánico, ya que la tasa de reacción se aumenta cuando el sustrato se ha solubilizado. Sin embargo, hay que tener en cuenta que las enzimas como todas las proteínas, mantienen su estructura conformacional a través de interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas. En medio acuoso, los dominios hidrofílicos entran en contacto con el agua, mientras que los dominios hidrofóbicos se pliegan hacia el interior de la molécula. Es por esto que cuando se agrega un solvente orgánico y se reduce la polaridad del medio que rodea a la enzima, los dominios hidrofóbicos pueden tender a dispersarse, resultando en un desplegado de la molécula [9].

La biocatálisis en sistemas no acuosos ha experimentado un desarrollo importante durante la última década, y numerosas reacciones han sido introducidas y optimizadas para aplicaciones sintéticas. En contraste a la enzimología en medio acuoso, las biotransformaciones en solventes orgánicos ofrecen ventajas industrialmente atractivas, tales como cambios drásticos en la enantioselectividad de la reacción, la reversión del equilibrio termodinámico de las reacciones de hidrólisis, y resistencia a la contaminación bacteriana [10].

Una aplicación potencial de la catálisis bioquímica es la que se puede dar en los procesos de refinación de la industria del petróleo. Los procesos biotecnológicos pueden ser considerados tanto como una tecnología alternativa o complementaria a las tecnologías de refinación convencionales [1].

### **1.3 PEROXIDASAS EN LA TRANSFORMACION DE COMPUESTOS ORGANOAZUFRADOS**

Como se mencionó anteriormente, el petróleo contiene niveles significantes de sulfuros orgánicos y compuestos tiofénicos y el contenido de azufre varía en un intervalo de 0.2 a 6% en peso dependiendo del depósito [1]. En general, el uso de combustibles fósiles para energía y materia prima durante el último siglo ha sido el origen de la contaminación

ambiental y dichos contaminantes son considerados como un riesgo potencial para la salud debido a sus posibles actividades carcinogénicas y mutagénicas [11]. La demanda de combustibles fósiles bajos en azufre se ha intensificado debido al aumento de los estándares regulatorios para reducir los niveles de óxidos de azufre en las emisiones atmosféricas. La disponibilidad de crudos con esta característica, a su vez, se ha dificultado debido al agotamiento de fuentes de fácil acceso a combustibles crudos convencionales y ligeros, y por el alto costo de los procesos fisicoquímicos de hidrodesulfurización [8].

Como se mencionó previamente, el uso de microorganismos para la biodesulfurización ha sido propuesto como una alternativa para la reducción del contenido de organosulfurados de los combustibles fósiles. Se han reportado diferentes cepas de microorganismos aeróbicos capaces de remover no selectivamente sulfuros por una ruta degradativa de naftaleno, tales como *Pseudomonas sp.* y *Arthrobacter sp.* Por otro lado, la remoción selectiva de sulfuros ha sido reportada por una ruta que involucra la conversión de dibenzotiofeno (DBT) a 2-hidroxifenil (2-HBP) y sulfato. La cepa más estudiada en este aspecto ha sido *Rhodococcus* IGTS8. Finalmente, *Desulfovibrio desulfuricans* M6 es el mejor organismo encontrado en la desulfurización anaeróbica [6].

Sin embargo, como también se mencionó, la desulfurización microbiana tiene dos problemas principales, por un lado requiere una fase acuosa para llevar a cabo su actividad y por otro lado la biocatálisis microbiana debe tener una amplia especificidad por sustrato debido a los varios componentes organosulfurados presentes en el petróleo. De acuerdo a esto, una alternativa sería el uso de enzimas en vez del microorganismo completo [8].

Existen una serie de enzimas que han mostrado la habilidad de oxidar tiofenos y compuestos organosulfurados *in vitro*: citocromos P450, ligninoperoxidasas, lactoperoxidasas, CPO y la HRP. Además, algunas hemoproteínas no enzimáticas son capaces de realizar la oxidación de DBT, tales como la hemoglobina, citocromo c y microperoxidasa [8].

Estudios recientes han indicado que la CPO, una hemoproteína glicosilada secretada por el hongo *Caldariomyces fumago*, es capaz de desulfurar el Diesel [12]. Desde el descubrimiento de esta enzima a principios de los 60s, varias facetas de su actividad

catalítica se han dilucidado. Después de la activación del centro férrico hemo por un hidroperóxido, la CPO puede llevar a cabo una amplia variedad de reacciones oxidativas, que incluyen actividades peroxidasa, catalasa, halogenasa y cierto tipo de actividad monooxigenasa [13].

Existen otras como la peroxidasa de rábano blanco (HRP) que pertenece a la clase III de las peroxidases de las plantas. Sus características comunes incluyen Fe(III) protoporfirina IX como grupo prostético, residuos catalíticos conservados, un solo triptófano (Trp 117), 4 puentes disulfuro, 2 sitios de unión a calcio localizados de manera distal y proximal al hemo y 8 glicanos. La HRP-C es la peroxidasa más ampliamente estudiada, tiene muchas aplicaciones biotecnológicas, debido a su alta estabilidad y actividad. Las peroxidases han sido, además, el objeto de numerosos estudios, incluyendo el diagnóstico clínico y la bioremediación [14].

De acuerdo a esto, estas enzimas son blanco de evaluación para biocatálisis en solventes orgánicos, es por esto que en este trabajo se busca evaluar su comportamiento en medios orgánicos.

Para el presente trabajo se escogieron las proteínas cloroperoxidasa, peroxidasa de rábano blanco y citocromo con el fin de diseñar y caracterizar biocatalizadores que puedan funcionar en medios orgánicos. Se inmovilizaron o se conjugaron las enzimas y se evaluó su actividad catalítica en solventes orgánicos.

### **1.3.1. Cloroperoxidasa**

La cloroperoxidasa de *C. fumago* (CPO) es una hemo glicoenzima extracelular de 42 kDa que contiene ferriprotoporfirina IX como grupo prostético. CPO exhibe un amplio espectro de reactividades químicas; incluso se piensa que *in vivo* funciona principalmente como una cloroenzima dependiente de peróxido, además tiene actividad peroxidasa, catalasa y reacciones tipo citocromo P450 de deshidrogenación [7]. La capacidad de CPO de realizar esas diversas reacciones la hacen una de las más versátiles de todas las hemoproteínas conocidas. Estructuralmente, CPO es única pero comparte características tanto con las peroxidases como con las enzimas citocromo P450. CPO es reactiva a pH bajo, con un pH óptimo de 2.8 [15]. Esta enzima ha mostrado ser más activa que otras peroxidases, incluyendo la lignino peroxidasa de *P. chrysosporium*, en la oxidación de hidrocarburos aromáticos policíclicos [8].



Ilustración 2. Estructura de la cloroperoxidasa del hongo *C. fumago*. Fuente: Protein Data Bank, 1-CPO

### 1.3.2. Peroxidasa de rábano blanco

La HRP es una importante enzima que contiene un grupo hemo y que ha sido estudiada por más de un siglo. Esta enzima pertenece a la clase III (“clásicas” plantas secretoras de peroxidases) de la superfamilia de peroxidases de plantas, la cual incluye peroxidases originarias de bacterias, hongos y plantas. La isoenzima C comprende un solo polipéptido de 308 residuos de aminoácidos, contiene dos diferentes tipos de centros metálicos, hierro (III) protoporfirina (IX) (usualmente referida como el “grupo hemo”) y dos átomos de calcio. Ambos son esenciales para la integridad estructural y funcional de la enzima [16]. La HRP ha sido estudiada para el desarrollo de aplicaciones prácticas en la síntesis de productos naturales y síntesis química fina, diagnóstico clínico y biorremediación. Estudios realizados previamente han utilizado a la HRP para la oxigenación de organosulfidos [17, 18].

Los avances que se dieron entre los periodos de 1920 a 1945 permitieron demostrar la presencia del hemo y los carbohidratos como componentes de la HRP. El énfasis en las importantes contribuciones que la investigación ha hecho sobre esta peroxidasa ha permitido el entendimiento de las enzimas peroxidases en general [16].

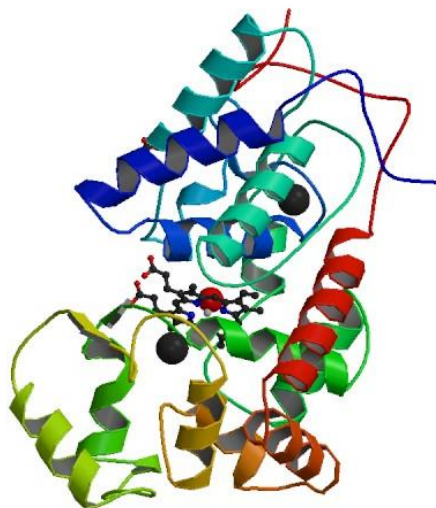


Ilustración 3. Estructura de la Peroxidasa de rábano blanco. Fuente: Protein Data Bank, 1HCH

### 1.3.3. Citocromo c

Los Citocromos c son parte de los sistemas de transporte de electrones que conservan la energía. En sistemas vivos la actividad no catalítica de Citocromo c ha sido descrita. La habilidad de esta proteína para actuar como un catalizador *in vitro* ha sido revisada. A este respecto se ha reportado la peroxidación de lípidos, el rompimiento de hidroperóxido, la hidroxilación de 4-nitrofenol y la oxidación de ácido butírico 2-ceto-4-tiometil en presencia de peróxido de hidrogeno. La actividad peroxidasa de citocromo c ha sido además demostrada por la oxidación de varios donadores de electrones incluyendo ABTS (2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazoline-6-acido sulfónico) y 4-amino-antipirina. Además, al igual que las reacciones oxidativas de Citocromo P450 tales como N- y O-demetilaciones, S-oxidaciones y epoxidación de oleofinas, también son catalizadas por la proteína Citocromo c, libre e inmovilizada en la presencia de peróxido de hidrogeno u otros hidroperóxidos orgánicos [7]. Como con el Citocromo P450, el Citocromo c ha sido usado como biocatalizador en la oxidación de tiofenos y organosulfidos para formar sulfoxidos. Los sustratos aromáticos del Citocromo c interaccionan con el grupo hemo como ligando y no como un sustrato [19]. El Citocromo c presenta varias ventajas para su uso como un biocatalizador: el grupo prostético hemo está covalentemente unido a la proteína; esta propiedad puede ser importante para la catálisis en presencia de solventes orgánicos, ya que el Citocromo c no pierde su grupo hemo catalítico en esos sistemas, mientras que las

peroxidasas sí. El Citocromo c es activo sobre un amplio rango de pH. La oxidación dibenzotiofeno es realizada de pH 2 a pH 11. Es también capaz de realizar reacciones biocatalíticas a altas temperaturas como 120°C, con una actividad máxima a 80°C. Finalmente, el Citocromo c no es costoso. El costo y la estabilidad son los dos factores principales para la biocatálisis a gran escala [19].

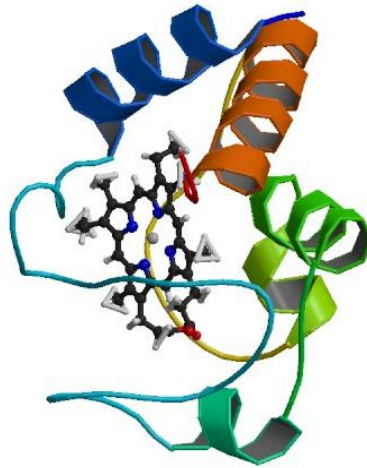


Ilustración 4. Estructura de la Peroxidasa de rábano blanco. Fuente: Protein Data Bank, 1LC1

#### 1.4. INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

Por casi 50 años, numerosos esfuerzos han sido dedicados al desarrollo de enzimas inmovilizadas insolubles para varias aplicaciones. Las enzimas inmovilizadas tienen varios beneficios sobre sus equivalentes solubles; primero, la reutilización de biocatalizadores heterogéneos, reducción del costo de la producción por el reciclaje eficiente y el control de los procesos [14].

Comparado con las enzimas libres, las enzimas inmovilizadas son más robustas y más resistentes a los cambios ambientales. Estas pueden ser inmovilizadas por una variedad de métodos, los cuales pueden ser en general clasificados como físicos, donde las



interacciones débiles entre el soporte y la enzima existen, y los químicos, donde los enlaces covalentes son formados con la enzima [20].

Las enzimas inmovilizadas han sido usadas ampliamente para síntesis y bioanálisis, incluso a nivel industrial. Es importante tener en cuenta que a pesar de que su uso es bastante popular, presenta ciertas desventajas, entre ellas una disminución en la actividad biológica debida a dos factores:

a. El procedimiento de unión:

En principio la absorción e inmovilización por bioafinidad, suelen ser procedimientos más suaves, pero en el acoplamiento químico, la enzima puede estar sujeta a fuertes condiciones de reacción y de pH extremo. El acoplamiento químico lleva a modificaciones en los residuos de la superficie de la enzima, lo que puede provocar cambios conformacionales, contribuyendo a una disminución en la actividad de la enzima [21].

b. Limitación de transferencia de masas

Disminución de la disponibilidad de moléculas de enzima dentro de los poros del soporte. Y por otro lado, algún posible impedimento estérico por parte del soporte, incluso si la molécula de la enzima está sobre la superficie del soporte, lo que lleva a una lenta difusión del sustrato [21].

#### **1.4.1. Tipos de soportes para inmovilización de enzimas**

Las propiedades de las enzimas inmovilizadas son gobernadas por las propiedades tanto de la enzima como del material de soporte.

La interacción entre las dos conlleva a unas propiedades fisicoquímicas y cinéticas específicas que pueden ser decisivas para su aplicación práctica. Es por esto que la elección del soporte es decisiva para el perfil operacional de la enzima inmovilizada. Se sabe que no hay un soporte universal para todas las enzimas, sin embargo, se debe tener un número deseable de características comunes útiles a todas las enzimas para ser considerado como un candidato para la inmovilización [20]. Existe una gran variedad de materiales que poseen distintas propiedades que le pueden conferir al biocatalizador

diferentes características, entre los cuales se encuentran polímeros sintéticos orgánicos, biopolímeros o sólidos inorgánicos.

#### **1.4.2. Polímeros sintéticos**

Las resinas acrílicas tales como el Eupergit C son ampliamente usadas como soportes. El Eupergit C es un copolímero macroporoso de N,N'-metileno-bi-(metacrilamida), glicidil metacrilato, alil glicidil éter y metacrilamida con un promedio de tamaño de 170  $\mu\text{m}$  y un diámetro de poro de 25 nm. Este compuesto es altamente hidrofílico y estable química y mecánicamente sobre un rango de pH de 0 a 14. Este une proteínas mediante la reacción de sus motivos oxiranos, a pH neutral o alcalino, con los grupos amino libres de la enzima para formar enlaces covalentes [22].

#### **1.4.3. Polímeros naturales**

Una variedad de biopolímeros, principalmente polisacáridos insolubles en agua tales como la celulosa, el almidón, la agarosa, el quitosano y proteínas tales como gelatina y albúmina han sido ampliamente usadas como soportes para inmovilizar enzimas [22].

De la amplia variedad de soportes para inmovilización, orgánicos e inorgánicos, naturales o sintéticos, la quitina y en especial el quitosano son de interés ya que ofrecen muchas ventajas tales como alta afinidad a proteínas, disponibilidad de grupos reactivos funcionales para dirigir reacciones con enzimas y para modificaciones químicas, hidrofiliidad, estabilidad mecánica y rigidez, fácil preparación en diferentes configuraciones geométricas que le proveen al sistema permeabilidad y un área superficial adecuada para la biotransformación [20]. La quitina es el principal constituyente de las conchas de los crustáceos, el exoesqueleto de los insectos y las paredes celulares de hongos, donde ésta provee rigidez y estabilidad, y se estima que es sintetizada y degradada en la biosfera en una enorme cantidad de al menos  $10 \times 10^9$  toneladas cada año. Químicamente, la quitina está compuesta de unidades 2-acetamido-2-deoxi- $\beta$ -D-glucosa (o N-acetil-D-glucosamina) unidas por enlaces  $\beta$  (1-4) formando así una cadena larga de polímeros lineales. El quitosano es el principal derivado de la quitina, es obtenido por N-deacetilación en distinta medida, por ende este es un copolímero de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina. Este compuesto es insoluble en agua a pH neutro, pero la presencia de grupos amino lo hace soluble en soluciones ácidas por debajo de un pH 6.5 [20]. A pH básico los grupos amino del quitosano llegan a

estar desprotonados y el polímero es insoluble en medio acuoso, formando un gel o precipitado [23]. Es por esto que el quitosano puede ser definido como una quitina suficientemente deacetilada para formar sales de aminos solubles, es decir que el grado de deacetilación necesario para obtener un producto soluble está entre un 80% y 85% o más alto [20]. El quitosano puede ser modificado al interactuar con otros biopolímeros, tales como gelatina, alginato y carragenina (un hidrocoloide extraído de algas marinas rojas). Estas interacciones pueden formar geles híbridos, ya que el alginato, la gelatina y la carragenina tienen grupos que son cargados negativamente a pH neutral y pueden interactuar con los grupos amino cargados positivamente del quitosano, formando así una red interna diferente [23]. El quitosano está clasificado como un polímero inteligente, debido a la propiedad que tiene de responder al estímulo del pH, es decir de solubilizarse en pH ácido y precipitarse en pH por encima de 7. En un estudio previo se reportó la conjugación de la lacasa de *Corioloropsis gallica* con quitosano, y este conjugado presentó un comportamiento de respuesta al pH. El conjugado fue soluble a un pH de máxima actividad de la lacasa. Además, la conjugación de la enzima con el quitosano la estabilizó a pH extremos, tanto pH ácidos como a pH básicos [24].

#### **1.4.4. Soportes activados con grupos epóxidos para inmovilizar enzimas**

Los soportes activados con grupos epóxidos son casi ideales para realizar la inmovilización de las proteínas y enzimas a escala tanto de laboratorio como industrial[25].

Estos soportes activados son capaces de formar enlaces covalentes muy estables con diferentes grupos de las proteínas (aminos, tioles, fenólicos). Hay reportes de procedimientos de inmovilización sin efectos negativos sobre la estabilidad de algunas enzimas. Sin embargo, generalmente es aceptado que la estabilización debería ser alcanzada si la inmovilización de cada molécula de enzima ocurre a través de varios residuos, principalmente si los grupos reactivos en el soporte están apartados de su superficie a través brazos espaciadores cortos. De esta manera, todos los residuos de la molécula de enzimas involucradas en la inmovilización tienen que preservar sus posiciones relativas casi completamente sin afectarse durante algún cambio conformacional promovido por calor, solventes orgánicos o cualquier otro agente distorsionante [25]. Pero también se considera que la unión de las proteínas por muchos

residuos de aminoácidos al soporte puede generar una inactivación de la misma por deformación de su estructura.

#### 1.4.5. Modelo propuesto de inmovilización “Sistema tricomponente”

Para el desarrollo de este trabajo proponemos el diseño de un sistema tricomponente compuesto por un soporte hidrofóbico, una proteína con actividad peroxidasa y un compuesto hidrofílico que le aporte al sistema un ambiente hidratado.

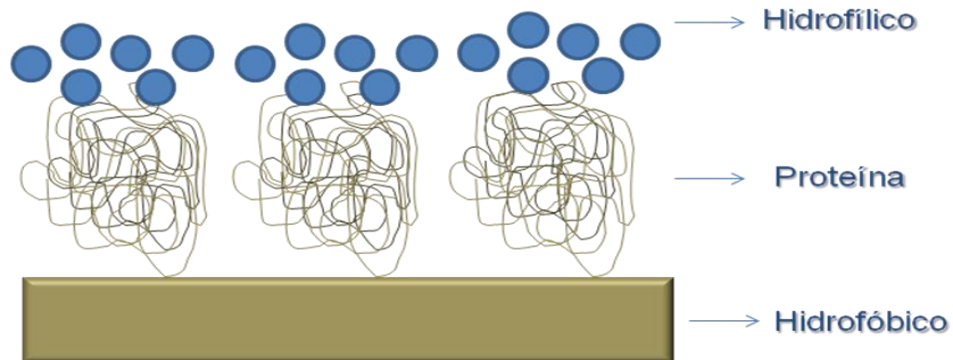


Ilustración 5. Modelo sistema tricomponente

## **2. HIPOTESIS**

Mediante el diseño y preparación de un sistema tricomponente, en donde la enzima se encuentre inmovilizada en un soporte hidrofóbico y recubierta por un polímero hidrofílico, se podrá mantener la enzima catalíticamente activa en sistemas de solventes orgánicos.

## **3. OBJETIVOS**

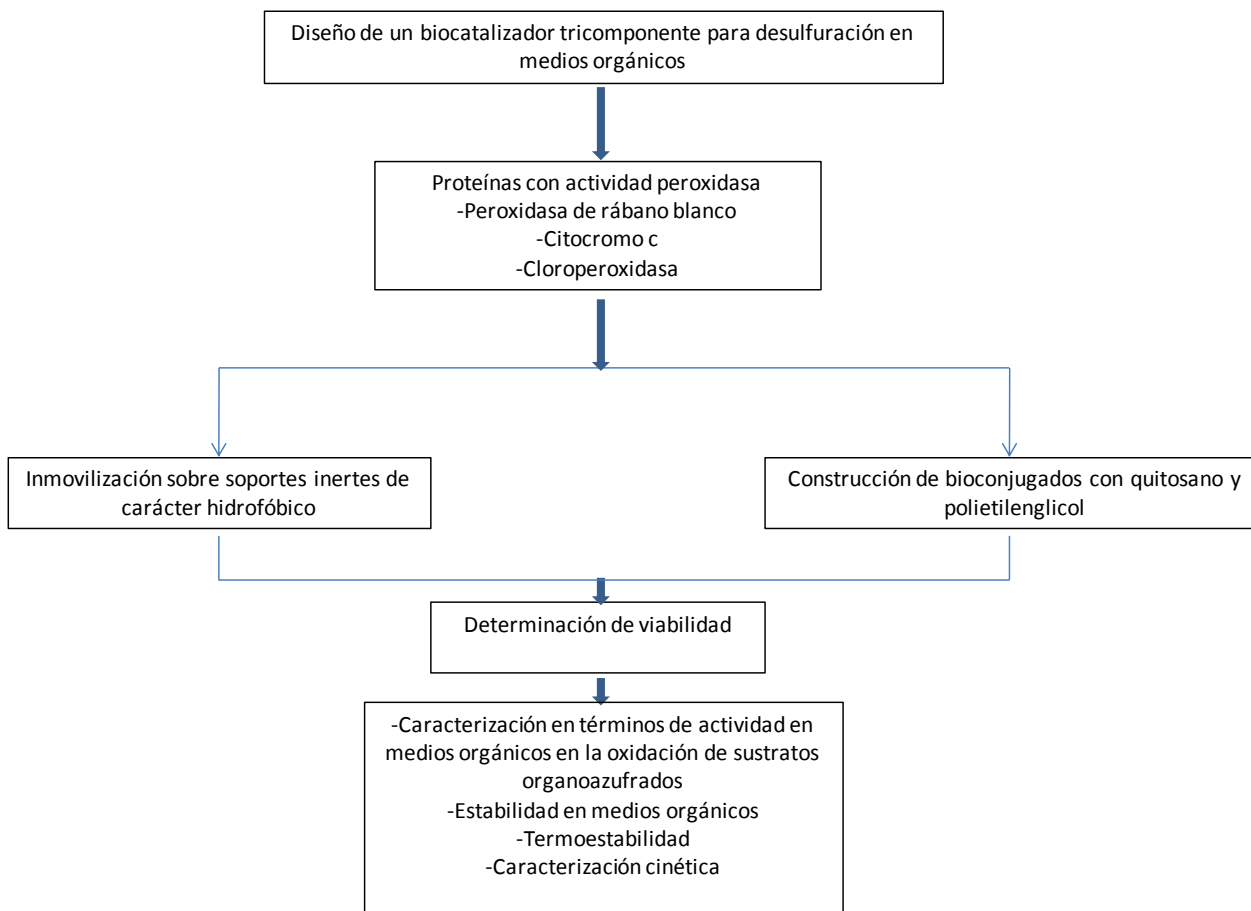
### **3.1. Objetivo general**

Diseñar y caracterizar biocatalizadores para la oxidación de compuestos organoazufrados en medios orgánicos.

### **3.2. Objetivos específicos**

- Diseñar tres biocatalizadores, constituidos por un soporte hidrofóbico, una proteína con actividad peroxidasa y un biopolímero hidrofílico.
- Caracterizar los biocatalizadores en términos de actividad y estabilidad en solventes orgánicos.
- Estudiar el desempeño del mejor de los biocatalizadores en la oxidación de compuestos organoazufrados en solventes orgánicos.

#### 4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



La estrategia experimental está basada en la construcción de biocatalizadores tricomponente, es decir una proteína inmovilizada sobre un soporte hidrofóbico y recubierta por un polímero hidrofílico que le permita mantenerse catalíticamente activa en presencia de solventes orgánicos. Para ello se planteó el uso de un material plástico inerte de carácter hidrofóbico sobre el cual se inmovilizaran covalentemente las proteínas. Alternamente como parte de la estrategia experimental se construirán bioconjugados basados en quitosano los cuales consisten de la unión covalente del quitosano, un polímero hidrofílico a la enzima. Adicionalmente, el uso de polietilenglicol en los bioconjugados previamente elaborados con quitosano es con la idea de mantener el objetivo de tener un biocatalizador tricomponente que presente características tanta

hidrofílicas como hidrofóbicas, y partiendo del carácter anfifílico del polietilenglicol se cumple con este objetivo, Una vez construidos los biocatalizadores se evaluarán en términos de actividad en solución acuosa, y posteriormente su actividad en solventes orgánicos usando un sustrato modelo azufrado. También se determinará su estabilidad en términos de temperatura y su estabilidad en presencia de solventes orgánicos. Finalmente se determinará los parámetros cinéticos del biocatalizador.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Reactivos y enzimas

La cloroperoxidasa usada en estos experimentos proviene de la cepa UAMH 11925 del hongo *C. fumago* de "The University of Alberta Microfungus Collection and Herbarium". Fue purificada de acuerdo a la metodología reportada [26] hasta un  $R_z$  de 1.34. La HRP utilizada para los ensayos (tipo X), así como el Citocromo c de corazón de caballo fueron obtenidos de SIGMA-ALDRICH.

Los reactivos monoclorodimedona, guaiacol, cloruro de pinacianol, peróxido de hidrogeno, hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, 1,6- hexandiamina, solución de glutaraldehido al 50%, MES (2[N-Morfolino] ácido etanosulfónico), Polímero poli(etileno-co-metil acrilato-co-glicidil metacrilato) y quitosano fueron obtenidos de SIGMA-ALDRICH. El fosfato de sodio dibásico, fosfato de sodio monobásico y acetato de sodio trihidratado fueron adquiridos de J.T. BAKER. El ácido acético glacial fue obtenido de MALLINCKRODT y el Diclorometano de FERMONT. Membranas de nylon de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  y 25 mm de diámetro fueron obtenidas de WHATMAN.

### 5.2. Equipos

En los experimentos donde se midió la absorbancia se usaron los espectrofotómetros Beckman modelo DU-650 y Perkin Elmer Precisely Lambda 25 UV/VIS. Las cromatografías de permeación en gel se llevaron a cabo, ya sea en un sistema de cromatografía atmosférica EconoSystem de Bio-Rad® utilizando una columna de Sephacryl-200 de 40 mL, y un flujo de 1 mL/min, o en un sistema de HPLC Waters Corporation (MA USA) utilizando dos columnas de permeación en gel conectadas en serie Ultrahydrogel linear (7.8 x300 mm) y Ultrahydrogel 500 (7.8 X 300 mm) con un índice de exclusión de 0.5-10000 KDa. El eluyente usado fue nitrato de sodio 0.1M pH 5.0 y el flujo de 0.8 mL/min; la temperatura del sistema fue de 35°C y los detectores utilizados fueron: Detector Shodex Differential refractometer y Detector UV Waters (190-300 nm). La cromatografía en fase reversa se llevó a cabo en un sistema de HPLC, y se usó una columna Hypersil C<sub>18</sub> ODS 5  $\mu\text{m}$  2.1 x 100 mm; las condiciones usadas fueron de 0.5 mL/min a una longitud de onda de 255 nm.



Los lavados y concentración de las enzimas se llevaron a cabo en una celda de ultrafiltración (Amicon, Inc) utilizando membranas con un tamaño de poro 10,000 Da, 30,000 Da y 50,000 Da.

### **5.3. Construcción de soportes activados con grupos epóxidos.**

La construcción de las láminas de polímero se hizo solubilizando las perlas de Poli (etileno-co-metil acrilato-co-glicidil metacrilato) en diclorometano. Se pesaron cantidades de aproximadamente 0,8 gramos de polímero y se mezclaron con 10 mL de diclorometano. Se utilizaron frascos de vidrio de 15 mL y se dejaron en agitación suave durante toda la noche, para permitir una disolución completa y homogénea. Una vez solubilizado el material se dispuso en una caja de petri de vidrio para la formación de una capa delgada de polímero y se dejó secar por 24 horas, finalmente se cortaron láminas de 1 cm<sup>2</sup>.

### **5.4. Inmovilización directa sobre soportes activados con grupos epóxidos [Poli (etileno-co-metil acrilato-co-glicidil metacrilato)].**

En un frasco de vidrio de 4 mL con tapa se colocó una lámina de polímero y se le agregó 1 mL de solución de enzima 10 µM, buffer fosfato de potasio 60 mM, pH 6.0. La reacción se llevó a cabo durante toda la noche en agitación suave en refrigeración (cuarto frío). Pasado el tiempo de incubación se hicieron lavados de la lámina con 4 mL de buffer de fosfatos [27, 28]. Antes de la inmovilización se midió concentración de la proteína inicial, y luego de la inmovilización se midió concentración a la solución de enzima residual y a los lavados para así determinar la cantidad de enzima inmovilizada.

### **5.5. Inmovilización con hexandiamina mediante carbodiimida sobre soportes activados con grupos epóxidos.**

En un frasco de vidrio con tapa de 4 mL se colocó una lámina de polímero y se le agregó 2 mL de hexandiamina al 10%, esta reacción se dejó por 24 horas en agitación suave a temperatura ambiente [29]. Pasado el tiempo se lavó con buffer MES pH 5.0. Posteriormente se preparó un 1mL de solución de cada una de las proteínas en buffer MES pH 5.0 a una concentración de 10 µM y que contenía 8 mg de EDC (carbodiimida).

Esta preparación se colocó en el frasco con la lámina previamente activada con hexandiamina, y se dejó reaccionar por 5 horas a temperatura ambiente en agitación suave. Finalmente se hicieron lavados con buffer de fosfatos. Antes de la inmovilización se midió la concentración de la proteína inicial, y luego de la inmovilización se midió concentración a la solución de enzima residual y a los lavados para así determinar la cantidad de enzima inmovilizada.

#### **5.6. Inmovilización sobre membranas de Nylon mediada por glutaraldehído.**

En vasos de precipitado de 10 mL se incubaron las membranas de Nylon (membranas con un poro de 0.45  $\mu\text{m}$  y 25 mm de diámetro Whatman) con 2 mL de HCl 2.9 M por 2 horas a 37°C. Pasado el tiempo de incubación, cada membrana se lavó profundamente con agua destilada y luego con buffer de fosfato 60 mM, pH 6.0. Posteriormente, se puso la lámina de Nylon en 2 mL de glutaraldehído al 2.5% preparado en buffer de fosfatos pH 8.0 a 20°C por 15 minutos. Se hicieron lavados con agua destilada y buffer de fosfatos, pH 8.0. Seguido a esto se incubó la lámina con 2 mL de solución de enzima HRP 10  $\mu\text{M}$  a 4°C durante toda la noche en agitación suave. Se hicieron lavados con buffer de fosfatos 60 mM, pH 6.0, y se recogieron para medir concentración de proteína posteriormente. Una vez activada la lámina con la enzima se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente en 12 mL de  $\text{NaBH}_4$  0.1 M preparado en buffer de fosfatos 60 mM, pH 6.0. Finalmente se lavó la lámina de Nylon exhaustivamente con agua destilada, luego NaCl 1.0 M preparado en buffer de fosfatos 60 mM, pH 6.0 que contenía 0.5% v/v de Triton x-100. Esta reacción se dejó 24 horas a 4°C y en agitación suave. Pasado este tiempo se lavó con agua destilada y buffer de fosfatos 60 mM, pH 6.0 [30].

#### **5.7. Determinación de cantidad de enzima o proteína inmovilizada.**

Para determinar la concentración de proteína en cada una de la inmovilizaciones, se empleó el método de Bradford con una curva estándar de albumina de suero bovino (BSA). Se preparó la muestra de proteína en 800  $\mu\text{L}$  de buffer de fosfatos 60 mM, pH 6.0 y se añadieron 200  $\mu\text{L}$  del reactivo de BIO-RAD®. Después de una incubación de 5 minutos se leyó la absorbancia a 595 nm. También se midió concentración de acuerdo a la absorbancia de la banda SORET, 400 nm para la CPO, 409 para la Citocromo c y 403

para la HRP. Se utilizaron los siguientes coeficientes de extinción molar para cada una de las proteínas;  $\epsilon=75.3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a 403 nm para la CPO [31],  $\epsilon=106.1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a 410 nm para el citocromo c [32] y  $\epsilon=105 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a 403 nm para la HRP [33].

### **5.8. Determinación de actividad enzimática de los biocatalizadores.**

Para la CPO se usaron las siguientes condiciones: La mezcla de reacción comprendía 3500  $\mu\text{L}$  de buffer de acetatos 60 mM, pH 3.0, 400  $\mu\text{L}$  de KCl 200 mM, 80  $\mu\text{L}$  de monoclorodimedona 5 mM y 20  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogeno 200 mM. La reacción se llevó a cabo colocando el biocatalizador en un vial de vidrio de 4 mL, con la mezcla anteriormente mencionada. La reacción se inició con la adición del peróxido, se determinó la desaparición de la monoclorodimedona midiendo la absorbancia a 278 nm, cada minuto, tomando temporalmente 1 mL de la reacción, la mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante.

Para la citocromo c se usaron las siguientes condiciones: 3500  $\mu\text{L}$  de buffer de fosfatos 60 mM, pH 6.0, acetonitrilo 360  $\mu\text{L}$ , cloruro de pinacianol 40  $\mu\text{L}$  y 20  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogeno 200 mM. Se midió la desaparición del cloruro de pinacianol midiendo la absorbancia a 603 nm. El procedimiento de medición fue igual al mencionado para la CPO.

Para la HRP se llevó a cabo la siguiente mezcla: 3855  $\mu\text{L}$  de buffer de fosfatos 60 mM, pH 6.0, 124  $\mu\text{L}$  de guaiacol 160 mM y 20  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrógeno 200 mM. Se midió la aparición de producto a una longitud de onda de 470 nm. El procedimiento de medición fue igual al mencionado para la CPO.

### **5.9. Modificación química de la cloroperoxidasa con quitosano mediada por etilencarbodiimida.**

La reacción de modificación con quitosano se realizó empleando la relación de excesos molares de 1000 para quitosano, 500 para carbodiimida y 1 para la enzima. En la reacción se colocaron 45 nmoles de CPO (106  $\mu\text{L}$  de una concentración de  $4.25 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) y se adicionaron 22430 nmoles de carbodiimida (0.0043 gramos) y 44981 nmoles de quitosano (0.8 gramos de una solución de quitosano al 1% pH 5.0). La reacción se dejó

en agitación suave durante 4 horas a temperatura ambiente y posteriormente se hicieron 3 lavados en el Amicon con una membrana de 50,000 Da con buffer de fosfatos 60 mM, pH 5.0 [24]. También se realizó una preparación de conjugación pero previamente se lavó y concentró la enzima con buffer MES. La concentración inicial de la enzima para esta conjugación fue de  $4.67 \times 10^{-5}$  M, y se le adicionó 23  $\mu$ moles de ECD y 5 mmoles de una solución de quitosano al 1% pH 5.0. La reacción se dejó en agitación suave durante 4 horas a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de reacción se realizaron dos lavados con buffer de fosfatos 60 mM, pH 5.0 en una celda de ultrafiltración (Amicon) con una membrana de 50,000 Da.

#### **5.10. Modificación química con quitosano mediada por etilencarbodiimida de Peroxidasa de rábano blanco.**

La reacción de modificación con quitosano se realizó en un volumen de 1 mL de enzima, utilizando la misma relación de excesos molares mencionada anteriormente en la modificación de la CPO. La proteína fue previamente lavada y concentrada con buffer MES. La concentración inicial de la proteína fue de  $9.36 \times 10^{-5}$  M, a la cual se adicionó 47  $\mu$ moles de ECD y 9.3 mmoles de una solución de quitosano al 1% pH 5.0. La reacción se dejó en agitación constante durante 4 horas a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de reacción se realizaron dos lavados con buffer de fosfatos 60 mM, pH 6.0, en una celda de ultrafiltración (Amicon) con una membrana de 50,000 Da.

#### **5.11. Modificación química del citocromo c de corazón de caballo con quitosano mediada por etilencarbodiimida.**

La reacción de modificación se llevó a cabo en un volumen de 1 mL de enzima, utilizando la misma relación de excesos molares mencionados previamente. La proteína fue inicialmente lavada y concentrada con buffer MES. La concentración inicial de la proteína fue de  $1.40 \times 10^{-4}$  M, a la cual se adicionó 70  $\mu$ moles de ECD y 14 mmoles de una solución de quitosano al 1% pH 5.0. La reacción se dejó en agitación constante durante 4 horas a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de reacción se realizaron dos lavados

con buffer fosfato 60 mM, pH 6.0 en una celda de ultrafiltración (Amicon) con una membrana de 30,000 Da.

#### **5.12. Modificación química del conjugado con quitosano con polietilén glicol activado con aldehído.**

La modificación del conjugado se llevó a cabo mediante la adición de polietilén glicol activado con aldehído (PEG-CHO) al conjugado con quitosano. Esta reacción se llevó a cabo para las tres proteínas previamente conjugadas, CPO, HRP y citocromo c de corazón de caballo.

##### **5.12.1. Modificación del conjugado CPO-quitosano (cloroperoxidasa) con polietilén glicol activado con aldehído.**

Para llevar a cabo la modificación, se puso un exceso molar de 1000 de PEG-CHO teniendo en cuenta que la relación sería de 1 molécula de PEG por cada residuo de glucosamina del quitosano. De esta manera se puso 154  $\mu$ moles de PEG-CHO con 65% de pureza a 1 mL de conjugado, y se adicionó 100  $\mu$ moles de  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ . Las reacciones se llevaron a cabo a pH 5.0 o a pH 7.0, y se dejó durante 2 horas en agitación constante. Posteriormente se hicieron 3 lavados en una celda de ultrafiltración con una membrana de 50,000 Da.

##### **5.12.2. Modificación del conjugado HRP-quitosano (Peroxidasa de rábano blanco) con polietilén glicol activado con aldehído.**

Teniendo en cuenta que el pH inicial era de 6.0, y el volumen de reacción era de 1 mL, se colocó 47  $\mu$ L de NaOH 1M para llevar la reacción a pH 8.0. Se adicionó 72  $\mu$ moles de PEG-CHO con 65% de pureza y 47  $\mu$ moles de  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ . La reacción se llevó a cabo por dos horas y posteriormente se hicieron lavados con Buffer fosfato pH 6.0 60 mM en una celda de ultrafiltración (Amicon) con una membrana de 50,000 Da.

##### **5.12.3. Modificación del conjugado Citocromo c-quitosano con polietilén glicol activado con aldehído.**

Partiendo de un pH inicial de 6.0 y un volumen inicial de 1.7 mL, se adicionó 80  $\mu$ L de NaOH 1M para llevar la reacción a pH 8.0. Se usaron 108  $\mu$ moles de PEG-CHO con 65% de pureza y 70  $\mu$ moles de  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ . La reacción se llevó a cabo por dos horas y

posteriormente se hicieron lavados con buffer fosfato 60 mM pH 6.0 en una celda de ultrafiltración (Amicon) con una membrana de 30,000 Da.

#### **5.12.4. Modificación del conjugado cloroperoxidasa-quitosano con polietilen glicol activado con cloruro cianúrico.**

Partiendo de una preparación de CPO-Q a pH 5.0, se ajustó el pH a 6.0 con buffer fosfatos de potasio pH 6.0. Posteriormente se adicionó 45  $\mu$ moles de PEG activado con cloruro cianúrico. La reacción se llevó a cabo por dos horas en agitación y a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de reacción se hicieron lavados con buffer fosfato pH 5.0 60 mM en una celda de ultrafiltración (Amicon) con una membrana de 50,000 Da.

#### **5.13. Determinación de actividad enzimática antes y después de modificación química de proteínas.**

**Cloroperoxidasa:** Se midió la actividad halogenasa espectrofotométricamente utilizando como sustrato 5 mM de monoclorodimedona en buffer acetatos 60 mM pH 3.0 y KCl 200 mM. La reacción se inició con la adición de 1 mM de  $H_2O_2$ . La actividad se estimó espectroscópicamente a una longitud de onda de 278 nm y  $\epsilon = 12.2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [34]. Se determinó la actividad específica, la cual está definida como los  $\mu$ moles de sustrato transformados por  $\mu$ moles de enzima en un minuto bajo las condiciones de reacción descritas anteriormente.

**Peroxidasa de rábano blanco:** Se midió la actividad peroxidasa espectrofotométricamente utilizando como sustrato 160 mM Guaiacol en buffer fosfatos 60mM pH 6.0. La reacción se inició con la adición de 1 mM de  $H_2O_2$ . La actividad se estimó espectroscópicamente a una longitud de onda de 470 nm y  $\epsilon = 26.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [35]. Se determinó la actividad específica, la cual está definida como los  $\mu$ moles de sustrato transformados por  $\mu$ moles de enzima en un minuto bajo las condiciones de reacción descritas anteriormente.

**Citocromo c:** Se midió la actividad peroxidasa espectrofotométricamente utilizando como sustrato cloruro de pinacianol, en buffer fosfatos 60mM pH 6.0. La reacción se inició con la adición de 1 mM de  $H_2O_2$ . La actividad se estimó espectroscópicamente a una longitud de onda de 278 nm y  $\epsilon = 82.35 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [36]. Se determinó la actividad específica, la cual

está definida como los  $\mu$ moles de sustrato transformados por  $\mu$ moles de enzima en un minuto bajo las condiciones de reacción descritas anteriormente.

#### 5.14. Ensayos en soluciones ternarias con solventes orgánicos.

Se probaron diferentes mezclas de solventes, y en diferentes proporciones de cada uno, para evaluar la estabilidad de la microemulsión y posteriormente la actividad de las proteínas en las mismas. Los componentes de las mezclas fueron los siguientes.

Sistema	Hexano	Isopropanol	Buffer
1	15.8%	65.3%	18.9%
6	46.0%	47.7%	6.3%

Fuente:[37]

Sistema	Diclorometano	Metanol	Buffer
1	65%	35%	5%

Fuente:[38]

El sustrato usado para evaluar la actividad de los conjugados fue tiantreno, el cual fue preparado en cada una de las mezclas en los solventes diclorometano y hexano, a una concentración que llevara a una absorbancia de 1 UA en el espectrofotómetro.

**Cloroperoxidasa:** Se usó una mezcla de reacción que contenía 30  $\mu$ M de tiantreno en hexano, isopropanol y buffer citrato 100 mM pH 2.8 con 6.7 mM de KCl. Se adicionó la enzima en sus diferentes formas para cada uno de los ensayos, CPO sin modificar, CPO-quitosano y CPO-quitosano-PEGcloruro cianúrico y se dió inicio a la reacción con la adición de peróxido de hidrógeno a una concentración final de 1 mM. Las proporciones de hexano-isopropanol y buffer se encuentran en la tabla anteriormente referenciada [37]

Cuando se usó la mezcla de diclorometano-metanol- buffer, la reacción contenía 30  $\mu$ M de tiantreno, buffer de acetatos 60 mM pH 3.0 y 20 mM de KCl. Se adicionó la enzima en

sus diferentes formas para cada uno de los ensayos, y se dió inicio a la reacción con la adición de peróxido de hidrogeno 1 mM.

**Citocromo c:** Se usó una mezcla de reacción que contenía 30  $\mu\text{M}$  de tiantreno en hexano, isopropanol y buffer de fosfatos 10 mM pH 6.1. Se adicionó la enzima en sus diferentes formas para cada uno de los ensayos, Citocromo sin modificar, Citocromo-quitosano y Citocromo-quitosano-PEGaldehído y se dio inicio a la reacción con la adición de peróxido de hidrógeno 1 mM. Las proporciones de hexano-isopropanol-buffer se encuentran en tabla anterior [37].

Para la mezcla de diclorometano-metanol-buffer, la reacción contenía 30  $\mu\text{M}$  de tiantreno, buffer fosfatos 60 mM pH 6.1. Se adicionó la enzima en sus diferentes formas para cada uno de los ensayos, y se dió inicio a la reacción con la adición de peróxido de hidrógeno 1 mM.

#### **5.15. Determinación de la estabilidad en sistemas ternarios (Hexano-Isopropanol-Agua).**

Se determinó la estabilidad en sistemas ternarios de la enzima CPO libre, CPO-Quitosano y CPO-Q-PEG. Se evaluaron dos sistemas ternarios con las siguientes proporciones: Sistema (1) 15.8% de hexano, 65.3% de isopropanol, 18.9% de agua y Sistema (6) 46.6% de hexano, 47.7% de isopropanol, 6.3% de agua. Cada una de las enzimas fue incubada en estos medios y se midió su actividad inicial y residual cada 5 minutos durante 1 hora y 30 minutos. En el sistema 1 la CPO libre ( $4.25 \times 10^{-4}$  M) se diluyó 1000 veces en el medio de incubación, la CPO-Q ( $7.79 \times 10^{-6}$  M) fue diluida 10 veces al igual que la CPO-Q-PEG ( $3.93 \times 10^{-6}$  M). Todos los medios de incubación tuvieron un volumen final de 1 mL. Para medir la actividad halogenasa residual se fue tomando 2  $\mu\text{L}$  cada 5 minutos de la CPO libre, 2  $\mu\text{L}$  de la CPO-Q y de 2  $\mu\text{L}$  a 6  $\mu\text{L}$  de la CPO-Q-PEG.

En el Sistema 6, la CPO libre quedó en una dilución final de 1:1000 en 1 mL de mezcla ternaria (hexano-isopropanol-agua), y de allí se fueron tomando volúmenes desde 2  $\mu\text{L}$  hasta 20  $\mu\text{L}$  para medir su actividad con monoclorodimedona. Para la CPO-Q se hizo una dilución 1:20 en el medio de incubación (hexano-isopropanol-agua) y de allí se fueron tomando volúmenes desde 5  $\mu\text{L}$  hasta 50  $\mu\text{L}$  para medir su actividad con monoclorodimedona durante 1 hora y 30 minutos. Para la CPO-Q-PEG se hizo una



dilución 1:20 a 1 mL de medio de incubación y de allí se fueron tomando volúmenes desde 10  $\mu$ L hasta 40  $\mu$ L para medir su actividad halogenasa residual. Cabe anotar que para las diluciones de las enzimas se tuvo en cuenta usar un volumen de las mismas que no excediera la proporción de agua de la mezcla de incubación para asegurar la estabilidad de la misma. , con los datos obtenidos se hizo una gráfica de las actividades específicas contra el tiempo y se ajustó a una curva de decaimiento de primer orden y se determinó el tiempo de vida media y la constante de inactivación.

#### **5.16. Determinación de la termoestabilidad de la CPO libre y conjugada con quitosano a 60°C.**

Para determinar la termoestabilidad de las enzimas cada una fue incubada en buffer fosfato 60 mM pH 5.0 a 60°C, en donde la CPO libre quedó a una dilución final de 1:1000 y la CPO-Q quedó a una dilución final de 1:10 al igual que la CPO-Q-PEG. Se midió la actividad inicial con monoclorodimedona y actividad residual cada 10 minutos durante 1 hora con cada una de las enzimas, tomando volúmenes de 2  $\mu$ L a 20  $\mu$ L. Finalmente con los datos obtenidos se hizo una gráfica de las actividades específicas contra el tiempo y se ajustó a una curva de decaimiento y se determinó el tiempo de vida media y la constante de inactivación.

#### **5.17. Determinación del coeficiente de extinción molar para el tiantreno en los sistemas ternarios basados en hexano.**

Para realizar el cálculo de la actividad específica de la enzima en la oxidación del tiantreno en los sistemas ternarios, se determinó el coeficiente de extinción molar para el tiantreno en los sistemas con proporciones diferentes de hexano, isopropanol y agua. Para esto se usó distintas concentraciones de tiantreno partiendo de un stock de 0.6 mM de tiantreno. Se construyó la gráfica de concentración de tiantreno vs la absorbancia a 254 nm y se determinó la pendiente.

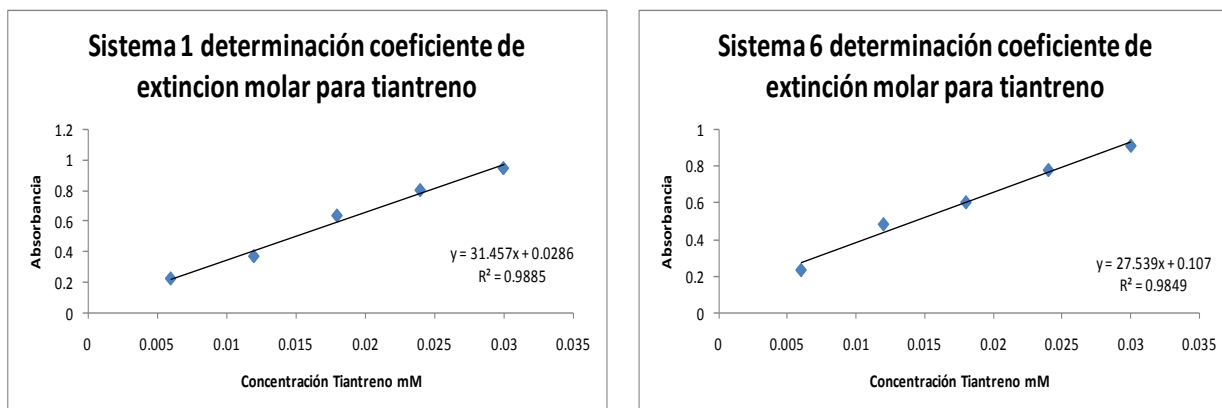


Ilustración 6. Determinación de coeficientes de extinción molar para tiantreno en el sistema 1 y 6.

### 5.18. Cromatografía en fase reversa.

La transformación del tiantreno por la HRP se monitorea mediante una cromatografía en fase reversa. La reacción se llevó a cabo en buffer fosfatos pH 6.0, 20% de acetonitrilo y 1 mM  $H_2O_2$ . El sustrato fue preparado en acetonitrilo a una concentración de 13 mM. Después de 1 hr de reacción, la mezcla fue inyectada al HPLC. La columna usada fue una Hypersil ODS 5  $\mu$ m 2.1 x 100 mm. El eluyente usado fue 50% acetonitrilo/50% agua y las condiciones de la cromatografía fueron las siguientes: flujo 0.5 mL/min y una longitud de onda para la detección de 255 nm.

### 5.19. Gel de poliacrilamida.

Las preparaciones enzimáticas fueron analizadas sobre un gel de acrilamida al 12%. Se cargaron 10  $\mu$ g de proteína CPO libre, CPO conjugada con quitosano a través de carbodiimida y un control de CPO con quitosano sin carbodiimida. Además se corrió el quitosano solo.

### 5.20. Determinación del tamaño de los bioconjugados.

Para la determinación del tamaño de los bioconjugados, se utilizó la tecnología de Dynamic Light Scattering (DLS) la cual es una técnica no invasiva para medir el tamaño

de moléculas y partículas típicamente en la región submicrónica. DLS proporciona el diámetro hidrodinámico de la partícula, y se refiere a como una partícula difunde dentro de un líquido. El diámetro obtenido por esta técnica es el de una esfera que tiene el mismo coeficiente de difusión traslacional de la partícula que se está midiendo. El principio de la técnica se base en el movimiento browniano de las partículas en suspensión. Si las partículas o moléculas son iluminadas con un laser, la intensidad de la luz dispersada fluctúa a una velocidad dependiente del tamaño de la partícula; las partículas más pequeñas se mueven más rápido. Los análisis de esas fluctuaciones de la intensidad nos da la velocidad del movimiento browniano y por lo tanto el tamaño de la partícula usando la relación Stokes-Einstein[39].

En este estudio se usó un equipo de dispersión dinámica de luz Zetasizer nano-ZS (Malver Instrument Ltda. UK) el cual tiene un láser de 633 nm de longitud de onda. El equipo se mantuvo a temperatura constante (25 °C) durante las mediciones con un equilibrio de 5 minutos. Las muestras fueron analizadas en una celda de cuarzo con un paso óptico de 3mm (N° de Cat. ZEN2112, Malver Instruments Ltd, U.K). El software usado por el equipo para los análisis fue Zetasizer software 6.01.

Para llevar a cabo la medición, se tomaron 50 µL de cada una de las preparaciones de enzima, CPO, CPO-Q Y CPO-Q-PEG, todas fueron ajustadas a una misma concentración de proteína ( $7.66 \times 10^{-4}$  µmoles).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Inmovilización directa sobre soportes activados con grupos epóxidos (Poli(etileno-co-metil acrilato-co-glicidil metacrilato)), e inmovilización sobre membranas de Nylon parcialmente hidrolizadas de la enzima peroxidasa de rábano blanco.

Con el propósito de diseñar un biocatalizador que cumpla con las características de tener un soporte hidrófobo al cual se acopla la enzima, se hizo la evaluación de la enzima HRP inmovilizándola directamente sobre un polímero hidrófobo Poli(etileno-co-metilacrilato-co-glicidil metacrilato) activado con grupos epóxidos. Para el ensayo donde se hizo la inmovilización directamente sobre el polímero (PEMGM) se usó una cantidad de 328  $\mu\text{g}$  y 352  $\mu\text{g}$  de enzima para el primer triplicado y para el segundo, respectivamente. Después del proceso de inmovilización se obtuvo una carga enzimática de entre 34  $\mu\text{g}$  de enzima inmovilizada por 1  $\text{cm}^2$  de soporte, como se muestra en la Tabla 2. La actividad específica para este biocatalizador fue en promedio de 6  $\text{min}^{-1}$ , lo que representa una actividad muy baja comparada con la actividad de la enzima soluble la cual es de 32000  $\text{min}^{-1}$ . Es decir la pérdida de actividad de la enzima inmovilizada fue del 99% con respecto a la enzima soluble.

Teniendo en cuenta otras alternativas, se hizo la evaluación de otro soporte, en este caso membranas de Nylon con un poro de 0.45  $\mu\text{m}$  y 25 mm de diámetro, en donde se hizo una hidrólisis parcial del material para generar grupos amino libres los cuales se usaron para acoplar la proteína por medio de glutaraldehído. Esta evaluación se realizó con la enzima HRP, y se usaron los residuos aminos de la misma para llevar a cabo la inmovilización. Se usaron 704  $\mu\text{g}$  de enzima, y como se muestra en la Tabla 2, la cantidad de enzima inmovilizada fue en promedio de 16  $\mu\text{g}$  de proteína por  $\text{cm}^2$ .

La actividad específica de este biocatalizador fue de 5  $\text{min}^{-1}$ . Al igual que el anterior biocatalizador la pérdida de actividad fue del 99% con respecto a la enzima soluble.

Tabla 2 Inmovilización de la peroxidasa de rábano blanco

Soporte de inmovilización	Microgramos de proteína por soporte	Actividad específica
Polímero (inmovilización directa)	$34 \pm 22 \mu\text{g}/\text{cm}^2$	$6 \pm 5 \text{ min}^{-1}$
Nylon (inmovilización con glutaraldehído)	$16 \pm 4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$	$5 \pm 2 \text{ min}^{-1}$

Según los datos obtenidos no existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la cantidad de enzima inmovilizada por soporte debido a la variabilidad en las muestras ( $P = 0.309$ ) en las dos metodologías de inmovilización. De igual forma no hay diferencia significativa en cuanto a la actividad enzimática ( $P = 0.792$ ), sin embargo es evidente una inactivación de la proteína.

El ensayo de inmovilización sobre membranas de Nylon se hizo basado en un protocolo evaluado en un estudio previo [30]. En ese estudio se logró inmovilizar la enzima  $\beta$ -glucosidasa y tripsina usando como brazo espaciador la polietilenoimina (PEI) y quitosano. El Nylon, parcialmente hidrolizado, fue previamente tratado con glutaraldehído. Los autores lograron obtener un aumento útil de la actividad de la enzima inmovilizada mediante brazos espaciadores comparado con la omisión del espaciador. El aumento fue del 47% cuando se usó quitosano y un 82% cuando se usó PEI [30]. En este estudio, después de activar con glutaraldehído, se incubó la lámina con la enzima, y se inmovilizó mediante los residuos amino de la misma, sin embargo se obtuvo una pérdida de la actividad considerable.

## 6.2. Inmovilización directa sobre soportes activados con grupos epóxidos (poli(etileno-co-metil acrilato-co-glicidil metacrilato)) de las enzimas cloroperoxidasa, citocromo c y peroxidasa de rábano blanco.

CPO, citocromo c y HRP fueron inmovilizadas de forma directa (sin espaciador) sobre láminas de (poli(etileno-co-metil acrilato-co-glicidil metacrilato)). Para estos ensayos se prepararon biocatalizadores por triplicado por cada una de las proteínas. Para cada una de las proteínas se usó la siguiente cantidad: para cloroperoxidasa 302  $\mu\text{g}$ , para citocromo c 269  $\mu\text{g}$  y para HRP 648  $\mu\text{g}$ . En la Tabla 3, se muestran las cantidades de proteína inmovilizada por  $\text{cm}^2$ . Estadísticamente no hay diferencias significativas entre las cantidades de proteína inmovilizada directamente sobre el polímero ( $P = 0.081$ ), a pesar de que las proteínas son diferentes entre sí.

Tabla 3 Inmovilización directa de tres peroxidasa sobre polímero

Inmovilización directa sobre Polímero	
Enzima	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de proteína inmovilizada
Cloroperoxidasa	$37 \pm 23$
Citocromo c	$59 \pm 9.6$
Peroxidasa de rábano blanco	$69 \pm 2.3$

El procedimiento de inmovilización directa usando soportes activados con grupos epóxidos se ha reportado como casi ideales para realizar inmovilizaciones de manera sencilla, ya que se han caracterizado por ser estables, fácilmente manipulables durante el procedimiento, además de formar enlaces covalentes con diferentes grupos de las proteínas, entre los cuales están los amino, tioles y fenólicos. Además, estas reacciones se pueden llevar a cabo bajo condiciones suaves [25].

De esta forma la reactividad de una proteína dada, en términos de su habilidad para ser químicamente modificada, será determinada por su composición de aminoácidos y en

este caso, las lisinas usualmente están localizadas sobre la superficie de la proteína, y usualmente son abundantes y buenos nucleófilos, por ello son comúnmente usadas para la inmovilización. En términos generales no hay diferencias significativas entre la CPO, la HRP y el Citocromo c en cuanto a la carga proteica sobre el soporte. Es importante mencionar que para esta inmovilización directa se usaron los residuos aminos de las proteínas, los cuales son solo 3 en la CPO, 6 en la HRP y 21 en el citocromo c, sin embargo la reactividad de estos grupos, es decir su nucleofilicidad puede disminuir debido a la protonación. Es por esto que se requiere de pH alto para asegurar la desprotonación de una población de residuos. El pKa de las lisinas está entre 10.0 -10.2, por lo tanto para asegurar una mejor reactividad se deben usar un pH de reacción alrededor del pKa. En este estudio el pH de la reacción que se usó fue de 6, el cual pudo no ser suficiente para garantizar la desprotonación de la mayoría de los aminos, disminuyéndose así la probabilidad de inmovilización, pero la razón de intentar a este pH, era asegurar la estabilidad de la enzima, puesto que las tres proteínas a pH por encima de 7 sufren una inactivación.

En estudios previos sobre inmovilización de la CPO sobre sílica gel derivatizada con grupos epóxidos se ha obtenido porcentajes de inmovilización del 43% y la cantidad de enzima inmovilizada ha sido de 2.7 mg de CPO/g de sílica gel [40]. Lo importante es mencionar que, para nuestros fines, es más importante que la proteína conserve su actividad que la carga de proteína en el soporte.

### **6.3. Inmovilización sobre soportes de (poli(etileno-co-metil acrilato-co-glicidil metacrilato)) activados con grupos epóxidos con hexandiamina mediada por N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida, clorhidrato de las enzimas cloroperoxidasa, citocromo c y peroxidasa de rábano blanco.**

En estudios previos se ha demostrado que el uso de moléculas espaciadoras puede reducir los efectos ambientales locales debido a los grupos del soporte y el impedimento estérico, es decir que la molécula proteica puede obtener mayor flexibilidad y disminuir su deformación debido a los efectos de la inmovilización. El uso de PEI (polietilenoimina) y glutaraldehído, llevó a proporciones más altas de  $\beta$ -glucosidasa inmovilizada, esto también se confirmó con la inmovilización de la tripsina en donde se obtuvo un 82% de enzima unida activa comparada con la que se inmovilizó sin espaciadores [30]. En

nuestro ensayo se usó hexandiamina como molécula espaciadora, es decir que el soporte fue aminado, al darse la reacción entre los grupos epóxidos y uno de los extremos amino de la hexandiamina. Estas aminas primarias no pueden reaccionar directamente con los grupos funcionales de la enzima, es por esto que se usa la química de la carbodiimida.

En presencia de una amina, la carbodiimida promueve la formación de un enlace amida en dos pasos. En la reacción inicial, la carbodiimida reacciona con un grupo carboxilo para formar un intermediario O-acil-urea. La reacción subsecuente del intermediario con una amina produce la correspondiente amida [41]. Con proteínas el pH óptimo de esta reacción es cerca de 5.

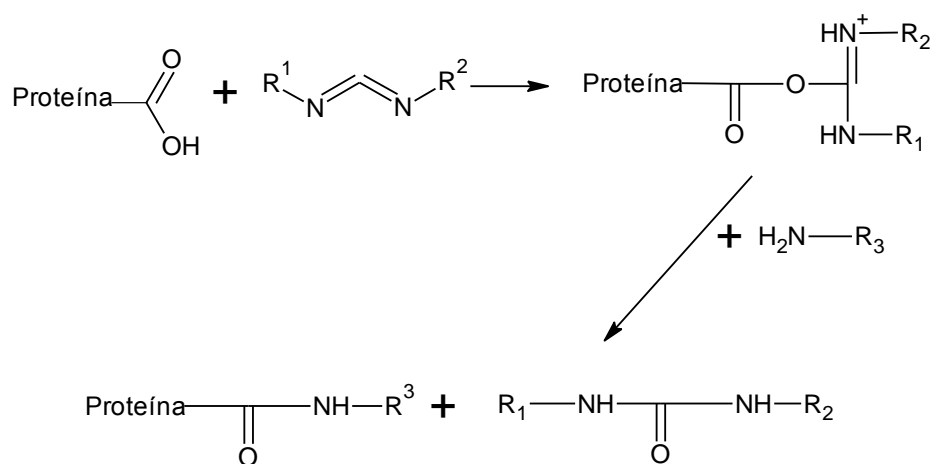


Ilustración 7. Mecanismo de reacción de la carbodiimida con grupos carboxilo de las proteínas

De esta forma se obtuvo la formación del enlace tipo amida entre el extremo amina de la hexandiamina y los grupos carboxilo de la enzima. En la Tabla 4 se presentan los datos de los  $\mu\text{g}$  de enzima inmovilizada en este experimento. Las cantidades de proteína inicial usada fueron las siguientes: 406  $\mu\text{g}$  de CPO, 117  $\mu\text{g}$  de citocromo c y 390  $\mu\text{g}$  de HRP.



Tabla 4 Inmovilización de tres peroxidasa sobre polímero usando hexandiamina

Inmovilización sobre Polímero usando hexandiamina	
Enzima	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de proteína inmovilizada
Cloroperoxidasa	48 $\pm$ 36
Citocromo c	55 $\pm$ 12
Peroxidasa de rábano blanco	37 $\pm$ 2

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las tres proteínas inmovilizadas ( $P = 0.634$ ) en cuanto a la carga proteica obtenida en el biocatalizador.

En los datos obtenidos hasta ahora hay una gran variabilidad con la CPO en ambos tipos de inmovilización. Llama la atención de que a pesar de que en esta última inmovilización a través de moléculas espaciadoras se usaron residuos carboxilo, en donde la CPO cuenta con 24 residuos y no se logra obtener un aumento significativo de la carga proteica. El citocromo c tiene aproximadamente 24 residuos carboxilos, y tampoco presenta un cambio significativo. Sin embargo si se encuentra una diferencia estadísticamente significativa con la HRP ( $P = <0.001$ ) indicando una mayor carga proteica en la inmovilización directa comparada con la inmovilización usando una molecula espaciadora en donde la carga es menor. Cabe resaltar que en ambos casos los residuos de inmovilización son diferentes, en la directa es por aminos donde la HRP cuenta con 6 y en la segunda se hace por medio de los carboxilos donde la proteína cuenta con 15 residuos aproximadamente.

#### 6.4. Evaluación de la actividad enzimática de los biocatalizadores

Por otro lado para determinar la actividad de los biocatalizadores construidos se midió la actividad enzimática de los mismos bajo condiciones estándar, y se calculó la actividad específica de cada uno. Las (Tablas 5, 6 y 7) presentan los resultados de actividad específica para cada uno de los biocatalizadores construidos tanto por inmovilización directa como a través de moléculas espaciadoras. En estas tablas se recopila la cantidad de  $\mu\text{g}$  de proteína inmovilizada.

Tabla 5 Inmovilización de cloroperoxidasa

CLOROPEROXIDASA		
Soporte de inmovilización	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de proteína inmovilizada	Actividad específica
Polímero (Inmovilización directa)	$37 \pm 23$	$3 \pm 0.4 \text{ min}^{-1}$
Polímero (Inmovilización con hexandiamina)	$48 \pm 35$	$61 \pm 76 \text{ min}^{-1}$

Para el caso de la CPO, como se había mencionado anteriormente no existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la carga proteica en ambos mecanismos de inmovilización. Sin embargo, el comportamiento general de los biocatalizadores es que una gran proporción de moléculas inmovilizadas son inactivas. Además no existe una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la actividad presentada en ambas metodologías de inmovilización ( $P = 0.260$ ) La pérdida de actividad en ambos tipos de biocatalizadores es del 99% comparada con la enzima soluble.

Tabla 6 Inmovilización de citocromo c

CITOCROMO C		
Soporte de inmovilización	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de proteína inmovilizada	Actividad específica
Polímero (Inmovilización directa)	$59 \pm 10$	$0.085 \text{ min}^{-1}$
Polímero (Inmovilización con hexandiamina)	$55 \pm 12$	$0.054 \text{ min}^{-1}$

Los datos presentados en la Tabla 6, nos muestran el comportamiento del biocatalizador citocromo c. Al igual que en el caso anterior no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la carga proteica obtenida en ambos biocatalizadores ( $P = 0.632$ ) Por otro lado, hay una inactivación notable de la proteína. El porcentaje de inactivación de la enzima inmovilizada por ambos métodos comparada con la proteína soluble fue también del 99%.

En el caso de la HRP, se determinó una diferencia estadísticamente significativa entre las dos metodologías de inmovilización en cuanto a la carga proteica, lo cual ya se había mencionado. Sin embargo, como en los casos anteriores, hay una inactivación de las moléculas enzimáticas adheridas al soporte del 99% comparado con la enzima soluble.

Tabla 7 Inmovilización de la peroxidasa de rábano blanco

PEROXIDASA DE RABANO BLANCO		
Soporte de Inmovilización	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de proteína inmovilizada	Actividad específica
Polímero (Inmovilización directa)	$69 \pm 2$	$7 \pm 6 \text{ min}^{-1}$
Polímero (Inmovilización con hexandiamina)	$37 \pm 2$	$2 \pm 0.2 \text{ min}^{-1}$

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, claramente se presenta una inactivación de la enzima después de ser inmovilizada sobre poli(etileno-co-metil acrilato-co-glicidil metacrilato), y es un fenómeno común para las tres diferentes proteínas. Pueden existir diferentes razones para la disminución de la actividad de la enzima una vez se ha inmovilizado; entre ellas y quizás una de las principales razones es que solo una parte de las moléculas de enzimas está orientada propiamente con su sitio activo expuesto al solvente para que la reacción ocurra. Además, durante el proceso de inmovilización se pudo haber cambiado la conformación de algunas moléculas a una forma inactiva [40].

Se han realizado estudios para el mejor entendimiento entre las relaciones que se establecen entre las características de la superficie de inmovilización y la actividad de la enzima inmovilizada. En un estudio particular de la lipasa CALB se mostró que las diferentes orientaciones de la enzima, cuando se inmovilizó sobre superficies tanto hidrofóbicas como hidrofílicas, lleva a una distribución heterogénea de las moléculas de enzima que inevitablemente producirán variaciones en la actividad de la misma [42]. De esta forma con los resultados obtenidos en la inmovilización sobre poli(etileno-co-metil acrilato-co-glicidil metacrilato) es necesario explorar otras alternativas para mantener las proteínas activas. Cabe anotar que todas las caracterizaciones de la actividad enzimáticas de los biocatalizadores fueron medidos en medios acuosos con sustratos ampliamente usados para cada una de estas enzimas. Debido a la gran pérdida de actividad, no se exploró su comportamiento en solventes orgánicos. Sin embargo, podría ser una alternativa el estudiarlos en un medio orgánico, esperando que la inmovilización en soportes hidrofóbicos mejore su actividad en dichos medios.

#### **6.5. Modificación con quitosano de las tres proteínas; cloroperoxidasa, peroxidasa de rábano blanco y citocromo c**

Usando la química de la carbodiimida, se realizó la conjugación de la enzima con quitosano (biopolímero hidrofílico) y posteriormente se caracterizó la actividad enzimática del bioconjugado catalítico. Como se mencionó en los antecedentes, el quitosano se ha usado ampliamente en la inmovilización de enzimas, debido a su contenido de grupos amino. Además es soluble a pH ácido debido a que estos grupos amino se encuentran protonados. A pH básico estos grupos llegan a desprotonarse y el polímero se vuelve insoluble [23]. Aprovechando estas características se conjugaron las proteínas HRP, citocromo c y CPO. La conjugación con el quitosano se basa en la modificación de las proteínas a través de los residuos carboxilos, los cuales mediante la química de la carbodiimida pueden formar una unión covalente con los residuos amino del quitosano [43].

#### **6.6. Modificación del conjugado con quitosano a través de polietilenglicol aldehído de las tres proteínas; cloroperoxidasa, peroxidasa de rábano blanco y citocromo c**

Los procedimientos de modificación se hicieron de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. Una vez realizada la conjugación entre quitosano y proteína, se procedió a

hacer una modificación posterior con polietilén glicol aldehído (PEGaldehído), en donde el grupo funcional del PEG activado (aldehído), reacciona con el grupo amino del quitosano. El grado cualitativo de modificación de las proteínas se evaluó mediante cromatografía de permeación en gel (datos no mostrados) pero no se obtuvieron datos concluyentes. A continuación se describen las características de los conjugados.

#### **6.6.1. Conjugación de la Peroxidasa de rábano blanco con quitosano**

El proceso de conjugación de la enzima HRP con quitosano a pH 5.0 mantuvo un 42% de la actividad inicial (Ilustración 10). En la tabla 8 se presenta la cantidad de proteína unida covalentemente al quitosano, y de acuerdo a esto un 81% de la proteína inicial se encuentra conjugada con el quitosano. Para evaluar su actividad peroxidasa se utilizó como sustrato el guaiacol. Los resultados mostraron que se pierde más del 50% de la misma. Siendo las condiciones de conjugación con quitosano suaves (pH 5.0), no puede considerarse que el pH de la reacción contribuya a la pérdida de actividad, ya que se ha reportado que la enzima es estable en un rango de pH de 5.0 a 9.0 [44]. Sin embargo, como en todos los procesos de inmovilización y/o modificación química de las proteínas, se puede dar la inactivación de cierta población de las mismas, ya sea por obstrucción del sitio activo o modificación en la estructura [40].

#### **6.6.2. Conjugación de la Peroxidasa de rábano blanco – quitosano con Polietilenglicol**

Cuando se hace la modificación con PEGaldehído a pH 8.0 de la peroxidasa de rábano blanco, se conserva un 16% de la actividad inicial (Ilustración 8).

Se ha reportado que a pH 8.0 la peroxidasa de rabano blanco es estable [44] y además se favorece la reacción de pegilación [45]. Sin embargo, de acuerdo a los resultados hay una pérdida del 84% de actividad, lo que sugiere que las condiciones de reacción no son muy favorables para esta proteína.

La HRP cuenta con aproximadamente 18 residuos carboxilos para reaccionar con los aminos libres del quitosano, por lo tanto del 85% de estos aminos del quitosano, el 15% aproximadamente se podría estar modificando. De esta forma quedaría libre un 70% de aminos del quitosano para ser modificados con el PEGaldehído. Mediante la absorbancia

de la banda Soret se calculó la cantidad de de proteína obtenidos al final del procedimiento de modificación (Tabla 8).

Tabla 8 Modificación de la peroxidasa de rábano blanco

Preparación	mg totales de proteína en la preparación
HRP	3.63
HRP-Q pH 5.0	2.94
HRP-Q-PEG pH 8.0	0.79

Después de la modificación con PEGaldehído, el bioconjugado HRP-Q-PEG mostró una pérdida de actividad del 84% (Ilustración 8).

Esto nos sugiere que las condiciones que se usaron para modificar esta proteína no son adecuadas, ya que no se logra conservar la actividad de la enzima nativa o por lo menos que no disminuya a tal proporción.

Se realizó una cromatografía de permeación en gel, la cual no evidenció la modificación realizada ni con quitosano ni con PEGaldehído. Estos resultados no son concluyentes (datos no mostrados) por lo tanto se considera que la metodología de detección no es totalmente adecuada o se requiere implementar otros procesos para evidenciar las modificaciones.

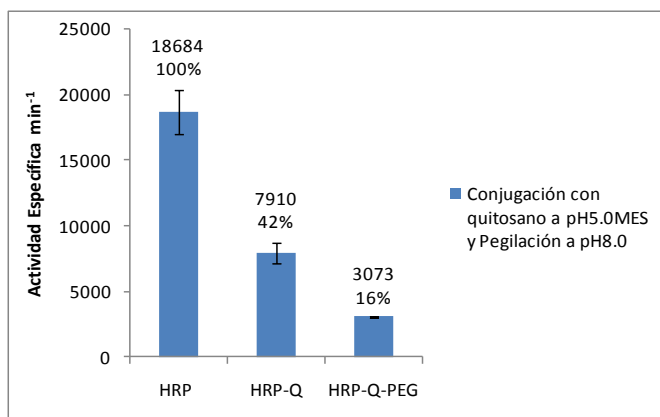


Ilustración 8. Porcentaje de actividad de los conjugados enzimáticos de la Peroxidasa de Rábano Blanco

### **6.6.3. Conjugación del Citocromo c de corazón de caballo con quitosano**

Se determinó la concentración de proteína en las preparaciones mediante absorbancia de la banda Soret, encontrándose que aproximadamente el 100% de la proteína se unió covalentemente con quitosano. Como todas las hemoproteínas, incluyendo las peroxidases, el citocromo c presenta una banda de absorbancia llamada Soret (de 390 nm a 410 nm), que es debida a la presencia del grupo prostético ferroporfirina. Los datos obtenidos de esta preparación se presentan en la tabla 9. El conjugado CITC-Q conservó el 71% de la actividad inicial de la proteína, determinada mediante la oxidación del cloruro de pinacianol como sustrato (Ilustración 9).

### **6.6.4. Conjugación del Citocromo c de corazón de caballo - quitosano con Polietilenglicol**

El conjugado CITC-Q modificado con PEGaldehído (CITC-Q-PEG) disminuyó su actividad a un 42% (Ilustración 9).

Como se ha mencionado con las otras proteínas, la modificación con quitosano se hizo mediante los residuos carboxilo y en el caso de el citocromo c se encuentran aproximadamente 12 residuos libres que son susceptibles para reaccionar con la carbodiimida y posteriormente formar un enlace covalente con los aminos libres del quitosano. En este caso se usó un quitosano con un 85% de grupos aminos libres, se ocuparon aproximadamente el 10% de estos, y se asume que quedó un 75% para reaccionar con el PEGaldehído.

Se determinó la cantidad de citocromo c de las preparaciones mediante absorbancia de la banda Soret de cada una de las modificaciones realizadas (Tabla 9). En estudios previos donde se realiza la pegilación directamente sobre la proteína citocromo c, se llegó a obtener una modificación del 80% [38], es importante resaltar que la pegilación realizada en esta investigación se hace sobre los grupos aminos del quitosano que a su vez está unido a la proteína, y la eficiencia de pegilación puede verse afectada.

Tabla 9 Modificación de Citocromo c

Preparación	mg totales de proteína en la preparación
CITC	1.66
CITC-Q pH 5.0	1.76
CITC-Q-PEG pH 8.0	0.57

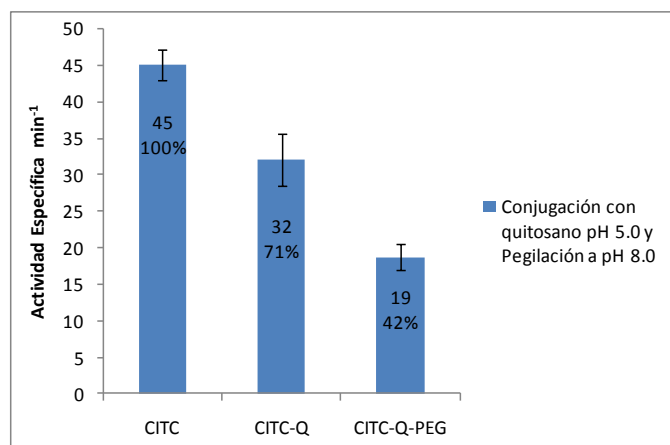


Ilustración 9. Porcentaje de actividad enzimática de los conjugados de Citocromo c

### 6.6.5. Conjugación de la Cloroperoxidasa con quitosano

Como se mencionó anteriormente, el quitosano es un derivado de la quitina, los pesos moleculares y el grado de deacetilación están típicamente entre 1,000 KDa y 70% respectivamente [46]. En este trabajo se usó un quitosano con un 85% de deacetilación, lo que nos indica que existe un 85% de aminos libres en la molécula, los cuales son susceptibles de ser modificados. Para el caso de la CPO existen aproximadamente 24 residuos carboxilo, es decir que en promedio se tendría el 20% de los aminos del quitosano ocupados por la proteína, lo que se considera una alta probabilidad de conjugación. Cabe anotar que durante el proceso de lavado de la preparación después de la conjugación, usando una celda de ultrafiltración equipada con una membrana de 50,000 Da, se elimina la mayor parte de la enzima no conjugada teniendo en cuenta que esta pesa aproximadamente 42,000 Da. Procedimientos similares se encuentran reportados en la literatura para este tipo de modificaciones con otras proteínas, un



ejemplo de ello es la construcción de conjugados con lacasa [43], en donde se realizó la unión covalente de la lacasa al quitosano mediante carbodiimida. En este trabajo y aprovechando la propiedad de precipitación del quitosano a pH por encima de 7.0, se recuperó el biocatalizador y separó de la enzima que no se conjugó. Además, también en este trabajo se encontró que al llevar a cabo la reacción a 4°C se obtenía un mayor porcentaje de inmovilización comparado con la reacción a temperatura ambiente. En nuestra investigación las reacciones se realizaron a temperatura ambiente, y no se evaluó otra temperatura.

La determinación de la concentración de proteína al final de la conjugación con quitosano se realizó midiendo la absorbancia de la banda Soret. En las Tablas 10 y 11 se presenta la cantidad de proteína conjugada después de cada una de las modificaciones. Los resultados sugieren un porcentaje de modificación para la CPO alrededor del 50% a temperatura ambiente, modificaciones similares en otras proteínas como la Lacasa han presentado porcentajes de conjugación alrededor del 11% a temperatura ambiente y del 50% a 4°C [43].

### **5.6.3. Conjugación de la Cloroperoxidasa-quitosano con polietilenglicol**

Después de la obtención del bioconjugado CPO-Q-PEG se evaluó su actividad halogenasa usando la monoclorodimedona como sustrato. En la Ilustración 10 se observa que la modificación de la CPO, con quitosano y posteriormente con polietilenglicol no afectó drásticamente la actividad de la misma. Las reacciones en este primer experimento fueron llevadas a cabo a pH 5.0 para la conjugación con quitosano y posteriormente la pegilación al mismo pH. Esto permite inferir que el procedimiento a éste pH es bueno para la enzima. Esto fue confirmado llevando a cabo la pegilación a pH 7.0, dando como resultado una disminución en la actividad de la enzima en un 93% (Ilustración 11). La finalidad de evaluar la reacción de pegilación a pH 7.0 fue de mejorar la reactividad de los grupos aldehídos con los aminos. La reacción con PEGaldehído se puede llevar a cabo en un pH de 5.5 a 7.5, para formar un intermediario de base Schiff. Sin embargo si se desea que más de un sitio amino reaccione, se recomienda usar un pH de 8.0 y arriba de este, entre 8 y 10 [45]. Sin embargo, se sabe que la CPO es inestable a pH por arriba de 6 y pierde su actividad de manera considerable e irreversible [47].

Si se hace una comparación entre las dos preparaciones, puede observarse que cuando se hizo el procedimiento de pegilación a pH 7.0, la disminución de la actividad de la enzima es notable, comparado a cuando se realizó a pH 5.0, puesto que a pH 5.0 conserva el 92% de la actividad inicial y a pH 7.0 solo conserva el 7%. Por otro lado, si se considera las eficiencias de la pegilación a pH 5.0 y 7.0 no se aprecia aparentemente una diferencia significativa (Tabla 10 y 11). Por lo tanto puede inferirse que la actividad del conjugado pegilado se favorece a pH 5.0, lo que es coherente con lo reportado previamente acerca de la estabilidad de la enzima por Park y colaboradores [47].

La determinación de la cantidad de proteína al final de la pegilación se llevo a cabo mediante la absorbancia de la banda Soret (Tabla 10 y 11).

Tabla 10 Modificación cloroperoxidasa (Pegilación pH 5.0)

Preparación	Promedio mg totales de proteína en la preparación
CPO	6.26 ±2,36
CPO-Q pH5.0	3.41 ±0,47
CPO-Q-PEG pH 5.0	0.95 ±0,63

Tabla 11. Modificación Cloroperoxidasa (Pegilación pH 7.0)

Preparación	mg totales de proteína en la preparación
CPO	1.89
CPO-Q pH5.0	1.11
CPO-Q-PEG pH 7.0	0.23

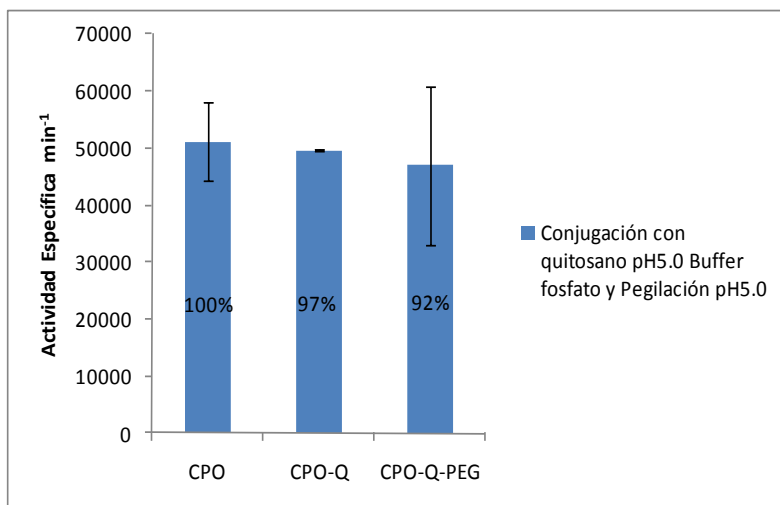


Ilustración 10 . Porcentaje de actividad de los conjugados enzimáticos de Cloroperoxidasa

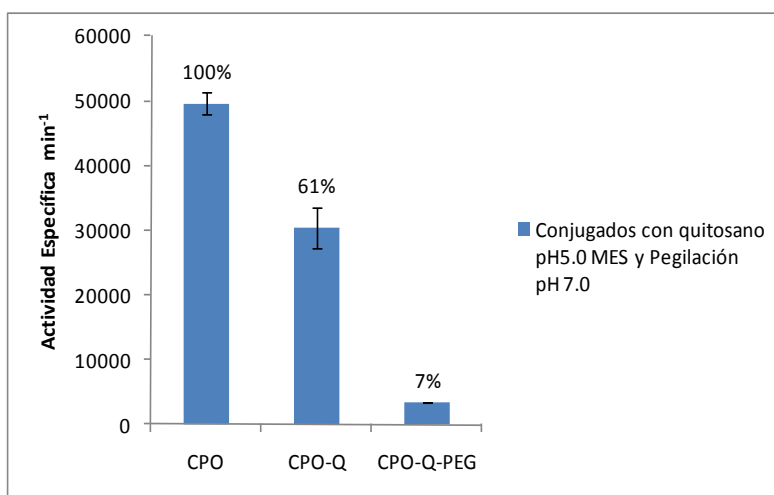


Ilustración 11. Porcentaje de actividad de los conjugados enzimáticos de Cloroperoxidasa (Pegilación pH 7.0)

Finalmente uno de los objetivos principales de este estudio era poder elaborar un bioconjugado capaz de realizar oxidaciones de compuestos azufrados, y una de las enzimas con mayor evidencia de hacerlo es la CPO, es por esto que todo lo anterior permitió definir las condiciones de conjugación para esta. Los datos obtenidos permitieron establecer que el uso de buffer fosfato pH 5.0 para la reacción con el quitosano y carbodiimida era mejor. Por esto se prepararon distintos bioconjugados con

quitosano y se caracterizaron en términos de actividad usando como sustrato a la monoclorodimedona.

Los datos obtenidos nos muestran lo esperado, es decir no se observa una pérdida de actividad de la enzima después de la conjugación con quitosano ya que se conserva el 83% de la actividad inicial (Ilustración 12). Por otro lado, se exploró el uso de polietilenglicol activado con cloruro cianúrico y la reacción fue llevada a cabo a pH 6.0. Se encontró que después de la pegilación la actividad disminuyó a un 35% de la inicial (Ilustración 12). Estos datos si los comparamos con lo obtenido en la pegilación con PEGaldehído, nos sugieren dos observaciones importantes: primero cuando se llevó a cabo la pegilación a pH 5.0 no se observa una caída de la actividad, pero no se puede asegurar que haya habido una pegilación ya que el pKa de los aminos del quitosano está alrededor de 6.5 y segundo cuando se hizo a pH 7.0 ya se observa una caída drástica de la actividad, ya que como se mencionó previamente a este pH y por encima del mismo la CPO sufre una inactivación irreversible. Sin embargo, a pH 6.0 que se llevó a cabo la pegilación con PEG activado con cloruro cianúrico se aumentó la probabilidad de modificación y se obtuvo una pérdida de la actividad inicial del 65%. Más adelante se verá que para efectos del uso de este bioconjugado la pérdida de actividad no es tan negativa puesto que es suficiente para ser activa en presencia de solventes orgánicos.

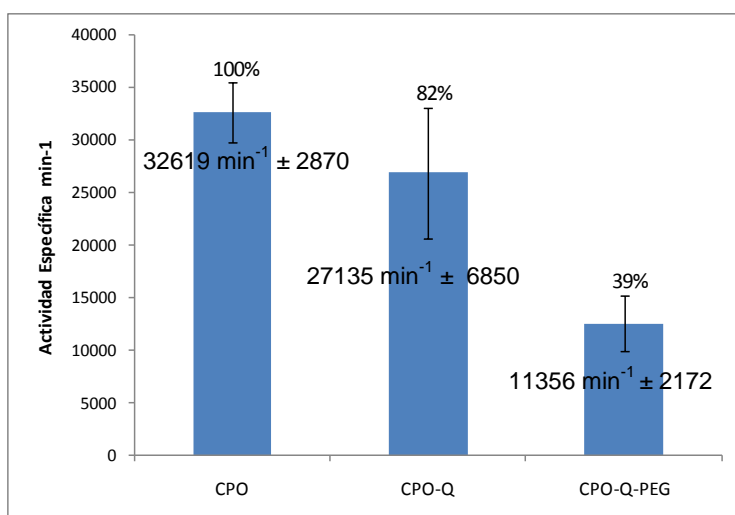


Ilustración 12. Porcentaje de actividad de la Cloroperoxidasa después de la modificación con quitosano y PEGactivado con cloruro cianúrico

Para complementar estos datos, y poder demostrar de alguna forma que el proceso de conjugación con quitosano se estaba dando mediante la formación de un enlace covalente entre los aminos del quitosano y los carboxilos de la enzima, se procedió a realizar un gel de poliacrilamida, en donde se corrieron diferentes muestras, la CPO, el quitosano, la CPO con quitosano no conjugada covalentemente es decir sin carbodiimida y la CPO-Q es decir conjugada covalentemente mediante la carbodiimida. En este gel se evidencia algo importante, ya que el control en donde se puso el quitosano con la enzima sin carbodiimida, demuestra que sin la presencia de este reactivo la formación del enlace no se daba, puesto que se observa la banda correspondiente a la enzima sin conjugar. Cuando si se usa carbodiimida se observa una migración aberrante de la proteína lo que nos indica la conjugación con el quitosano.

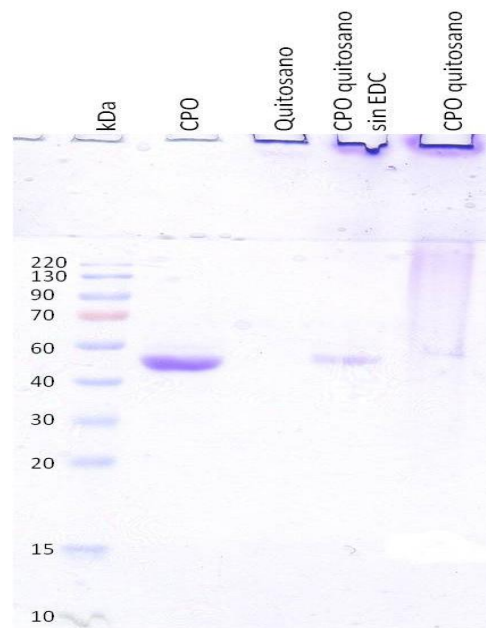


Ilustración 13. Gel de Poliacrilamida 12%

Se determinó un balance de la actividad con el fin de estimar la cantidad de CPO que se unió covalentemente con el quitosano. Para esto tomamos en cuenta las actividades de cada uno de los preparados de CPO-Q y las actividades en los lavados que se hicieron después de la conjugación. En la Tabla 12 podemos observar las unidades de enzima presentes en la conjugación y en los lavados.

Tabla 12 Balance de actividad

Unidades Iniciales para la reacción	Enzima conjugada covalente activa (Unidades)	Lavados (Unidades)
1372	615.9 ± 30.7	8.1 ± 2.6
100%	45%	0.6%

Según los datos obtenidos, se puede afirmar que el proceso de conjugación, al menos evidenciado por unidades de enzima, permite obtener un 45% de la enzima conjugada activa, y puesto que en los lavados solo se encuentra un 0.6% de la enzima inicial, se puede sugerir que aproximadamente el 54% de la enzima restante pudo haberse conjugado también pero sufriendo una inactivación. La actividad fue medida usando como sustrato monoclorodimedona. El control que se llevó a cabo en el proceso de conjugación fue el uso de CPO y quitosano sin carbodiimida, el cual recibió el mismo tratamiento que la muestra con carbodiimida, incluyendo los lavados. El balance de actividad realizado en el control dió como resultado 41 U en el conjugado después de lavar y 40 U en los lavados, siendo las unidades iniciales puestas en la reacción de 137U. Esto indica que aproximadamente el 30% de la enzima inicial interaccionó con el quitosano de manera electrostática y se mantuvo activa, y un 41% de la enzima se pudo haber inactivado en el proceso de unión no covalente. La unión covalente permite obtener mayor carga enzimática puesto que en los lavados solo se recupera un 0.6% de la enzima inicial activa. Sin embargo, cabe mencionar que de esa carga enzimática que es de aproximadamente el 99% el 45% es activa. Si bien el valor de inactivación es importante de considerar, la preparación parece ser buena comparada con los resultados de inmovilización en este mismo trabajo, donde la inactivación es superior al 90%.

#### **6.7. Determinación del grado de modificación de la enzima cloroperoxidasa con quitosano y polietilenglicol mediante la técnica del “light scattering”**

Para evaluar cambios en cuanto a tamaño de la enzima debido a la modificación con quitosano y polietilenglicol, se determinó mediante la técnica de light scattering el tamaño de las partículas catalíticas y así poder establecer algunas diferencias.

Se midió el tamaño de la CPO sin modificar, del quitosano y de la CPO modificada con quitosano (CPO-Q) y doblemente modificada con quitosano y polietilenglicol (CPO-Q-PEG).

Tabla 13 Tamaños promedio de la enzima CPO y conjugados

Muestra	Promedio diámetro (nm)	Porcentaje volumen (Abundancia)
Quitosano	13.97 ± 2.64	94.5%
	1239.67 ± 158.59	5.5%
Polietilenglicol	3.69 ± 0.88	100%
CPO	6.3 ± 0.51	99.2%
CPO-Q	661.0 ± 46.48	93.3%
	118.45 ± 15.68	6.7%
CPO-Q-PEG	337.08 ± 24.87	97.1%
	5067.4 ± 185.66	2.9%

En la Tabla 13 se pueden observar los tamaños promedio determinados por light scattering. Evidentemente hay un cambio de tamaño de la enzima sola y una vez conjugada ya sea con quitosano o con quitosano y polietilenglicol. Se hizo la medición de los polímeros solos, es decir del quitosano y polietilenglicol para tener una idea de su tamaño, cabe anotar que estas son moléculas lineales y la metodología podría no darnos

una medición exacta. En la Tabla 13 se presenta el diámetro promedio y el porcentaje de volumen o abundancia de partículas que oscilan en esos tamaños. La enzima conjugada ya sea CPO-Q o CPO-Q-PEG presenta dos poblaciones con tamaños diferentes. Lo que nos puede estar mostrando grados diferentes de modificación.

Por otro lado, la población mayoritaria de la CPO-Q presenta tamaños más grandes que los de la CPO-Q-PEG. Es probable que si las moléculas de PEG reaccionan con los grupos aminos del quitosano, se reduzcan las interacciones entre cadenas de quitosano conjugada con moléculas de proteína, esto probablemente reduciría el tamaño de las especies observadas por DSL, explicando la población con menor tamaño en CPO-Q-PEG. Sin embargo, para tener certeza del fenómeno molecular que genera esta reducción en el tamaño de los conjugados, se necesitaría una caracterización más fina. El punto importante a resaltar es que es claro que la modificación con PEG ocurre y tiene un efecto en las propiedades de los conjugados.

En la Ilustración 14 se presenta la distribución de las diferentes preparaciones en términos de tamaño. Cada una de las curvas representa una medición que permite visualizar mejor el cambio de tamaño. Los datos presentados en la Tabla 13 corresponden al promedio de todas las mediciones.

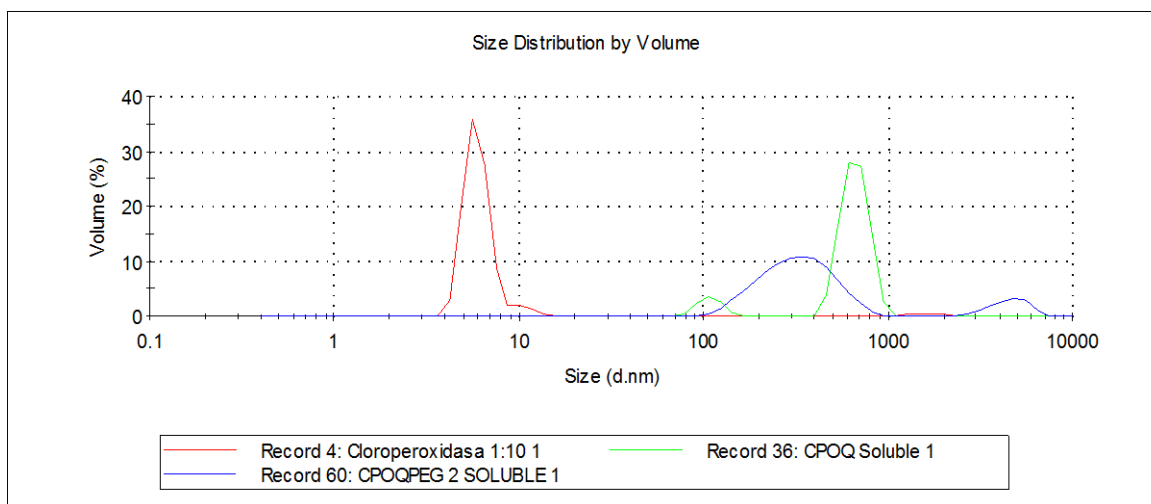


Ilustración 14. Distribución por tamaño de la enzima y sus conjugados



Con esta metodología se logra apreciar un cambio reflejado en el aumento de tamaño de la CPO después de ser modificada. Aproximadamente el diámetro de la CPO es de 6 nm, medido por herramientas informáticas como PYMOL en donde se puede determinar el diámetro cinético basado en la estructura cristalográfica de la proteína y asumiendo que esta es completamente globular. Este diámetro de 6 nm es muy cercano al determinado por el equipo, lo que confirma la veracidad de la técnica. Y tomando en cuenta que ninguna de las cromatografías de permeación en gel arrojó un dato concluyente, estas mediciones confirman la modificación de las proteínas.

## **6.8. Evaluación de la actividad de los conjugados en soluciones ternarias utilizando como sustrato tiantreno**

Una vez determinadas las características de los conjugados se realizó la evaluación de sus propiedades catalíticas en soluciones ternarias, usando diferentes combinaciones de solventes. Entre las combinaciones usadas están, hexano– isopropanol–buffer y diclorometano-metanol-buffer. Las proporciones de las mezclas están indicadas en el apartado de materiales y métodos. Las proteínas evaluadas en estos sistemas fueron la CPO y CITC en sus tres formas, sin modificar, modificada con quitosano y modificada con quitosano y PEG.

### **6.8.1. Citocromo c de corazón de caballo**

La proteína CITC, no presentó actividad en la oxidación del tiantreno en ninguno de los dos sistemas, y con ninguna de las tres formas. Ensayos previos con la enzima CITC en la solución ternaria diclorometano-metanol-buffer [38] mostraron resultados diferentes a los obtenidos en esta investigación. En el trabajo de García-Arellano y colaboradores [38] se hizo una doble modificación de la proteína, en donde los grupos aminos libres fueron covalentemente unidos a un polietilenglicol activado con cloruro cianúrico, la cual resultó en una proteína conjugada soluble en solventes orgánicos, y luego realizaron una segunda modificación, donde los grupos carboxilos libres, incluyendo los propionatos del grupo hemo, fueron alquilados para formar ésteres de metilo (PEG-Cyt-Met). La proteína modificada PEG-Cyt-Met presentó la actividad más alta en el sistema que contenía 65% de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 35%  $\text{CH}_3\text{OH}$  y solo 5%  $\text{H}_2\text{O}$  en la oxidación de porfirinas sintéticas (NiOEP) con una actividad de  $1085 \pm 104 \text{ min}^{-1} \mu\text{mol}^{-1} \text{ prot}$ ; mientras que la proteína sin modificar

no presentó actividad alguna [38]. En la presente investigación se usó la misma mezcla para evaluar el CITC en su capacidad de oxidar el compuesto tiantreno, y no se encontró actividad con ninguna de las formas de la proteína, al contrario se presentó una precipitación de la proteína al ponerse en contacto con la mezcla. Es probable que la falta de actividad pudiera atribuirse a la precipitación sin duda debida a la presencia del quitosano en el bioconjugado. Este resultado es contrario a otros ya descritos en cuanto al uso de esta modificación con PEG para obtener una proteína soluble en medios orgánicos [48], pero en donde no hay presencia de quitosano.

Se ha reportado que la proteína CITC sin modificar tiene la capacidad de oxidar compuestos azufrados como el tiantreno, en mezclas que contienen 10% de N,N-dimetilformamida y buffer de fosfatos 0.06 M, pH 6.1 [49]. Para el caso de la mezcla usada en la presente investigación se cuenta solo con un 5% agua, y no se evidenció actividad alguna para la oxidación del tiantreno.

Por otro lado, se evaluó la mezcla hexano-isopropanol-buffer con la proteína CITC, en las tres formas, y no se observó actividad alguna, sin embargo a diferencia de la mezcla diclorometano-metanol-buffer, no se presentó precipitación de la proteína en ninguna de las formas. Este sistema basado en Hexano se evaluó previamente en CPO [37].

### **6.8.2. Peroxidasa de rábano blanco**

Considerando que no se encontraron reportes previos de oxidación del tiantreno catalizada por esta enzima, se procedió a evaluar la HRP en una mezcla de reacción de 1 mL el cual contenía 20% de acetonitrilo, buffer de fosfatos, pH 6.0 y tiantreno 0.2 mM. Se adicionaron 5 uL de HRP con una concentración de  $9.3 \times 10^{-5}$  M y la reacción se dejó por una hora a temperatura ambiente tras adicionar peróxido de hidrógeno 1 mM. Posteriormente, la mezcla de reacción se analizó en un HPLC, equipado con una columna de fase reversa, para determinar si hubo transformación. Los resultados obtenidos muestran claramente que no hubo ninguna transformación (Ilustración 15 A y B).

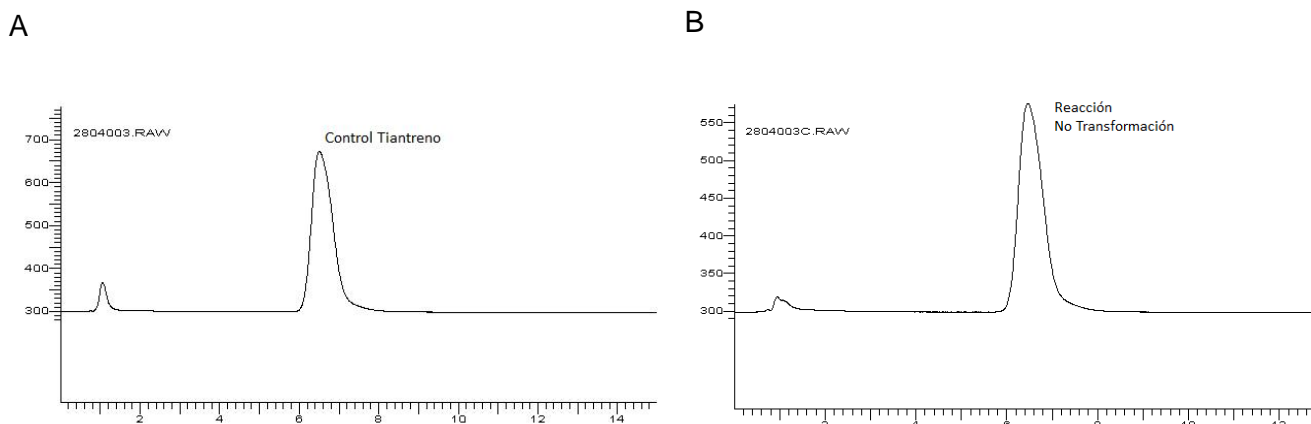


Ilustración 15. Cromatografía en fase reversa (A y B). Reacción de la peroxidasa de rábano blanco con tiantreno en un 20% de acetonitrilo

La CPO fue evaluada en sus tres formas en las mezclas, diclorometano-metanol-buffer y hexano-isopropanol-buffer. En el primer sistema de diclorometano, reportado en el trabajo realizado con CITC [38], no se encontró actividad con ninguna de las preparaciones enzimáticas, modificada y no modificada. En el trabajo de Tziaila y colaboradores, se evaluó la CPO en su actividad halogenasa con monoclorodimedona y de epoxidación con estireno llevada a cabo en sistemas ternarios [37]. En la presente investigación se evaluaron todas las mezclas propuestas en el trabajo de Tziaila y colaboradores (Tabla 14)[37] en la capacidad de oxidación del tiantreno por parte de la CPO sin modificar en los diferentes sistemas basados en hexano. Los sistemas reportados como 1 y 6 (Tabla 14) presentaron las mayores actividades. Dichas actividades fueron de  $232 \text{ min}^{-1}$  (sistema 1) para la oxidación del tiantreno en una mezcla que contenía 18.9% de agua (Tabla 14) y una actividad cercana a la anterior de  $202 \text{ min}^{-1}$  (sistema 6) en la mezcla que contenía solo un 6.3% de agua (Tabla 14). En el trabajo de Tziaila se reportó mayor actividad en el sistema con 6.3% de agua con la monoclorodimedona como sustrato [37]. Estudios previos han demostrado que la CPO es eficiente en la oxidación del tiantreno [50]. No se detectó actividad enzimática en los sistemas conteniendo 2.0 y 2.5% de agua.

Las diferentes actividades en la oxidación de tiantreno, por parte de la CPO, obtenidas en los diferentes sistemas, no permiten detectar una correlación entre el contenido de agua o de isopropanol y la actividad catalítica. Para profundizar el estudio, se realizó la

determinación del coeficiente de actividad termodinámica para el tiantreno en cada una de estas mezclas y así poder establecer una correlación. Dicho coeficiente de actividad termodinámica sugería que a mayor porcentaje de agua en la mezcla mayor sería el coeficiente de actividad termodinámica del tiantreno, es decir estaría más disponible para su transformación, sin embargo una vez analizados los resultados, no se encontró ninguna correlación significativa (datos no mostrados). Probablemente esto se deba a que el coeficiente de actividad termodinámica considera solamente el sustrato y no qué pasa con la enzima de manera directa. Es probable que existan diferentes factores que afectan la estabilidad de la enzima en el medio de reacción, el cual es complejo y multifactorial. De acuerdo a esto, también se consideró la determinación de la constante dieléctrica de cada una de las mezclas y determinar cómo afecta ésta a la actividad enzimática[51, 52]. Se esperaba que a mayor valor de constante dieléctrica la actividad fuera mayor debido a que hay mayor cantidad de agua favoreciendo el microambiente de la enzima para realizar la catálisis. Sin embargo, no se encontró una relación directa de que a mayor constante dieléctrica mayor actividad. Lo que si fue claro es que las constantes dieléctricas de la mezclas se correlacionan directamente con el porcentaje de agua, es decir a mayor porcentaje de agua mayor constante dieléctrica. Por otro lado se encontró también que la relación entre el coeficiente de actividad termodinámica y la constante dieléctrica también es directa teniendo en cuenta el porcentaje de agua, a mayor porcentaje de agua mayor constante dieléctrica y actividad termodinámica del tiantreno. Con el hexano no se encontró un comportamiento totalmente lineal, pero si hay una tendencia de que a mayor porcentaje de hexano la constante dieléctrica de la mezcla y la actividad termodinámica del tiantreno en la mezcla es menor (datos no mostrados).

También se midió la actividad de agua (datos no mostrados) en cada una de las mezclas pero de igual forma no se encontró una correlación entre la actividad enzimática medida y la actividad de agua medida. Algo importante es que las dos mezclas denominadas como sistema 1 y 6, las cuales fueron usadas posteriormente en los demás ensayos, presentaban una actividad de agua similar, a pesar de que en el sistema 1 se tiene un porcentaje de agua de 18.9% y en el sistema 6 se tiene un porcentaje de agua del 6.3%. Esto corrobora el hecho de haber obtenido actividades enzimáticas similares, es decir no había diferencias significativas entre ellas.

Tabla 14 Actividad Específica para la oxidación de tiantreno por parte de la CPO libre en sistemas basados en hexano

Sistema	Hexano %	Isopropanol%	Agua %	Actividad Específica min-1
1	15.8	65.3	18.9	232 ± 40
2	17.2	67.2	15.6	155 ± 11
3	11.7	73.7	14.6	100 ± 12
4	23.4	64.6	12.0	140 ± 7
5	27.1	64.4	8.5	150 ± 17
6	46.0	47.7	6.3	202 ± 38
7	19.9	74.6	5.5	18 ± 7
8	37.8	57.2	5.0	93 ± 6
9	55.8	39.6	4.6	128 ± 14
10	53.4	43.4	3.2	48 ± 5
11	34.1	63.4	2.5	ND
12	64.5	33.3	2.2	131 ± 11
13	47.3	50.7	2.0	ND

Continuando con el objetivo de uso de estos datos, se tomaron aquellos donde se obtuvo mayor actividad, los cuales fueron el sistema 1 y 6. Se procedió a seguir haciendo las evaluaciones de caracterización del bioconjugado con CPO en estos dos sistemas. Es decir se evaluó la enzima sin modificar, modificada con quitosano y modificada con quitosano y PEG activado con cloruro cianúrico. Los resultados presentados corresponden a tres preparaciones diferentes de cada uno de los bioconjugados CPO-Q y CPO-Q-PEG. El comportamiento de los bioconjugados se presenta en la Ilustración 16.

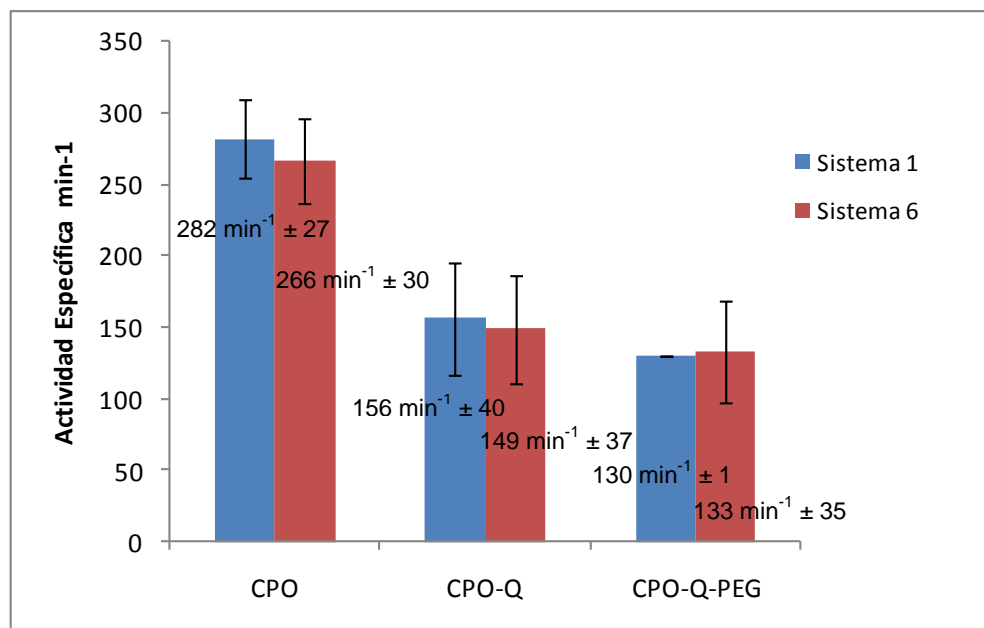


Ilustración 16. Actividad de los bioconjugados en la oxidación del tiantreno en sistemas ternarios basados en hexano

Una vez modificada la proteína con quitosano se encontró que la actividad en ambos sistemas es similar, es decir no se encuentran diferencias significativas. Este comportamiento es similar en la CPO doblemente modificada con quitosano y polietilenglicol activado con cloruro cianúrico. Si hacemos una comparación entre los bioconjugados CPO-Q y CPO-Q-PEG, estas no son diferentes significativamente, sin embargo si se observa una disminución en la actividad de las enzimas modificadas con respecto a la enzima no modificada. Esta disminución de la actividad puede estar relacionada al carácter hidrofílico que adquiere la enzima al estar modificada con quitosano, lo que puede estar aumentando la limitación de transferencias de masas, es decir disminuyendo la interacción entre el sustrato y la enzima.

La modificación con polietilenglicol le confiere a la enzima una característica anfífilica, sin embargo como se mencionó anteriormente no se observa un cambio significativo cuando la enzima se encuentra solo con quitosano a cuando se encuentra con quitosano y polietilenglicol. En ensayos realizados previamente en esta investigación, se evaluó la modificación con polietilenglicol aldehído y se obtuvo una caída drástica de la actividad en la oxidación del tiantreno (datos no mostrados), sin embargo algo interesante es que con

el uso del polietilenglicol activado con cloruro cianúrico no se observa una caída tan drástica de la actividad en la oxidación de este sustrato azufrado. Muchos trabajos de modificación de proteínas se han enfocado en poder producir enzimas solubles y activas en medios hidrofóbicos, tales como solventes orgánicos. Enzimas tales como lipasa, quimotripsina, catalasa y peroxidasa se han hecho solubles y activas en solventes orgánicos tales como benceno, por la unión covalente de una molécula anfipática a la superficie de la enzima. La naturaleza hidrofílica del PEG hace posible la modificación de las enzimas en solución acuosa y su naturaleza hidrofóbica capacita a la enzima modificada a funcionar en un ambiente hidrofóbico [53]. En este trabajo se obtienen biocatalizadores modificados con quitosano y polietilenglicol los cuales son solubles en el medio de reacción que contiene hexano, isopropanol y agua, y estos se mantienen activos.

En un estudio realizado por Ayala y colaboradores se determinó que la actividad específica de la CPO para oxidar el tiantreno en sistemas con un 15% o 20% de acetonitrilo a pH 3.0 y en presencia de 20 mM de KCl, era  $1310 \text{ min}^{-1} \pm 132$  [50]. Aunque los valores de actividad específica obtenidos en este estudio son menores, es importante resaltar que en nuestro estudio se usaron sistemas de bajo contenido de agua para oxidar el compuesto modelo tiantreno en una mezcla que contenía isopropanol y hexano y la enzima (tanto no modificada como modificada) se mantuvo activa.

#### **6.8.4.1. Caracterización cinética**

Las constantes cinéticas de la enzima libre, y de los conjugados CPO-Q, y CPO-Q-PEG se determinaron para la oxidación del tiantreno. Se midieron las velocidades iniciales para la oxidación de este sustrato azufrado a diferentes concentraciones tanto de tiantreno como de peróxido de hidrógeno. En la Tabla 15 se presentan las constantes cinéticas de la CPO libre, conjugada con quitosano y conjugada con quitosano y PEG. Los parámetros cinéticos están determinados para los dos sistemas evaluados previamente, en donde se varía el porcentaje de hexano, isopropanol y agua. La  $k_{\text{cat}}$  calculada es mayor en ambos sistemas para la CPO libre comparada con las enzimas modificadas, tanto con quitosano como con quitosano y PEG. La  $K_M$  para el peróxido está en el mismo orden de magnitud para la enzima en todas sus formas y en ambos sistemas exceptuando para la CPO-Q-PEG en el sistema 6 (menor contenido de agua) en donde la

$K_M$  es un orden de magnitud menor, y esto probablemente esté relacionado con que el aumento de hidrofiliidad del bioconjugado permita una mayor afinidad al peróxido haciendo que se necesiten bajas concentraciones de este en la catálisis. Esto también puede ser la causa de una inactivación más rápida del mismo, puesto que está expuesto a una mayor concentración del peróxido debido a un microambiente hidrofílico que rodea la enzima, recordando que en ésta mezcla el contenido de agua es muy bajo.

La eficiencia catalítica de manera global para el tiantreno evidentemente es mayor en el sistema 6 con la enzima en sus tres formas, siendo la más alta con la enzima libre. Sin embargo, algo interesante es que la CPO-Q aumenta esa eficiencia catalítica aproximadamente 4 veces cuando la reacción se lleva a cabo en el sistema 6 (menor contenido de agua) comparado a cuando se lleva a cabo en el sistema 1 (mayor contenido de agua). Se requeriría mejorar la estabilidad de la enzima modificada, puesto que los resultados indican que el efecto de la modificación con quitosano está favoreciendo de una u otra forma la catálisis, sin embargo el número de recambio es de solo  $41 \text{ min}^{-1}$  comparado con  $629 \text{ min}^{-1}$  en el sistema 1. Esto es consistente con el hecho de que la constante de inactivación de la CPO-Q en el sistema 6 es aproximadamente 12 veces mayor a la constante de inactivación de la CPO-Q en el sistema 1, y por ende su tiempo de vida media también (Tabla 15).

En estudios previos se han determinado constantes cinéticas para la oxidación del tiantreno tales como  $k_{\text{cat}} \text{ s}^{-1}$  64,  $K_M (\mu\text{M})$  1.5 y  $k_{\text{cat}}/K_M (\mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1})$  44 [50], en el presente trabajo, la  $k_{\text{cat}}$  obtenida en los diferentes sistemas y con la enzima sin modificar y modificada está por debajo. Sin embargo es importante resaltar que se tiene actividad en sistemas con muy poca agua y en presencia de solventes orgánicos.



Tabla 15 Constantes cinéticas de la enzima CPO libre y conjugada con quitosano y polietilenglicol en sistemas ternarios basados en hexano para la oxidación de tiantreno

Caracterización cinética	CPO		CPO-Q		CPO-Q-PEG	
	Sistema 1	Sistema 6	Sistema 1	Sistema 6	Sistema 1	Sistema 6
$k_{cat}$ media $\text{min}^{-1}$	1115	2238	340	768	607	365
$K_M$ Peróxido $\mu\text{M}$	78	24	61	111	35.8	6.0
$K_M$ Tiantreno $\mu\text{M}$	4.2	6.3	5.4	3.3	16.4	6.5
$k_{cat} \text{ min}^{-1}/K_M$ Peróxido $\mu\text{M}$	14.3	93.2	5.6	6.9	17.0	60.5
$k_{cat} \text{ min}^{-1}/K_M$ Tiantreno $\mu\text{M}$	265.5	355.2	63.0	232.7	37.1	55.9
$k_{in}$	0.0085	0.04	0.0064	0.06	0.0128	0.06
Tiempo de vida media	82	18	108	11	54	11

## 6.8.5. Estabilidad de los biocatalizadores

### 6.8.5.1. Almacenamiento en refrigeración (4-8 °C) de la CPO-Q

Como parte de la caracterización del bioconjugado de CPO con quitosano, se determinó la estabilidad de este al almacenamiento en refrigeración (4-8°C). Dicho ensayo se llevó a cabo midiendo la actividad del conjugado con monoclorodimedona cada 10 días, durante 70 días. Los resultados obtenidos nos muestran una caída gradual de la actividad, con una retención final de la actividad entre 38 y 42% (Ilustración 17)

En la Ilustración 17 se presentan los datos de actividad específica de CPO-Q con respecto al tiempo, y se puede observar la caída gradual de la actividad enzimática.

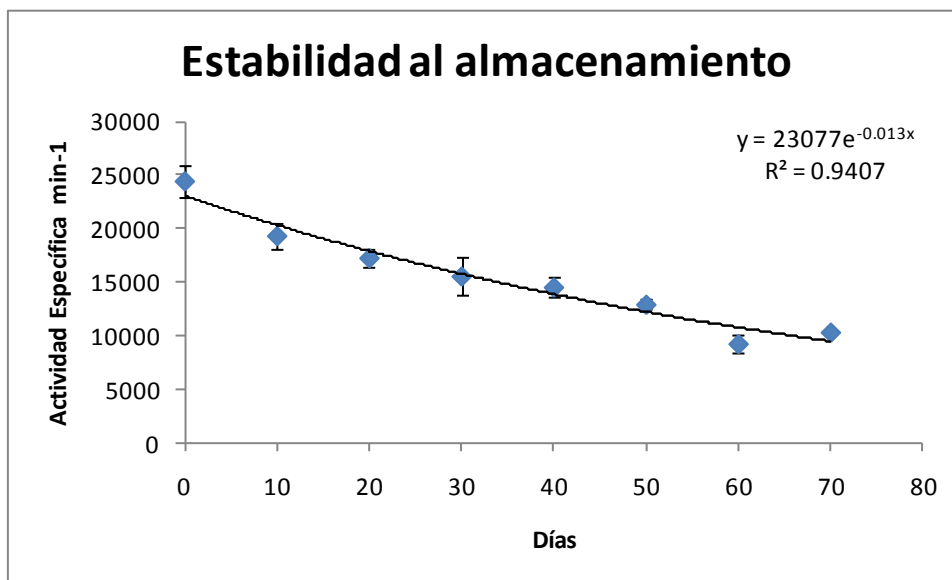


Ilustración 17. Estabilidad al almacenamiento en refrigeración de la CPO-Q durante 70 días

#### 6.8.5.2. Termoestabilidad

Para determinar la estabilidad de los bioconjugados a altas temperaturas, se incubaron a 60°C en solución acuosa (buffer de fosfatos, pH 5.0), durante una hora y se midió la actividad cada 10 minutos. La determinación del tiempo de vida media para los bioconjugados y la enzima libre fue de 19 minutos para la CPO, 13 minutos para la CPO-Q y 7 minutos para la CPO-Q-PEG, es decir que no se observan diferencias significativas en cuanto al tiempo de estabilidad (Tabla 17).

La Ilustración 18 muestra las cinéticas de inactivación de las enzimas en el tiempo durante la incubación a 60°C. El porcentaje de actividad residual de la CPO, CPO-Q y CPO-Q-PEG fue de 15%, 11% y 8% Ilustración 19) respectivamente, lo que finalmente permite decir que la inactivación de la enzima a esa temperatura es inminente y las modificaciones no le confieren algún tipo de termoestabilidad. La evaluación se llevó a cabo para esta temperatura puesto que estudios anteriores han mostrado que la CPO libre a esa temperatura no es estable, la enzima libre se inactiva rápidamente a temperaturas mayores a 50°C [54], y lo que se buscaba era determinar si la modificación confería algún tipo de protección a la enzima que le permitiera mantenerse estable.

Algunas modificaciones en la CPO como cristales entrecruzados de CPO mostraron un mejoramiento en la estabilidad a la temperatura, ya que estos mantuvieron la mayoría de su actividad catalítica a temperaturas por encima de los 70°C [54].

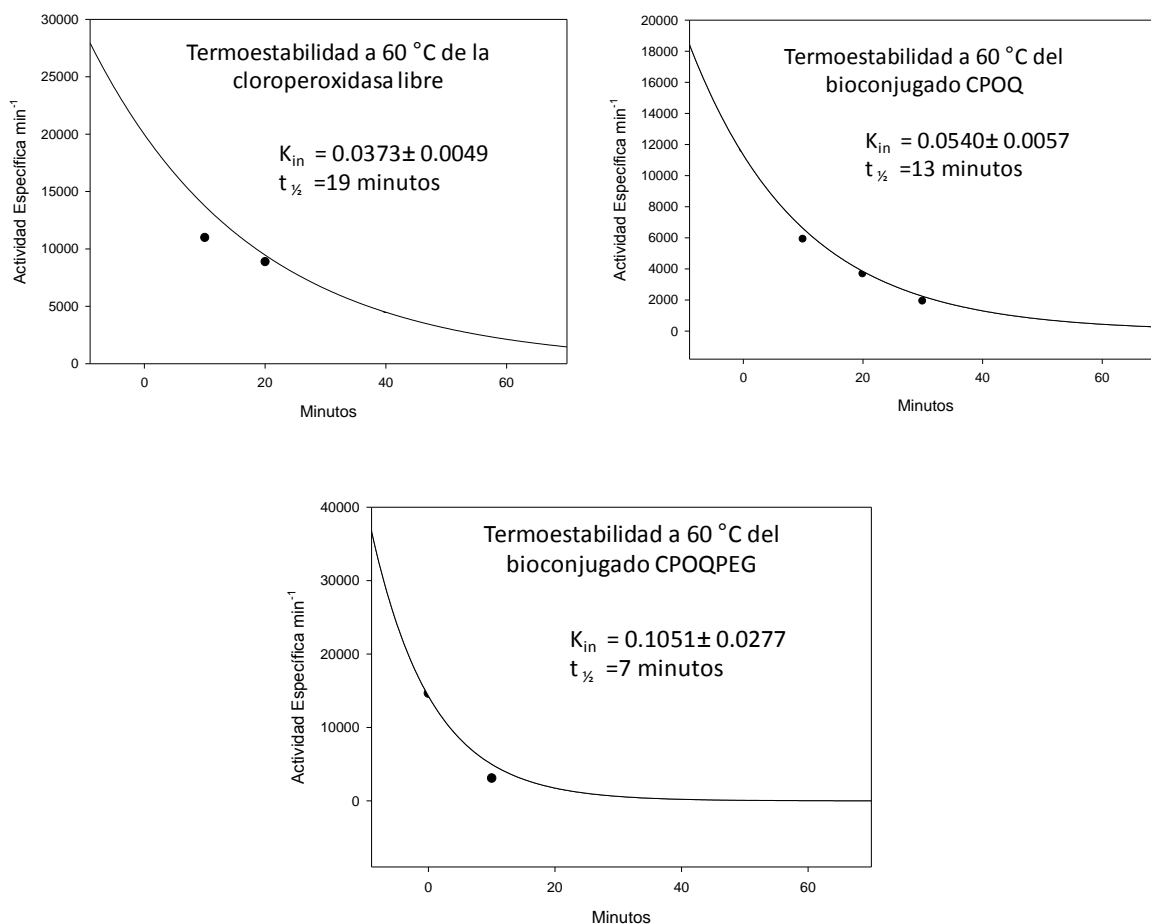


Ilustración 18. Cinéticas de termostabilidad de la CPO, CPO-Q y CPO-Q-PEG

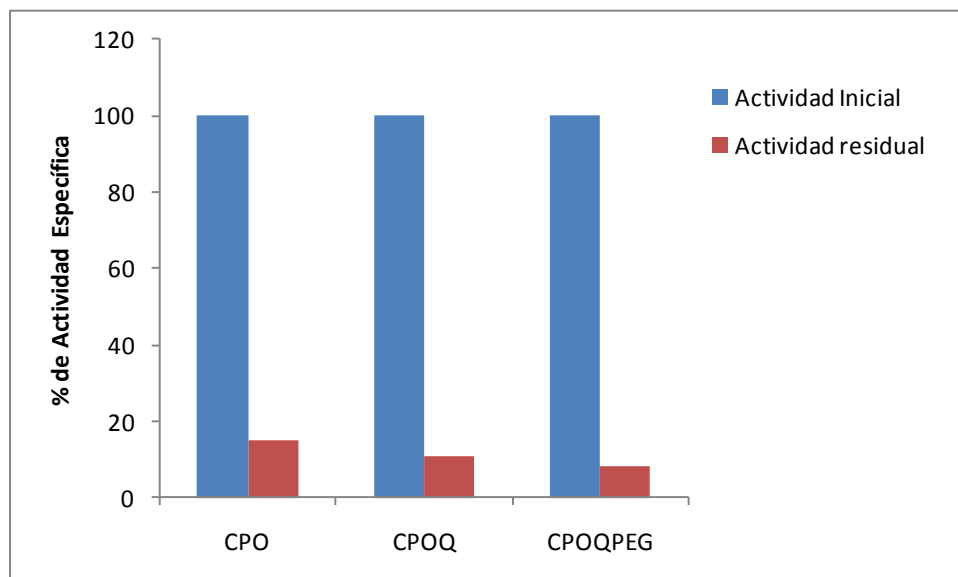


Ilustración 19. Actividad residual de la enzima libre y conjugada después de una hora de incubación a una temperatura de 60°C

### 6.8.5.3. Estabilidad al solvente (sistema ternario hexano-isopropanol-agua)

La estabilidad de la enzima libre y conjugada en el medio de reacción se determinó incubando estas en el sistema ternario y su actividad fue medida cada 5 minutos usando como sustrato monoclorodimedona. La evaluación se realizó usando los dos sistemas ternarios que se han venido mencionando durante el trabajo (sistema 1 y sistema 6). El sistema uno se caracteriza por tener un porcentaje de agua de 18.9% y el sistema 6 solo un 6.3%. Como se puede observar la composición del medio afecta drásticamente la actividad de la enzima puesto que cuando el porcentaje de agua es muy bajo la enzima libre y conjugada sufren una inactivación mas rápida, obteniéndose un porcentaje de actividad residual tras una hora y media de incubación del 5%,1% y 5% para CPO, CPO-Q y CPO-Q-PEG respectivamente. Sin embargo, algo interesante es que en el sistema con un contenido de agua del 18.9% se observa un aumento en el porcentaje de actividad residual de la CPO-Q comparada con la enzima libre, ya que logra mantener el 63% de la actividad inicial, lo que podría estar indicando que la conjugación de la enzima con quitosano bajo estas condiciones de la mezcla le confiere cierta protección a la enzima frente al efecto de los solventes como hexano e isopropanol (Ilustración 21).

El comportamiento de la enzima libre y la CPO-Q-PEG fue muy similar con una actividad residual del 45% y 41%. La determinación del tiempo de vida media indica de manera global que la enzima es mas estable en el sistema 1 en sus tres formas CPO, CPO-Q y CPO-Q-PEG, siendo la CPO-Q la mas estable de las tres (Tabla 16) (Ilustración 20).

Tabla 16 Estabilidad de la enzima libre y conjugada a solventes y estabilidad de las mismas a 60 °C

Enzima	Estabilidad en sistemas ternarios (hexano-isopropanol-agua)				Termoestabilidad a 60 °C (buffer fosfato pH 5.0)	
	Tiempo de vida media (minutos)		$k_{in}$		Tiempo de vida media (minutos)	$k_{in}$
	Sistema 1	Sistema 6	Sistema 1	Sistema 6		
CPO	82	18	0.0085	0.0393	19	0.0373
CPO-Q	108	11	0.0064	0.0634	13	0.0540
CPO-Q-PEG	54	11	0.0128	0.0611	7	0.1051

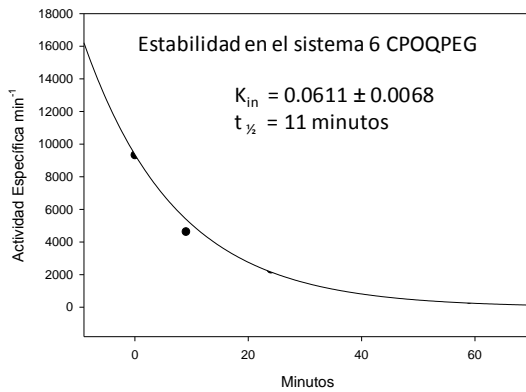
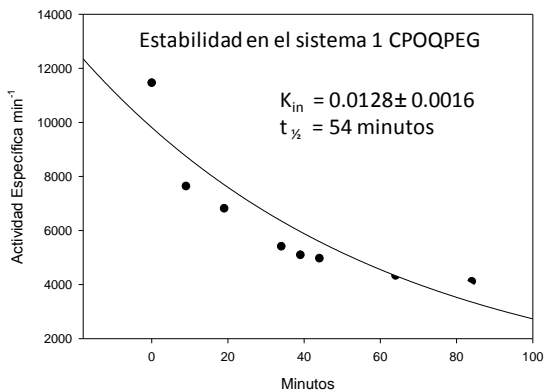
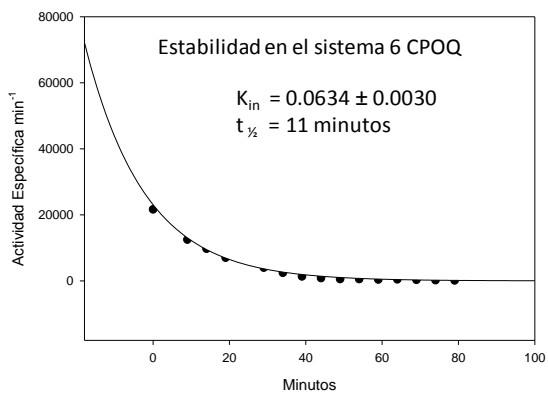
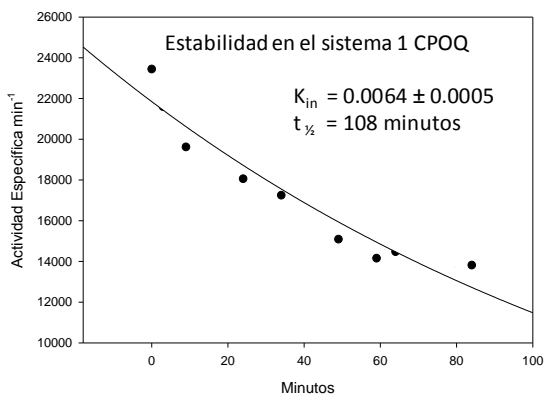
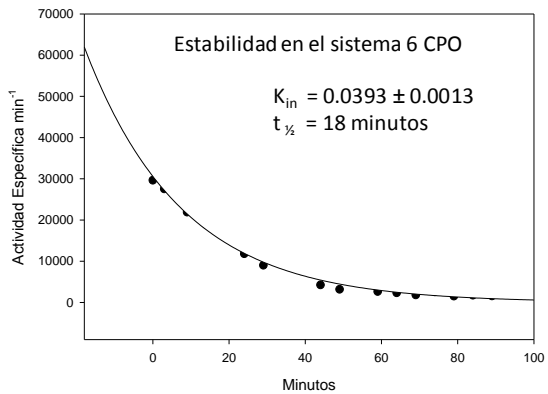
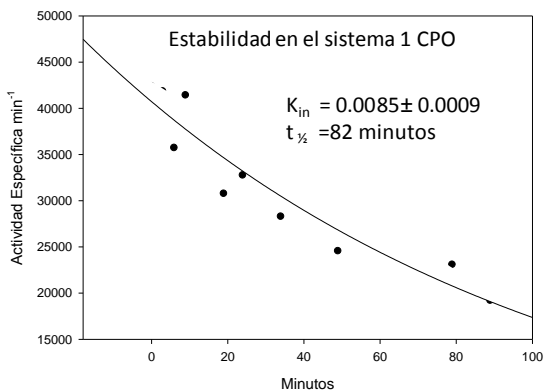


Ilustración 20. Cinéticas de estabilidad en el medio de reacción para la CPO, CPO-Q y CPO-Q-PEG

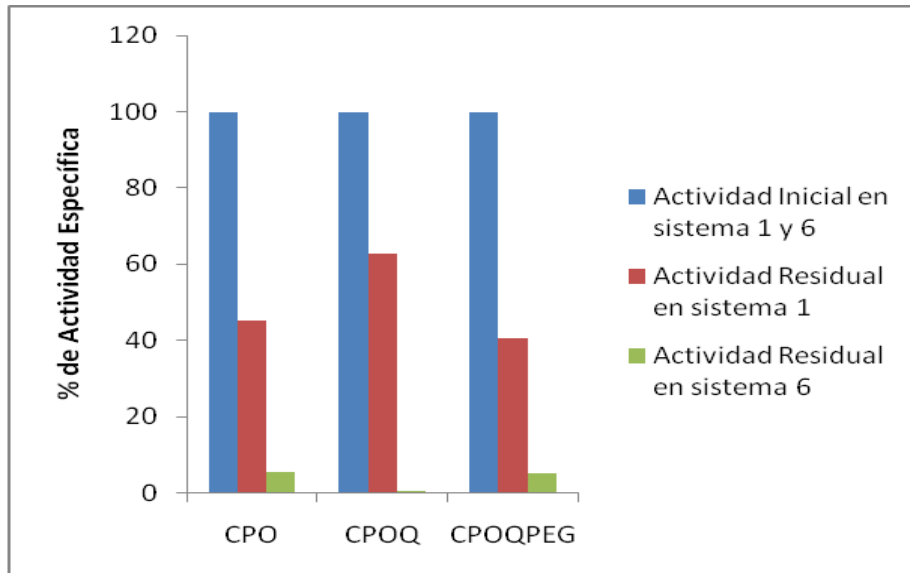


Ilustración 21. Actividad residual de la enzima libre y conjugada después de una hora y media de incubación en un medio compuesto por tres solventes (hexano-isopropanol-agua)

Cabe anotar que la estabilidad no solo depende del contenido de agua, puesto que cada mezcla tiene una variación del contenido de hexano y de isopropanol, es decir que son varios factores los que afectan la estabilidad de la enzima. En el sistema 1 hay 3 veces menos hexano que en el sistema 6 y en contraste en el sistema 6 hay 3 veces menos agua que en el sistema 1. Viendolo desde este punto de vista se podría sugerir que la enzima libre y conjugados presentan una mayor estabilidad al medio donde hay mas agua y menos hexano (Ilustración 21).

Finalmente con estos sistemas se aproxima al objetivo de poder simular un ambiente de baja polaridad para la enzima y evaluar cómo se comporta. Las modificaciones fueron diseñadas con el objetivo de lograr una enzima catalíticamente estable bajo estas condiciones agresivas, y se puede seguir trabajando en lo mismo, ya que es evidente la capacidad de la CPO de transformar compuestos azufrados como el tiantreno el cual es del tipo que se encuentran en los combustibles.

## 7. CONCLUSIONES

El proceso de inmovilización de las enzimas CPO, HRP y citocromo c sobre Nylon y poli-(etileno-co-metil acrilato-co-glicidil metacrilato) generó una inactivación de casi el 100% de las mismas. Una de las desventajas del proceso de inmovilización es precisamente que no se puede controlar específicamente los residuos de aminoácidos mediante los cuales se hace la inmovilización y por esto pueden verse afectados aquellos que son importantes para la catálisis o aquellos que distorsionan la estructura tridimensional, ocasionando así la disminución de la actividad o su inactivación.

La conjugación de las proteínas con el biopolímero quitosano, permitió mantener la actividad de las enzimas. Esta estrategia es una alternativa interesante para inmovilizar o bioconjuguar proteínas que no genera una inactivación tan drástica. Además ha sido ampliamente usada con otras proteínas para el diseño de biocatalizadores inteligentes debido a las propiedades que tiene éste biopolímero de responder al pH, permitiendo así recuperar el biocatalizador mediante precipitación al aumentar el pH de la solución en donde se encuentre. Para este trabajo en particular no se pudo hacer uso de esta propiedad puesto que las proteínas usadas, especialmente la CPO no son estables a pH alcalinos.

Con la idea de poder construir un biocatalizador tricomponente que mantuviera características hidrofílicas e hidrofóbicas, se decidió conjuguar la CPO-Q con PEG. Esta modificación generó que la enzima conservara un 35% de la actividad inicial. A pesar de esta caída de actividad, fue suficiente y se mantuvo activa en presencia de solventes orgánicos y en la oxidación del sustrato modelo tiantreno. La conjugación de proteínas con polietilenglicol es ampliamente usada en la biocatálisis en solventes orgánicos para permitir una mejor solubilidad de la proteína en el solvente y que esta se mantenga activa.

El sistema ternario hexano, isopropanol y agua fue adecuado para permitir que la CPO fuera activa para la oxidación del tiantreno. La CPO presentó la mayor actividad en dos mezclas, una donde el contenido de agua es de 18.9% y otra donde es de 6.3%. Estos resultados se consideran de gran interés puesto que encontrar actividad en bajo contenido de agua, permite seguir explorando este tipo de sistemas en donde la enzima se mantiene catalíticamente activa en presencia de solventes orgánicos, lo que permitiría



realizar reacciones con sustratos que sean solubles en ciertos solventes y así disminuir el problema de transferencia de masas

De manera global la eficiencia catalítica para la oxidación del tiantreno es mayor en el sistema con menor contenido de agua (sistema 6) con la enzima en sus tres formas CPO, CPO-Q y CPO-Q-PEG. Entre las tres preparaciones la CPO libre es la que presenta una mayor eficiencia. Sin embargo, es importante resaltar que la eficiencia catalítica de la CPO-Q aumenta aproximadamente 4 veces en el sistema 6 comparado con el sistema 1. Sin ser el número más alto, esta relación de aumento de un sistema a otro y sobre todo al de menos agua, podría indicar un efecto positivo del quitosano sobre la enzima, sin embargo se requiere de más estudios y de mejorar la estabilidad de las proteínas modificadas para optimizar el proceso.

La CPO modificada con quitosano y con quitosano y PEG, no resultó ser más termoestable que la enzima libre cuando se midió su estabilidad a 60°C, de hecho no hay diferencias significativas entre las tres. La CPO libre ha mostrado que a temperaturas mayores a 50°C se inactiva, es por esto importante que se puedan construir biocatalizadores que sean estables a temperaturas mayores a 50°C.

El tiempo de vida media de la CPO-Q almacenada en refrigeración es de 55 días, lo que es mucho menor comparado con la enzima libre que puede estar por lo menos un año en refrigeración y mantiene su actividad. Sin embargo, este dato es importante para efectos de estudios posteriores tener en cuenta la estabilidad del bioconjugado para realizar los respectivos análisis. Por otro lado, sería importante evaluar su estabilidad cuando se almacena en congelación, ya que en este estudio esa evaluación no se hizo.

La CPO-Q logró mantener una actividad residual del 63% tras una hora y media de incubación en el sistema ternario que contenía 15.8% de hexano, 65.3% Isopropanol y 18.9% de agua, comparado con la CPO libre la cual mantuvo una actividad residual del 45%. Esto podría sugerir que para estas condiciones la modificación con quitosano si ejerce una función de mayor protección para la enzima en solventes orgánicos

## 8. PERSPECTIVAS

Debido a la dificultad que se presenta para inmovilizar la CPO la cual es una proteína de interés para uso a nivel industrial, se hace necesario seguir explorando estrategias que permitan mantener la enzima catalíticamente activa una vez ha sido inmovilizada. Una alternativa es poder manipular ciertos grupos reactivos de la superficie de la proteína que permita una orientación correcta en la inmovilización.

Una herramienta importante sería la ingeniería genética de la proteína, y previo a eso poder lograr su expresión para así modificar residuos que permitan mejorar la estabilidad de la enzima.

Dentro de la ingeniería química de proteínas sigue siendo de interés explorar el uso de polímeros tanto naturales como sintéticos que le confieran propiedades interesantes a la proteína para su uso en medios no convencionales.

El uso de sistemas ternarios de solventes orgánicos, en los cuales se mantenga la enzima catalíticamente activa hace que sea un campo en el que se debe seguir trabajando para mejorar la tasa de reacción y además en un futuro poder llevar a cabo su aplicación a nivel industrial, como en el caso de refinamiento de combustibles.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Vazquez-Duhalt, R., et al., Will Biochemical Catalysis Impact the petroleum refining industry? *Energy & Fuels*, 2002. **16**: p. 1239-1250.
2. A, S. and A. M, Acid rain and its ecological consequences. *Journal of Environmental Biology/ Academy of Environmental Biology*. India, 2008. **29**(1): p. 15-24.
3. Speight, J.G., Refining Heavy Feedstocks, in *The chemistry and technology of petroleum*, H. Heinemann, Editor. 1999, Marcel Dekker, Inc. p. 641-678.
4. Soleimani, M., A. Bassi, and A. Margaritis, Biodesulfurization of refractory organic sulfur compounds in fossil fuels. *Biotechnology advances*, 2007. **25**: p. 570 - 596.
5. Mohebbi, G. and A.S. Ball, Biocatalytic desulfurization (BDS) of petrodiesel fuels. *Microbiology*, 2008. **154**(8): p. 2169-2183.
6. Il, J.J.K. and S.L. Borgne, Petroleum biorefining: the selective removal of sulfur, nitrogen, and metals, in *Petroleum Biotechnology: Developments and perspectives*, R. Vazquez-Duhalt and R. Quintero-Ramirez, Editors. 2004, Elsevier. p. 29-65.
7. Vazquez-Duhalt, R. and M. Ayala, Enzymatic catalysis on petroleum products. In *Petroleum biotechnology Developments and perspectives*. Rafael Vazquez-Duhalt Rodolfo Quintero-Ramirez ed. *Studies in surface science and catalysis*, ed. G. Centi. Vol. 151. 2004, Amsterdam: Elsevier.
8. Ayala, M., et al., Biocatalytic oxidation of fuel as an alternative to biodesulfurization. *Fuel processing technology*, 1998. **57**: p. 101-111.
9. Ogino, H. and H. Ishikawa, Enzymes which are stable in the presence of organic solvents. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001. **91**(2): p. 109-116.
10. Castro, G.R. and T. Knubovets, Homogeneous biocatalysis in organic solvents and water-organic mixtures. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2003. **23**(3): p. 195-231.

11. Torres, E., R. Tinoco, and R. Vazquez-Duhalt, Biocatalytic oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons in media containing organic solvents. *Water Science and Technology*, 1997. **36**(10): p. 37-44.
12. Vazquez-Duhalt, R., et al., Enzymatic oxidation process for desulfurization of fossil fuels. 2002, Instituto Mexicano del Petroleo, México (MX) Universidad Nacional Autónoma de México, México (MX).
13. Manoj, K.M. and L.P. Hager, Chloroperoxidase, a Janus Enzyme. *Biochemistry*, 2007. **47**: p. 2997-3003.
14. Topcular, C. and H. Ayhan, Immobilisation of horseradish peroxidase onto monodisperse poly (glycidyl methacrylate) microspheres. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2007. **18**(5): p. 595-607.
15. Kühnel, K., et al., Crystal structures of chloroperoxidase with its bound substrates and complexed with formate, acetate and nitrate *The journal of Biological Chemistry*, 2006: p. 1-16.
16. Veitch, N.C., Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* 2004. **65**: p. 249-259.
17. R.Doerge, D., Oxygenation of organosulfur compounds by peroxidases: Evidence of an electron transfer mechanism for lactoperoxidase. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1986. **244**(2): p. 678-685.
18. Alvarez, J.C. and P.R.O.d. Montellano, Thianthrene 5 oxide as a probe of electrophilicity of hemoprotein oxidizing species. *Biochemistry*, 1992. **31**: p. 8315-8322.
19. Vazquez-Duhalt, R., Cytochrome c as a biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1999. **7**: p. 241-249.
20. Krajewska, B., Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004. **35**: p. 126-139.
21. Roy, I., S. Sharma, and M.N. Gupta, Smart biocatalyst: Design and Applications. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2004. **86**: p. 159-189.

22. Sheldon, R.A., Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2007. **349**: p. 1289-1307.
23. Adriano, W.S., et al., Improving the properties of chitosan as support for the covalent multipoint immobilization of chymotrypsin. *Biomacromolecules*, 2008. **9**: p. 2170-2179.
24. Vazquez-Duhalt, R., et al., Enzyme conjugation to the polysaccharide chitosan: Smart biocatalyst and biocatalytic hydrogels. *Bioconjugate Chemistry*, 2001. **12**: p. 301-306.
25. Mateo, C., et al., Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000. **26**: p. 509-515.
26. Pickard, M.A., T.A. Kadima, and R.D. Carmichael, Chloroperoxidase, a peroxidase with potential. *Journal of Industrial Microbiology*, 1991. **7**: p. 235-242.
27. Hou, X., et al., Covalent immobilization of glucose oxidase onto poly (styrene-co-glycidyl methacrylate) monodisperse fluorescent microspheres synthesized by dispersion polymerization. *Analytical Biochemistry* 2007. **368**: p. 100-110.
28. Wang, D., et al., Controllable biotinylated poly (ethylene-co-glycidyl methacrylate) (PE-co-GMA) nanofibers to bind streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) for potential biosensor applications. *European Polymer Journal*, 2008. **44**: p. 2032-2039.
29. Petro, M., F. Svec, and J.M.J. Fréchet, Immobilization of trypsin onto "molded" macroporous Poly (glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) Rods and use of the conjugates as bioreactors and for affinity chromatography. *Biotechnology and bioengineering*, 1996. **49**: p. 355-363.
30. Isgrove, F.H., et al., Enzyme immobilization on nylon-optimization and the steps used to prevent enzyme leakage from the support. *Enzyme and Microbial Technology*, 2001. **28**: p. 225-232.
31. Morris, D.R. and L.P. Hager, Chloroperoxidase I. Isolation and properties of the crystalline glycoprotein. *The journal of Biological Chemistry*, 1966. **241**(8): p. 1763-1768.

32. Margoliash, E. and N. Frohwirt, Spectrum of horse heart cytochrome c. *Biochemical Journal*, 1959. **71**(3): p. 570-572.
33. Dunford, H.B., Model peroxidases from yeast and horseradish, cloned enzymes, and comparison to metmyoglobin, in *Heme peroxidases*, Dunford, Editor. 1999, WILEY-VCH: Edmonton, Alberta, Canadá.
34. Griffin, B.W. and P.L. Ashley, Evidence for a radical mechanism of halogenation of monochlorodimedone catalyzed by chloroperoxidase. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1984. **233**(1): p. 188-196.
35. Samokyszyn, V.M. and P.R.O.d. Montellano, Topology of the chloroperoxidase active site: regiospecificity of heme modification by phenylhydrazine and sodium azide. *Biochemistry*, 1991. **30**: p. 11646-11653.
36. Valderrama, B., et al., Oxidative stabilization of iso-1-cytochrome c by redox-inspired protein engineering. *The FASEB Journal*, 2006. **20**: p. E1-E10.
37. Tzialla, A.A., et al., Enhanced catalytic performance and stability of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* in surfactant free ternary water-organic solvent systems. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2007. **51**: p. 24-35.
38. García-Arellano, H., E.B. González, and R.V. Duhalt, Biocatalytic Transformation of Porphyrins by Chemically Modified Cytochrome C. *Biotechnology and bioengineering*, 2004. **85**(7): p. 790-798.
39. Ariane Proteau, R.S., Mirosław Cygler, *Current Protocols in Protein Science, in Application of Dynamic Light Scattering*. 2010, Wiley.
40. Petri, A., T. Gambicorti, and P. Salvadori, Covalent immobilization of chloroperoxidase on silica gel and properties of the immobilized biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2004. **27**: p. 103-106.
41. Wong, S.S., *Chemistry of protein conjugation and cross-linking*. 1993, CRC PRESS. p. 39-40.

42. Chen, B., et al., Protein immobilization on Epoxy-Activated thin polymer films: Effect of surface wettability and enzyme loading. *Langmuir*, 2008. **24**(23): p. 13457-13464.
43. Dominguez, G.M.M., Modificación Hidrofóbica de conjugados biocatalíticos basados en quitosano, in Instituto de Biotecnología. 2003, Universidad Nacional Autónoma de México: Cuernavaca. p. 68.
44. Zollner, H., Handbook of Enzyme Inhibitors. Helmward Zollner ed. 1993: WILEY-VCH.
45. Corporation, S. New Pegylation technology. 2001-2005 [cited 2010 Mayo de 2010]; Available from: [http://www.sunbio.com/english/information/simple\\_view.asp?idx=16](http://www.sunbio.com/english/information/simple_view.asp?idx=16).
46. Du, J. and Y.-L. Hsieh, PEGylation of chitosan for improved solubility and fiber formation via electrospinning. *Cellulose*, 2007.
47. Jin-Byung Park, D.S.C., Deactivation Mechanisms of Chloroperoxidase During Biotransformations. *Biotechnology and Bioengineering.*, 2006. **93**(6): p. 1190-1195.
48. Tinoco, R. and R. Vazquez-Duhalt, Chemical modification of Cytochrome C improves their catalytic properties in oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Enzyme and Microbial Technology*, 1998. **22**: p. 8-12.
49. Vazquez-Duhalt, R., D.W.S. Westlake, and P.M. Fedorak, Cytochrome c as a biocatalyst for the oxidation of thiophenes and organosulfides. *Enzyme and Microbial Technology*, 1993. **15**: p. 494-499.
50. Ayala, M., et al., Substrate Specificity and Ionization Potential in Chloroperoxidase-Catalyzed Oxidation of Diesel Fuel. *Environmental Science Technology*, 2000. **34**: p. 2804-2809.
51. Abolghasem Jouyban, S.S., Hak Kim Chan, A simple relationship between dielectric constant of mixed solvents with solvent composition and temperature. *International journal of pharmaceutics*, 2004. **269**: p. 353-360.
52. Peiming Wang, A.A., Computation of dielectric constants of solvent mixtures and electrolyte solutions. *Fluid Phase Equilibria*, 2001. **186**: p. 103-122.

53. Inada, Y., et al., Application of polyethylene glycol-modified enzymes in biotechnological processes: organic solvents soluble enzymes. TIBTECH, 1986. **4**(7): p. 190-194.

54. Pickard, M.A. and A. Hashimoto, Stability and carbohydrate composition of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* in a fructose-salts medium. Canadian Journal Microbiology, 1988. **34**: p. 998-1002.