



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Inmovilización enzimática de lacasa de *Trametes versicolor* utilizando diversas técnicas de inmovilización para la producción de poli-(ácido gálico).

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

DIEGO GERMÁN GARDUÑO TRONCOSO



Ciudad de México, CD. MX. 2016



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.

Jurado asignado

Presidente: Oscar Hernández Meléndez

Vocal: Carmina Montiel Pacheco

Secretario: María del Carmen Ortiz Tafoya

1er suplente: Carlos Alberto Jiménez García

2do suplente: Miquel Gimeno Seco

Lugar donde se realizó la tesis:

LABORATORIO 314, CONJUNTO E, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

Asesor de tesis

Dra. Carmina Montiel Pacheco

Supervisor técnico

Dr. Miquel Gimeno Seco

Sustentante

Diego Germán Garduño Troncoso

Agradecimientos

A la Facultad de Química por el presupuesto PAIP 5000-9153 y al proyecto CONACyT 1670507 que permitieron el financiamiento de este proyecto y brindaron todas las facilidades para la adquisición de reactivos y determinaciones experimentales que fueron desarrolladas a lo largo de la estancia en el laboratorio 314.

ÍNDICE.

1. Antecedentes	14
1.1 Oxidoreductasas.....	14
1.2 Oxidoreductasas que actúan con compuestos fenólicos como reductores.	15
1.3 Cuproproteínas. (EC 1.10.9).....	15
1.4 Mecanismo catalítico de la lacasa de <i>T. versicolor</i>	19
1.5 Aplicaciones de la lacasa de <i>T. versicolor</i> (LTV).	20
1.6 Ácido gálico (AG).....	23
1.7 Polimerización oxidativa catalizada por enzimas.....	24
1.7.1 PGAL.....	25
1.8 Inmovilización enzimática.....	26
1.8.1 Inmovilización con copolímero PVA.PEG.....	30
1.8.2 Inmovilización en tetrametilortosilicato (TMS)/ (PTMS)	30
2. Justificación	34
3. Hipótesis	34
4. Objetivos	34
4.1 Objetivo general	34
4.2 Objetivos particulares.....	34
5. Materiales y Métodos	36
5.1 Materiales.....	36
5.2 Métodos.....	36
5.2.1 Etapa 1 Inmovilización de la lacasa de <i>T. versicolor</i>	36
5.2.1.1 Actividad enzimática de la enzima libre.....	36
5.2.1.2 Inmovilización por atrapamiento con un copolímero PVA-PEG.....	37
5.2.1.3 Inmovilización por adsorción.	37
5.2.1.4 Inmovilización en tetrametilortosilicato (TMS)/ politetrametilortosilicato (PTMS) por una técnica de sol-gel.	38
5.2.1.5 Actividad enzimática cualitativa de los inmovilizados	38
5.2.1.6 Cuantificación de proteína	38
5.2.1.7 Actividad enzimática de los inmovilizados.	39
5.2.1.8 Estabilidad de los inmovilizados a la agitación.....	39
5.2.1.9 Termoestabilidad de la enzima inmovilizada.	39

5.2.2.0	Termoactividad de la enzima inmovilizada.....	40
5.2.2.1	Medición de la actividad enzimática a diferentes pH's.....	40
5.2.2.2	Estabilidad operativa de LTV inmovilizada.....	40
5.2.2.3	Estabilidad de la enzima inmovilizada con el tiempo.	41
5.3.1	Etapa 2 Síntesis enzimática del poli-(ácido gálico) (PGAL).	41
5.3.1.1	Síntesis de PGAL con LTV inmovilizada.	41
5.3.1.2	Síntesis de PGAL con LTV libre.	41
5.4.1	Etapa 3 Caracterización del PGAL sintetizado enzimáticamente.	42
5.4.1.1	Determinación de peso molecular.....	42
5.4.1.2	Caracterización de los productos de reacción.	42
5.4.1.3	Medición de la conductividad.....	42
6.	Resultados y Discusión	43
6.1	Etapa 1	43
6.1.1.1	Inmovilización de la lacasa de <i>Trametes versicolor</i>	43
6.1.1.2	Cuantificación de proteína y % de inmovilización.	44
6.1.1.3	Actividad enzimática cualitativa de los inmovilizados	45
6.1.1.4	Actividad enzimática de los inmovilizados y de la enzima libre.	46
6.1.1.5	Estabilidad de los inmovilizados a la agitación.....	48
6.1.1.6	Termoestabilidad de la enzima inmovilizada.	50
6.1.1.7	Termoactividad de la enzima inmovilizada.....	52
6.1.1.8	Actividad enzimática a diferentes pH's	53
6.1.1.9	Estabilidad operativa de LTV inmovilizada.....	55
6.1.2.0	Estabilidad de la enzima inmovilizada con el tiempo.	57
6.2.	Etapa 2 Síntesis enzimática del PGAL	58
6.2.1	Rendimientos de reacción.....	58
6.2.2	Caracterización de los productos de reacción.	60
6.2.2.1	Espectroscopía de infrarrojo (FTIR).....	60
6.2.2.2	Resonancia magnética nuclear de protón (RMN- ¹ H).....	63
6.2.2.3	Peso molecular.....	72
6.2.2.4	Conductividad.....	74
7.	Conclusiones	76
8.	Perspectivas	77

9. Anexos	78
9.1 Anexo 1 Curva patrón ASB	78
9.2 Anexo 2 Análisis estadístico de las evaluaciones realizadas	79
9.3 Anexo 3 Cálculos de la medición de actividad	80
9.4 Anexo 4 Ecuación modificada de Michaelis-Menten	81
10. Bibliografía	82

Índice de figuras

Figura 1 Estructura cristalográfica de la CPS.....	16
Figura 2 Estructura cristalográfica de la AO.....	16
Figura 3 Sitio catalítico de la lacasa de <i>Bacillus subtilis</i>	17
Figura 4 Estructura cristalográfica de la LTV.....	19
Figura 5 Esquema de catálisis de la LTV.....	20
Figura 6 Estructura del colorante índigo.....	21
Figura 7 Estructuras de la morfina y la codeína.....	22
Figura 8 Esquema de reacción de biotransformación de un contaminante por una lacasa.....	22
Figura 9 Estructura del ácido gálico.....	23
Figura 10 Estructura condensada de la Lignina.....	25
Figura 11 Esquema de reacción de la síntesis del PGAL.....	25
Figura 12 Quitosano funcionalizado.....	26
Figura 13 Técnicas de inmovilización enzimática.....	27
Figura 14 Estructura del copolímero PVA-PEG.....	30
Figura 15 Estructura del TMS.....	31
Figura 16 Esquema de síntesis del soporte con un precursor de tipo alcóxido.....	32
Figura 17 Aplicaciones de la técnica sol-gel.....	33
Figura 18 LTV inmovilizada en un copolímero PVA-PEG.....	43
Figura 19 LTV inmovilizada usando una técnica de sol-gel con PTMS.....	44
Figura 20 Reacción de la LTV con el ABTS.....	45
Figura 21 Efecto de la temperatura en la estabilidad enzimática.....	50
Figura 22 Efecto de la temperatura en la actividad enzimática.....	53
Figura 23 Efecto de la variación de pH en la actividad enzimática de la enzima libre y los inmovilizados.....	54
Figura 24 Ciclos de reuso para los inmovilizados utilizando un copolímero PVA-PEG, PTMS y Sílica.....	56
Figura 25 Actividad enzimática en función del tiempo para los diferentes inmovilizados.....	58
Figura 26 Comparación de los FTIR's de los diversos productos de reacción.....	61
Figura 27 FTIR del polímero de AG.....	62

Figura 28 RMN- ¹ H del AG.....	65
Figura 29 RMN- ¹ H del PGAL sintetizado con LTV libre.....	68
Figura 30 RMN- ¹ H del PGAL sintetizado con LTV inmovilizada en PVA-PEG	69
Figura 31 RMN- ¹ H del PGAL sintetizado con LTV inmovilizada en PTMS.....	70
Figura 32 RMN- ¹ H del PGAL sintetizado con LTV inmovilizada en silica-gel	71
Figura 33 Curva patrón de ASB	78

Índice de tablas y ecuaciones

Tabla 1 Subclases de oxidoreductasas.....	14
Tabla 2 Técnicas de inmovilización enzimática.....	28
Tabla 3 Cantidad de proteína residual en los lavados y % inmovilización.	45
Tabla 4 Comparación de la actividad enzimática	47
Tabla 5 Estabilidad de los soportes de inmovilización de enzimas a la agitación ...	49
Tabla 6 Rendimientos de la producción de PGAL.	59
Tabla 7 Pesos moleculares de los diferentes PGAL sintetizados	72
Tabla 8 Conductividades de los diferentes PGAL sintetizados enzimáticamente ...	74
Tabla 9 Resultados del análisis estadístico	79
Tabla 10 Diferencias de las medias aritméticas de los diferentes Mn	80
Tabla 11 Diferencias de las medias aritméticas de los diferentes Mw	80
Tabla 12 Diferencias de las medias aritméticas de los diferentes PDI.....	80
Ecuación 1 Ecuación para el cálculo de actividad enzimática de la enzima libre....	80
Ecuación 2 Ecuación para el cálculo de actividad enzimática de la enzima inmovilizada.....	80

INDICE DE ABREVIATURAS

- **ABTS:** 2,2'-azino-bis (3-etilenbenzotiazolin-6-sulfónico).
- **AG:** ácido gálico.
- **AO:** Ascorbato oxidasa.
- **Ar:** Arilo
- **ATR:** reflectancia total atenuada
- **ASB:** albumina sérica bovina
- **CCF:** cromatografía en capa fina
- **CPS:** Ceruloplasmina
- **D₂O:** agua deuterada
- **FTIR:** espectroscopia de infrarrojo.
- **GPC:** cromatografía de permeación en gel.
- **HSD:** error honestamente significativo
- **H₀:** Hipótesis nula
- **H₁:** Hipótesis alterna
- **kDa:** kilodaltones
- **L:** litro
- **LTV:** Lacasa de *Trametes versicolor*
- **m:** metro
- **M:** molar
- **mg:** miligramo
- **mL:** mililitro
- **mM:** milimolar
- **Mn:** peso promedio en número
- **Mse:** cuadrado del error medio
- **Mw:** peso promedio en peso
- **nm:** nanómetro
- **P.M.:** peso molecular
- **PDI:** índice de polidispersidad
- **PEG:** polietilenglicol

- **PGAL:** poli-(ácido gálico)
- **PTMS:** politetrametilortosilicato
- **PVA:** Alcohol polivinílico.
- **PVP:** polivinilpirrolidona
- **RMN-¹H:** resonancia magnética nuclear de protón
- **S:** siemens
- **TMS:** Tetrametil orto silicato
- **μL:** microlitro.
- **μm:** micrómetro

RESUMEN

Las oxidoreductasas tienen un gran potencial en campos como la bioremediación, eliminación de contaminantes ambientales, de compuestos tóxicos y procesamiento de hidrocarburos aromáticos policíclicos; también tienen aplicación en el área de alimentos y farmacia ya sea en la estabilización de jugos y vinos, mejoradores del sabor de aceites vegetales, remoción del exceso de oxígeno de la cerveza, como biosensor en la medición de fenoles y catecoles, síntesis de compuestos medicinales complejos, resolución de mezclas codeína/morfina, purificación de agua y antídoto contra hiedra venenosa; por mencionar solo algunas. La lacasa es oxidoreductasa proveniente de hongos saprófitos como *Trametes versicolor*, posee 4 átomos de cobre en su centro catalítico lo que permite llevar a cabo oxidaciones y reducciones utilizando varios sustratos entre los cuales destaca el guayacol, la hidroquinona, y el ácido 2,2'-azino-bis(3-etilenbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), además de la oxidación de dichos sustratos puede utilizar al oxígeno molecular como sustrato con una concomitante reducción a agua; dicha propiedad le brinda la capacidad de llevar a cabo reacciones de polimerización, por ejemplo la del poli-(ácido gálico) (PGAL) a partir de su monómero, el ácido gálico. Este compuesto por su estructura fenólica tiene la capacidad de actuar como antioxidante y antimicrobiano, pero su solubilidad acuosa es reducida (1.1 g/100 mL), por lo que el PGAL se sintetizó usando la lacasa libre cuya solubilidad acuosa se vio aumentada con la finalidad de explotar sus actividades biológicas. En este trabajo, se llevó a cabo la inmovilización de la lacasa en un espacio físico determinado utilizando diversas técnicas de inmovilización. La enzima inmovilizada se caracterizó en función de la actividad enzimática a diferente pH y temperaturas, de igual manera se determinó la estabilidad operativa de estos inmovilizados para determinar si el biocatalizador se pudo o no recuperar posterior a la reacción.

Finalmente se llevó a cabo la síntesis de PGAL con la enzima inmovilizada, los productos de reacción se caracterizaron por técnicas instrumentales como espectroscopia de infrarrojo, resonancia magnética nuclear de protón, cromatografía de permeación en gel y análisis de conductividad del producto; todo para postular una posible estructura del polímero.

INTRODUCCIÓN

La lacasa es una enzima que fue descubierta por Yoshida en el año de 1883 (Yoshida, 1883) y caracterizada por Bertrand en el año de 1896 (Bertrand, 1896), recibe el nombre de p-difenol; dioxigenoreductasa (EC 1.10.3.2), esta enzima es expresada por varios organismos que a su vez tienen diversas isoenzimas, es una enzima oligomérica que forma varios complejos multiméricos. El tamaño de las lacasas varía de especie a especie, pero el tamaño de cada monómero oscila alrededor de los 50 a 100 kDa teniendo en su estructura aproximadamente de 520 a 550 residuos de aminoácidos. La lacasa es una glicoproteína cuya proporción de azúcares anclados al exterior de esta varían, pero se calcula que aproximadamente de un 10-45% de la lacasa se encuentra glicosilada (Mayer & Staples, 2002)

En la actualidad la mayor producción de lacasa proviene de hongos como lo es *T. versicolor*, un basidiomiceto perteneciente a la clase de los agaricomycetos, subclase agaricomycetidae, del orden poliesporales, este hongo saprófito utiliza a la lacasa en conjunto con otras enzimas como enzima deslignificante e in vitro se ha encontrado que también tienen la capacidad de condensar monolignoles como el coniferil alcohol y el ácido gálico compuestos derivados de la ruta bioquímica del ácido siquímico. El ácido gálico (AG) tiene propiedades antimicrobianas, antioxidantes y presenta actividad citotóxica contra células cancerosas (Beniwal, Chhokar, Singh &, Sharma, 2010). Además de estas actividades se ha encontrado que las polimerizaciones oxidativas de fenoles realizadas por oxidoreductasas producen polímeros con propiedades electro-ópticas y semiconductores (López et al., 2013). Dichas aplicaciones plantean la necesidad de poder sintetizar estos polímeros enzimáticamente con la capacidad de recuperar el catalizador utilizando enzimas inmovilizadas. La inmovilización enzimática es el confinamiento de una enzima en un espacio físico determinado; las técnicas para inmovilizar enzimas pueden ser: a.) unión de la enzima al soporte con simples interacciones electrostáticas, con la desventaja que la enzima puede desorberse. b.) formación de enlaces covalentes entre el soporte y residuos de aminoácidos encontrados al exterior de la enzima, esta técnica presenta el inconveniente que puede causar la alteración de la conformación de la enzima alterando su actividad y c.) el atrapamiento de la enzima en una red polimérica porosa que evita que esta tenga

contacto directo con el medio de reacción permitiendo la conservación de su configuración, generando biocatalizadores más elásticos y resistentes con mejor capacidad de recuperación. Se espera que al utilizar y caracterizar los diferentes inmovilizados de la lacasa de *T. versicolor* (LTV), se podrá obtener un biocatalizador de mayor estabilidad que conserve su actividad catalítica, con la posibilidad de poder ser reutilizado, y así ser usado en diferentes procesos como la síntesis de biopolímeros y oxidación de diferentes sustratos, y también de esta manera poder caracterizar los productos de reacción de manera más sencilla sin la presencia de la enzima.

1. Antecedentes

1.1 Oxidoreductasas

Las reacciones de oxidoreducción son el motor para la obtención de energía de una gran cantidad de organismos que partiendo de un sustrato oxidable obtienen los esqueletos carbonados para la construcción de estructuras celulares o la síntesis de moléculas de alta energía que impulsen otros procesos celulares (Nilsson, et al., 1983).

En dichas rutas están involucradas diversas enzimas, entre ellas las oxidoreductasas que catalizan la transferencia de electrones del sustrato a un aceptor o viceversa; existen varias subclases de oxidoreductasas que se presentan en la tabla 1.

Tabla 1 Subclases de oxidoreductasas.

Grupos involucrados en la oxidoreducción	Ejemplos
Actúan con grupos difenólicos o compuestos relacionados como donadores.	Lacasa, Cresolasa.
Peroxidasas.	Catalasa, mieloperoxidasa.
Actúan con hidrógeno	Hidrogenasa
Actúan con un donante y con la incorporación de oxígeno molecular.	5-lipoxygenasa, luciferasa.
Actúan con dos donantes o con la reducción de oxígeno molecular.	Óxido nítrico sintasa, tirosina 3-monooxygenasa.
Actúan con superóxido como aceptor.	Superóxido dismutasa, superóxido-superóxido. oxidoreductasa
Actúan oxidando iones metálicos.	Ceruloplasmina, Mercurio (II) reductasa.

Fuente: Enzyme Nomenclature: Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/> Consultado 21 de Septiembre de 2016.

Las reacciones de oxido-reducción catalizadas por enzimas al igual que las inorgánicas cuentan con una especie que es oxidada (donadora de electrones) y una especie que es reducida (aceptora de electrones). Como se ejemplifica en la tabla 1 hay una gran cantidad de especies involucradas en la oxido-reducción de

los sustratos de la enzima, sin embargo hay algunos otros aceptores, por ejemplo el oxígeno molecular, el NAD, NADP, quinonas, disulfuros, citocromos y algunos otros.

1.2 Oxidoreductasas que actúan con compuestos fenólicos como reductores

Las oxidoreductasas de este tipo utilizan como donador a una molécula de tipo catecólico o algunos otros congéneres de tipo polifenólico. Estas enzimas están involucradas en diversos procesos como la fotosíntesis, la fosforilación oxidativa, la homeostasis de cationes metálicos, el catabolismo de nutrientes y la detoxificación de compuestos altamente tóxicos (Cárdenas & Dankert, 2000).

Además de dichas funciones se les ha relacionado con el oscurecimiento indeseado de muchas frutas y vegetales como la papa, la manzana, el plátano y la pera entre otros por acción de diferentes enzimas entre las cuales se encuentran la polifenoloxidasas, la catecolasa, la cresolasa, la tirosinasa, la polifenolasa, la monofenol monoxigenasa entre otras más, sobre sus sustratos presentes en frutas o vegetales (Zambrano, Cruz, Victoria, & Almazán, 1994).

1.3 Cuproproteínas. (EC 1.10.9)

Las cuproproteínas son oxidoreductasas que contienen átomos de cobre en su centro catalítico al igual que las enzimas mencionadas con anterioridad utilizan como especie donadora de electrones compuestos aromáticos de varias clases (Solomon, Sundaram, & Machonkin, 1996). El átomo de cobre es clave en la catálisis REDOX. Los átomos de cobre ubicados en las cuproproteínas pueden ser subclasificados según sus características espectroscópicas; dichas características indican la geometría y la estructura electrónica del sitio activo de la enzima en cuestión; la espectroscopia del ion cúprico (Ion cobre en estado de oxidación 2⁺) permite observar de manera clara la distribución de los átomos de cobre en el sitio activo (Holm, Kennepohl, & Solomon, 1996; Malkin & Malmstrom, 1970; Reinhammar, 1984).

Entre las enzimas que tienen átomos de cobre en su estructura destacan la lacasa de *T. versicolor* (LTV), la ceruloplasmina (CPS) y la ascorbato oxidasa (AO). En las figuras 1 y 2 se presenta las estructuras cristalográficas de la CPS y la AO

Tesis

conteniendo los iones cúpricos. Tanto la CPS como la AO cumplen roles importantes en los organismos que las expresan; la primera está íntimamente relacionada con el transporte de cobre en el organismo, la respuesta inmunitaria y el metabolismo de la adrenalina, serotonina y noradrenalina. Mientras que la función de la ascorbato oxidasa está relacionada con el metabolismo de la vitamina C o ácido ascórbico (Bento, Carrondo, & Lindley, 2006).

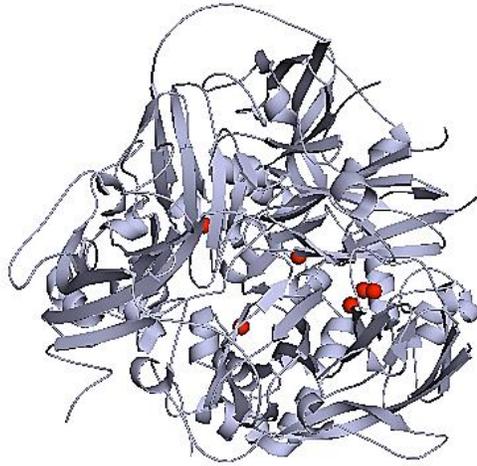


Figura 1 Estructura cristalográfica de la CPS. Tomada de PDB. COD. 4ENZ
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2J5W>.

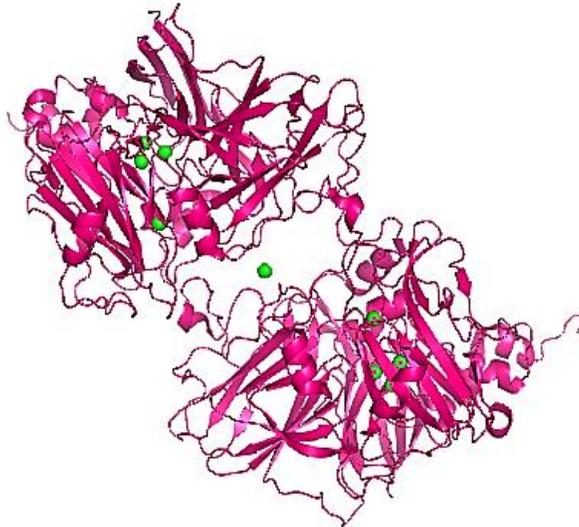


Figura 2 Estructura cristalográfica de la AO. Tomada de PDB (COD. 1ASQ)
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1ASQ>.

En la figura 3 se muestra que los átomos de cobre del sitio activo de la lacasa pueden ser de tipo 1 (T1) llamado cobre azul que se encuentran complejados con

residuos de histidina y serina mientras que los átomos de cobre tipo 2 (T2) se encuentran complejados igualmente con residuos de histidina y una molécula de agua, estos átomos de cobre son conocidos como cobres normales. Finalmente la última clase son los átomos de cobre tipo 3 (T3) que al igual que los otros átomos de cobre se encuentran complejados con residuos de histidina y son conocidos como centro de cobre binuclear.

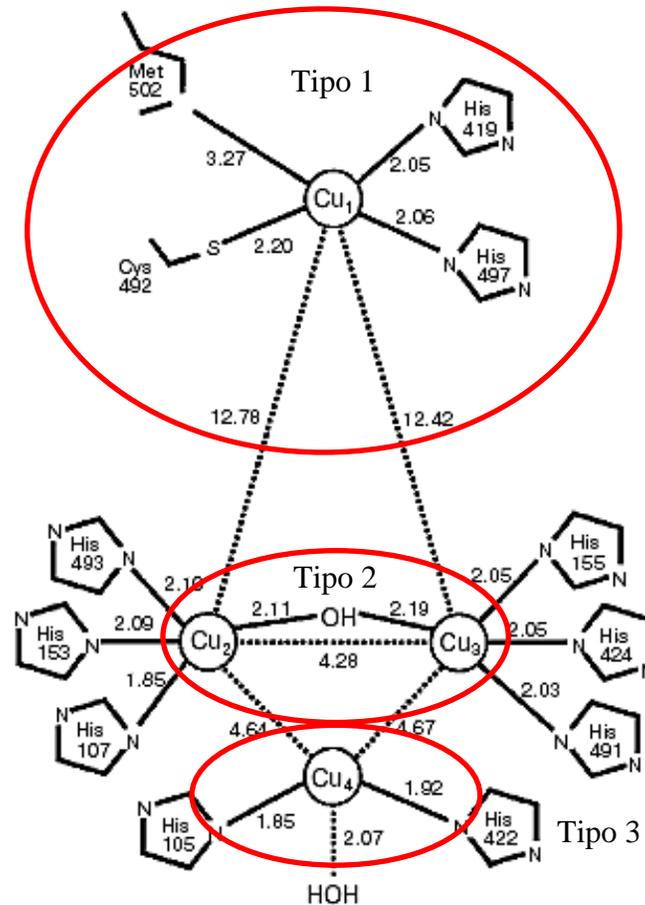


Figura 3 Sitio catalítico de la lacasa de *Bacillus subtilis*. Tomada de (Morozova, Shumakovich, Gorbacheva, Shleev, & Yaropolov, 2007)

1.3.1 Lacasa de *T. versicolor* (LTV)

La LTV es una lacasa que al igual que la CPS y la AO es una cuproproteína, fue descubierta en el año de 1883 por Yoshida y caracterizada por Bertrand en el año de 1896, recibe el nombre de p-difenol; dioxigenoreductasa (EC 1.10.3.2) ya que utiliza al oxígeno molecular como aceptor de electrones y sustancias fenólicas como donadores de electrones.

La LTV es una enzima oligomérica que forma varios complejos multiméricos. Su

tamaño es de 221.7 KDa teniendo en su estructura aproximadamente de 520 a 600 residuos de aminoácidos, la estructura cristalográfica de la LTV se presenta en la figura 4 mostrando los átomos de cobre en color rojo. El punto isoeléctrico varia oscilando entre valores de 4 y 7 dependiendo el organismo del cual provenga la lacasa, mientras que el pH óptimo varía entre 3 a 6, en su exterior se encuentran unidos covalentemente residuos de azúcares lo que la vuelven una glucoproteína, la proporción de azúcares anclados al exterior de la lacasa varía, pero se calcula que aproximadamente de un 10-45% de la LTV se encuentran glicosilada (Claus, 2003). Como ya se mencionó con anterioridad la LTV cuenta con un átomo de cobre T1 y un cluster trinuclear de cobre T2/T3.

La actividad enzimática de la LTV está sometida a muchos factores; entre los cuales figura el pH el cual es dependiente del sustrato utilizado, con ABTS se ha encontrado que el pH óptimo se encuentra en valores ácidos que van de 4 a 6, al encontrarse glicosilada la LTV presenta mayor estabilidad al aumentar la temperatura como es el caso de la lacasa de *T. modesta* la cual muestra actividad a los 50 °C (Kunamneni, Plou, Ballesteros, & Alcalde, 2008).

Al igual que otras proteínas con actividad enzimática, la actividad de la LTV se ve disminuida en presencia de ciertas sustancias como la azida de sodio, ácido tioglicólico, cianuro, tiocianato, hidróxidos, ácido kójico, EDTA, sales cuaternarias de amonio, ácidos grasos, hidroxilglicina, entre otros más. La inhibición de esta enzima ocurre por la unión del inhibidor a los átomos de cobre impidiendo que se lleve a cabo la transferencia de electrones (Madhavi & Lele, 2009). *T. versicolor* al igual que otros hongos que producen esta enzima la utilizan para la formación de pigmentos, igualmente está involucrada en la degradación de la lignina y en la detoxificación de compuestos peligrosos para la célula, morfogénesis del hongo (Clutterbuck, 1972; Thurston, 1994) y también como factor de virulencia (Hassett, Zak, Blackwood, & Pregitzer, 2009), por mencionar algunas.

La síntesis de la LTV se ve inducida por ciertos compuestos presentes en el ambiente del hongo, es el caso del ácido ferúlico y la 2,5-xilidina que inducen la producción de la lacasa ya que ambos son compuestos de tipo aromático.

Estudios adicionales han demostrado que la producción de la LTV en cultivos sumergidos se ve incrementada por la adición de alcohol veratrílico (alcohol 3,6-

dimetoxibencílico) ya que éste es uno de los monolignoles precursores de Lignina (Lee, Prashant, & Torget, 1999). Otro poderoso inductor en la producción de la lacasa es el ion cúprico ya que al encontrarse formando parte del sitio activo aumenta su producción estimulando la traducción de los genes que contienen en la información para la síntesis de la lacasa (Palmieri, Giardina, Bianco, Fontanella, & Sannia, 2000). *T. versicolor* incrementa la expresión de la proteína agregando algunas otras sustancias al medio de cultivo, estas sustancias son aminoácidos como L-histidina, L-valina, L-treonina, L-isoleucina, L- tirosina, L-metionina, L-serina, L-asparagina, L-lisina, L-ácido aspártico, L-triptófano y L-cisteína; el rol de la temperatura y el pH en la producción de la lacasa aún permanece incierto, pero se ha encontrado que el pH donde se obtiene una sobreproducción de lacasa está alrededor de 4 a 6 (Vasconcelos, Dekker, Barbosa, & Paccola-Meirelles, 2001) mientras que el intervalo de temperatura va desde 25°C hasta 30°C (Thurston, 1994).

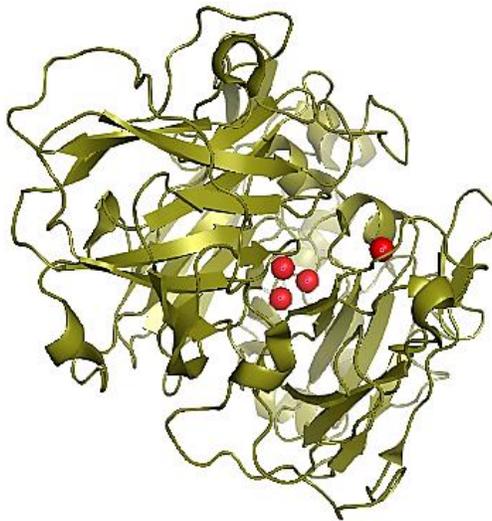


Figura 4 Estructura cristalográfica de la LTV. Tomada de PDB (COD 1GYC)
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1GYC>.

1.4 Mecanismo catalítico de la lacasa de *T. versicolor*

La LTV al tener unido en su centro catalítico átomos de cobre sigue un mecanismo catalítico relativamente diferente a algunas oxidoreductasas. Utiliza los 4 átomos de cobre para llevar los electrones desde un sustrato reducido al oxígeno molecular sin la generación de intermediarios de tipo peróxido. La LTV extrae un electrón de cada una de las 4 moléculas de sustrato que entran al sitio activo, esto ocurre en el

átomo de cobre tipo 1; estos electrones son conducidos al cluster trinuclear de cobre de tipo 2 y tipo 3 donde se lleva a cabo la reducción del oxígeno molecular a agua (Madhavi & Lele, 2009). La extracción de los electrones de las moléculas de sustrato trae consigo la formación de radicales libres, la formación de estos dentro de la enzima libre puede causar reacciones secundarias entre las cuales se encuentran la formación de quinonas, o la copulación de los radicales libres para la formación de dímeros; en el caso de sustratos sustituidos se puede generar una desmetilación o deshalogenación (Durán & Esposito, 2000). Además de esto se puede generar la degradación de polímeros de alta complejidad como los ácidos húmicos (Filip & Claus, 1995) rompiendo los enlaces covalentes que existen entre las moléculas de monómeros liberándolos. El esquema de reacción se presenta en la figura 5

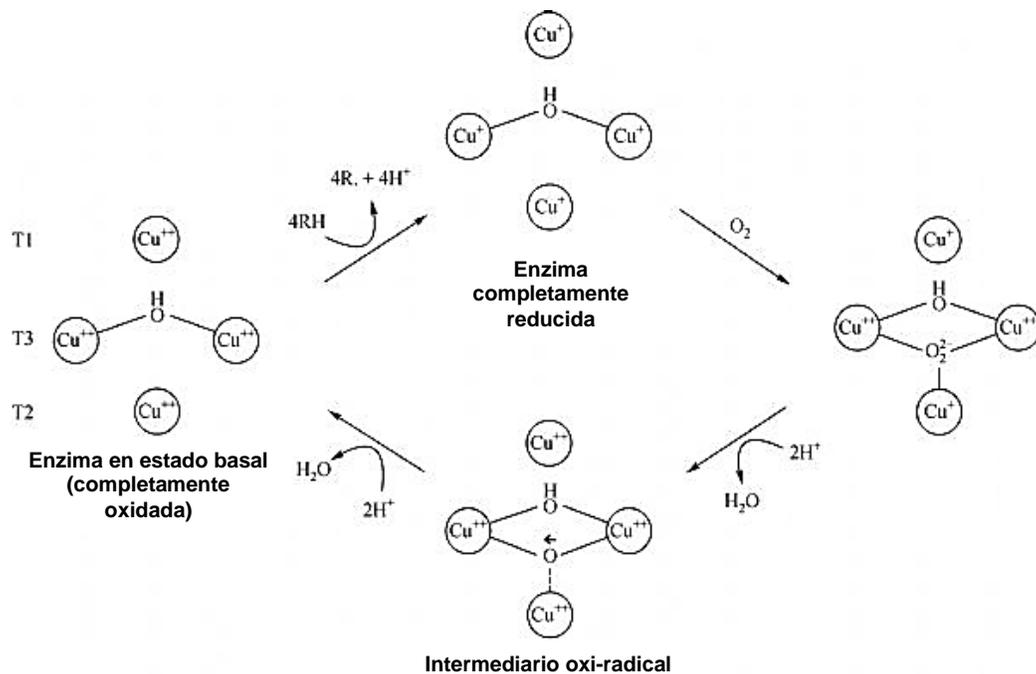


Figura 5 Esquema de catálisis de la LTV. Tomada de Furukawa, Bello, & Horsfall, 2014.

1.5 Aplicaciones de la lacasa de *T. versicolor* (LTV)

En la actualidad las enzimas tienen una gran aplicación industrial, este es el caso de la LTV que es empleada para diversos procesos enlistados a continuación. En la industria de alimentos se ha encontrado que la lacasa es capaz de eliminar fenoles del mosto del jugo de uva (Alto, 2000). Además permiten eliminar el O₂ no

deseado de algunos empaques para así aumentar la vida de anaquel de los productos (Satyanarayana, Prakash, & Johri, 2013) en la producción de etanol la LTV ha sido utilizada para incrementar la resistencia a los inhibidores fenólicos en los hidrolizados de lignocelulosa (Larsson, Cassland, & Jonsson, 2001). Resultados de investigación sugieren que el uso de la LTV en fermentaciones disminuye la concentración de inhibidores fenólicos permitiendo una mejora en la producción de etanol a partir de materiales lignocelulósicos.

También la LTV es utilizada para aumentar la blancura de materiales como el algodón (Wang et al., 2008). Otro uso potencial es en la producción de precursores de tintas como el índigo (colorante de tipo hidroxindólico) que se muestra en la figura 6.

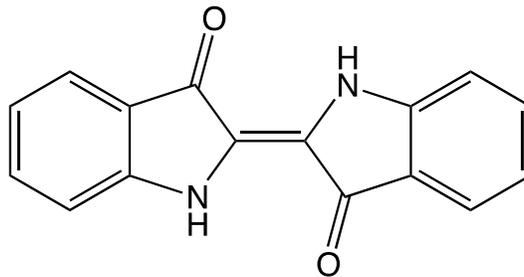


Figura 6 Estructura del colorante índigo

En la industria farmacéutica la LTV es utilizada como sensor en la resolución de mezclas de codeína y morfina ya que esta enzima es capaz de reconocer como sustrato a la morfina, pero no a la codeína cuya diferencia radica en un grupo metilo unido al oxígeno del anillo bencénico como se aprecia en la figura 7 (Bauer et al., 1999). No solo se ha encontrado que la LTV tiene aplicaciones como sensor si no que de igual manera puede utilizarse para la síntesis de compuestos medicinales de gran complejidad y difícil síntesis como lo son la vinblastina, mitomicina, dímeros de penicilina X, cefalosporinas, y dímeros de vindolina (Xu *et al.*, 2000; Stahl, Kissau, Mazitschek, Giannis, & Waldmann, 2002). De esta manera la LTV amplía su campo de aplicación a la síntesis orgánica.

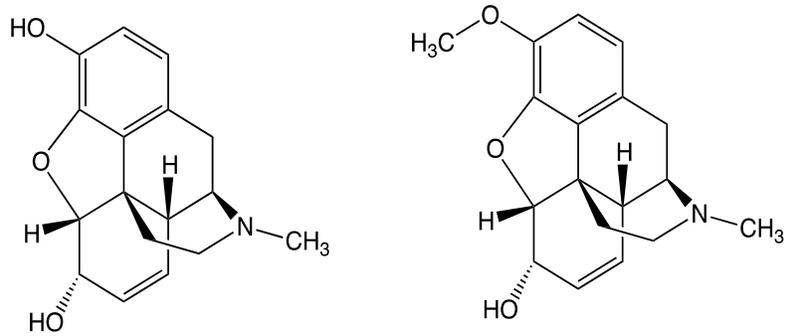


Figura 7 Estructuras de la morfina (izquierda) y la codeína (derecha).

Recientemente se han descubierto nuevos campos de aplicación de la LTV con el auge de la biotecnología. Se ha utilizado a la LTV como excipiente en la formulación de deodorizantes, pasta de dientes, detergentes, jabón, pañales y algunos productos dermatológicos. En la remoción de compuestos altamente recalcitrantes como lo son el triclorofenol, algunos alquenos, hidrocarburos aromáticos policíclicos siguiendo el esquema presentado en la figura 8, bisfenol A (presente en aguas residuales y que es un disruptor hormonal), además de remover de herbicidas como el isoxaflutol y su derivado dicetonitrilado (Mayer & Staples, 2002).

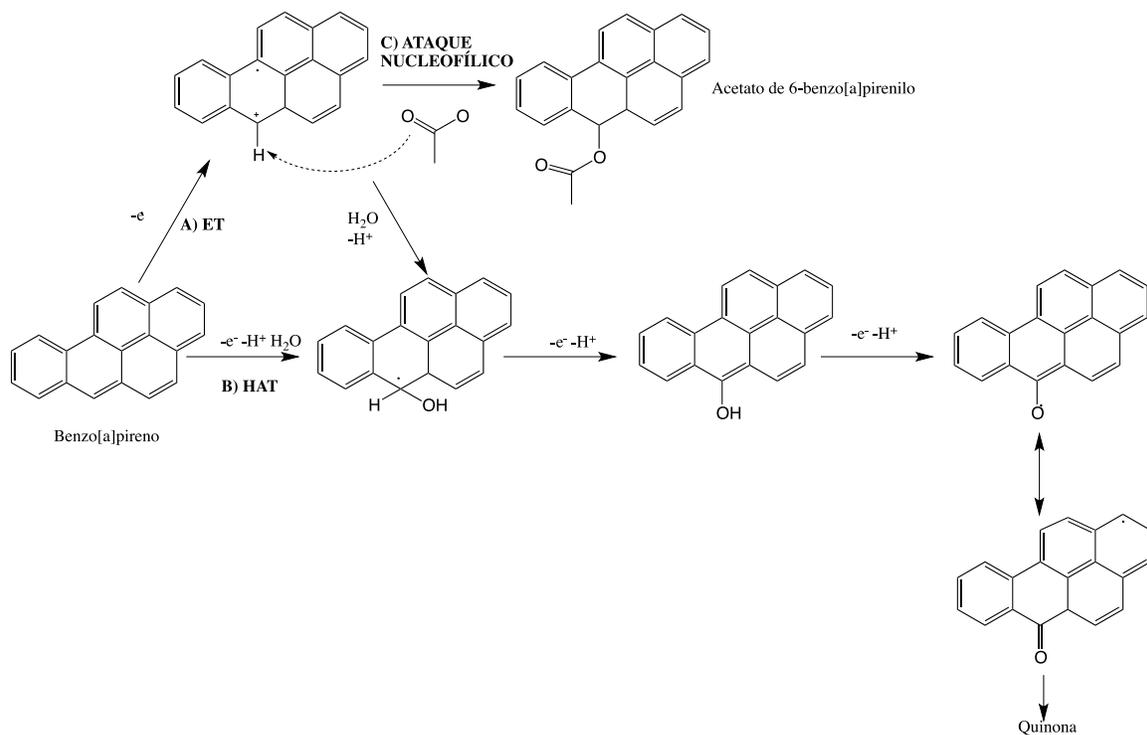


Figura 8 Esquema de reacción de biotransformación de un contaminante por una lacasa. Tomada de Cañas & Camarero, 2010.

De igual manera estudios paralelos evidenciaron la capacidad de degradar olefinas y poliuretano de algunas lacasas (Watanabe, Kawakami, Baba, Oshio, & Kimura, 2005).

Finalmente en la industria del papel la degradación de la lignina en la pulpa de los árboles se llevaba a cabo por un proceso químico utilizando ClO_2 y O_3 generando una gran cantidad de residuos es por ello que recientemente el uso de lacasas y de la LTV como pretratamiento provee un proceso más limpio y en condiciones más suaves de reacción que permite respetar la integridad de la celulosa (Gamelas, Tavares, Evtuguin, & Xavier, 2005).

Todas estas aplicaciones permiten que la LTV sea un biocatalizador muy diverso y de mucho interés aumentando la necesidad de poder reutilizarlo en diversos ciclos de reacción en cualquiera de las aplicaciones anteriormente discutidas. La reutilización enzimática requiere el uso de una tecnología que permita recuperar a la enzima después de llevar a cabo un ciclo de reacción, esta tecnología lleva por nombre inmovilización enzimática.

1.6 Ácido gálico (AG)

El ácido gálico (AG) es un compuesto orgánico igualmente conocido como ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico (figura 9), en la naturaleza se encuentra ampliamente distribuido en especies como el roble; este compuesto es sintetizado a partir de la ruta bioquímica del ácido siquímico teniendo como precursor al ácido cinámico. Se puede encontrar en forma de sales, en forma de ésteres o en forma de polímeros como los taninos.

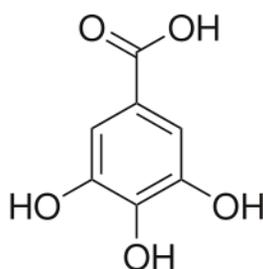


Figura 9 Estructura del ácido gálico

Al AG se le han atribuido diversas actividades biológicas benéficas entre las cuales figuran, actividad antiinflamatoria (Albini, Noonan, & Ferrari, 2007), actividad

antibacteriana (Suhrenbrock, Radtke, Knop, & Kleinebudde, 2011; Díaz, 2012) y actividad antioxidante (Osawa, Walsh, & Osawalt, 1993). Sin embargo, este compuesto presenta una solubilidad acuosa muy reducida (1.1 g/100 mL) impidiendo que sus actividades biológicas sean explotadas de una manera eficaz.

1.7 Polimerización oxidativa catalizada por enzimas

En la actualidad la síntesis de muchos polímeros se lleva a cabo por la ruta química, sin embargo el uso de estas rutas sintéticas trae consigo la generación de disolventes residuales, que son poco amigables con el medio ambiente. En la búsqueda de nuevas rutas sintéticas que evitan la generación de residuos potencialmente tóxicos se ha descubierto que la síntesis enzimática de polímeros brinda una alternativa viable ya que las enzimas utilizan condiciones suaves de reacción y por lo general son activas en medios acuosos (Eker, Zagorevski, Zhu, Linhardt, & Dordick, 2009).

La polimerización del AG vía química se lleva a cabo utilizando piridina y tolueno como disolventes y se realiza a altas temperaturas, esta reacción fue reportada por Kricheldorf, & Stukenbrok (1998); los polímeros obtenidos presentaron un peso molecular promedio (M_n) de 23000 g/mol, un índice de polidispersidad (PDI) de 2.1, mientras que la estructura del polímero presentaba enlaces de tipo fenil-oxi y fenil-carboxi entre las moléculas de monómero. La síntesis química de este polímero como ya se mencionó utiliza disolventes orgánicos volátiles, además de altas temperaturas y condiciones de vacío, lo que lo vuelve un proceso poco amable con el medio ambiente. Como alternativa se ha demostrado que algunas enzimas tienen la capacidad de polimerizar otros derivados fenólicos como es el caso del poli-(ácido anacárdico) sintetizado mediante peroxidasa de soya como catalizador (Chelikani, Kim, Yoon, & Kim, 2009). La síntesis enzimática de polímeros fenólicos produce polímeros de alto peso molecular con la ventaja que las enzimas trabajan a condiciones más suaves de reacción tanto de temperatura como de pH, además que los disolventes residuales son por lo general de tipo acuoso como buffers. Adicionalmente la polimerización de precursores de tipo polifenólico se lleva a cabo de manera natural; esta es catalizada por oxidoreductasas como la lacasa de plantas y la peroxidasa entre otras enzimas que

son capaces de condensar monolignoles como el alcohol veratrílico y el alcohol coniferílico. Esta polimerización genera polímeros como la lignina y algunos otros lignanos (figura 10).

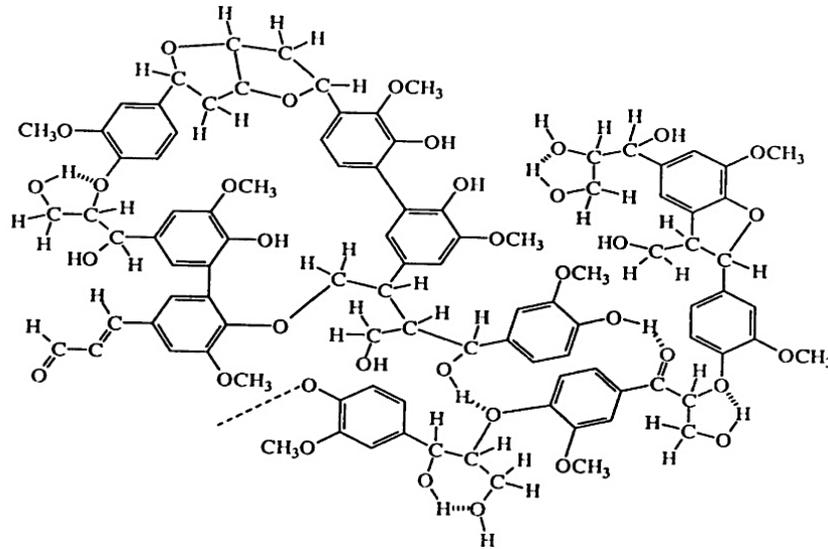


Figura 10 Estructura condensada de la Lignina.

1.7.1 PGAL

El PGAL es el resultado de la polimerización del ácido gálico (AG) utilizando a la lacasa de *T. versicolor* libre, esta molécula fue sintetizada por López, et al. (2013). Esta molécula presenta características únicas como la alta solubilidad en agua, la conservación de la capacidad antioxidante (Espino, 2016), como material conductor y con propiedades optoelectricas (Jesús Díaz, tesis doctoral), propiedades antimicrobianas (Villalpando, 2016) y propiedades como biomaterial para crecimiento tisular y celular (Romero, 2016). El mecanismo y posible estructura del PGAL fue propuesto por López, 2014 para su tesis doctoral y se ilustra en la figura 11.

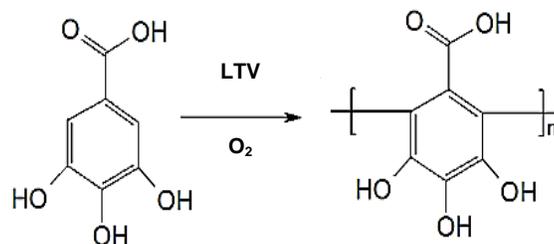


Figura 11 Esquema de reacción de la síntesis del PGAL y estructura propuesta para dicho polímero. Tomada de Espino, 2016.

Además de esta posible estructura (figura 11), se han especulado otros mecanismos de reacción que consisten en la oxidación del precursor de tipo fenólico formando su derivado quinoide para su posterior polimerización, además de la formación de múltiples tipos de enlaces generando un polímero ramificado para la funcionalización del quitosano con polímeros fenólicos. La estructura de sus polímeros sintetizados se presenta en la figura 12 (Božič, Georgieva, & Kokol, 2012).

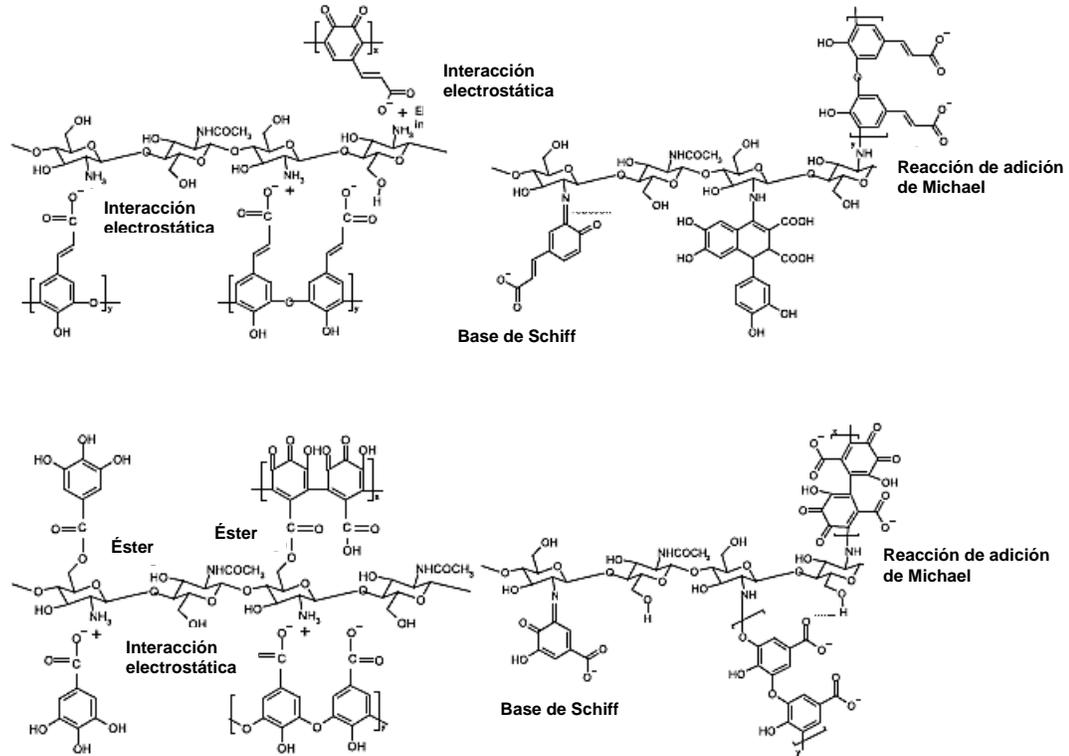


Figura 12 Quitosano funcionalizado. Tomada de Božič, Georgieva, & Kokol, 2012

1.8 Inmovilización enzimática

La LTV ha exhibido múltiples aplicaciones en varias industrias, pero una de sus principales desventajas radica en el hecho que al igual que otras enzimas utilizadas en procesos biotecnológicos, no puede ser recuperada posterior a su uso. Para poder superar este tipo de inconvenientes se han desarrollado un gran número de técnicas que permiten recuperar a la enzima para poder hacer uso de ella en varios ciclos de reacción; a las cuales se les conoce como inmovilización enzimática. La inmovilización se define como el confinamiento de una enzima en un espacio físico determinado (Wingard, 1972); la inmovilización enzimática además de brindar la posibilidad de poder recuperar a la enzima una vez que fue utilizada presenta

ventajas adicionales como permitir la simplificación en el diseño de reactores enzimáticos, mejora la estabilidad de la enzima, previene la inactivación en disolventes orgánicos, puede generar procesos más rentables, aumenta la rigidez de la enzima y facilita la recuperación del producto (Hartmeier, 1985). Los principales inconvenientes que presentan algunas técnicas de inmovilización enzimática son la alteración de la conformación de la proteína una vez que esta fue inmovilizada, o la pérdida de cierto porcentaje de la actividad enzimática por problemas difusionales (Martinek & Mozhaev, 1985). La inmovilización enzimática supone un gasto extra que el solo adquirir y utilizar a la enzima libre.

Así mismo se han desarrollado principalmente dos vertientes en la inmovilización enzimática; en una de ellas la fijación de la enzima al soporte es a través de interacciones de tipo electrostático, ión-ión, ión-dipolo, etc., o la formación de enlaces covalentes conocida como adhesión; mientras que en la otra vertiente la enzima queda atrapada en una red polimérica y es conocida como atrapamiento. En la figura 13 y tabla 2 se presentan ambas vertientes en la tecnología de inmovilización enzimática de manera descriptiva.

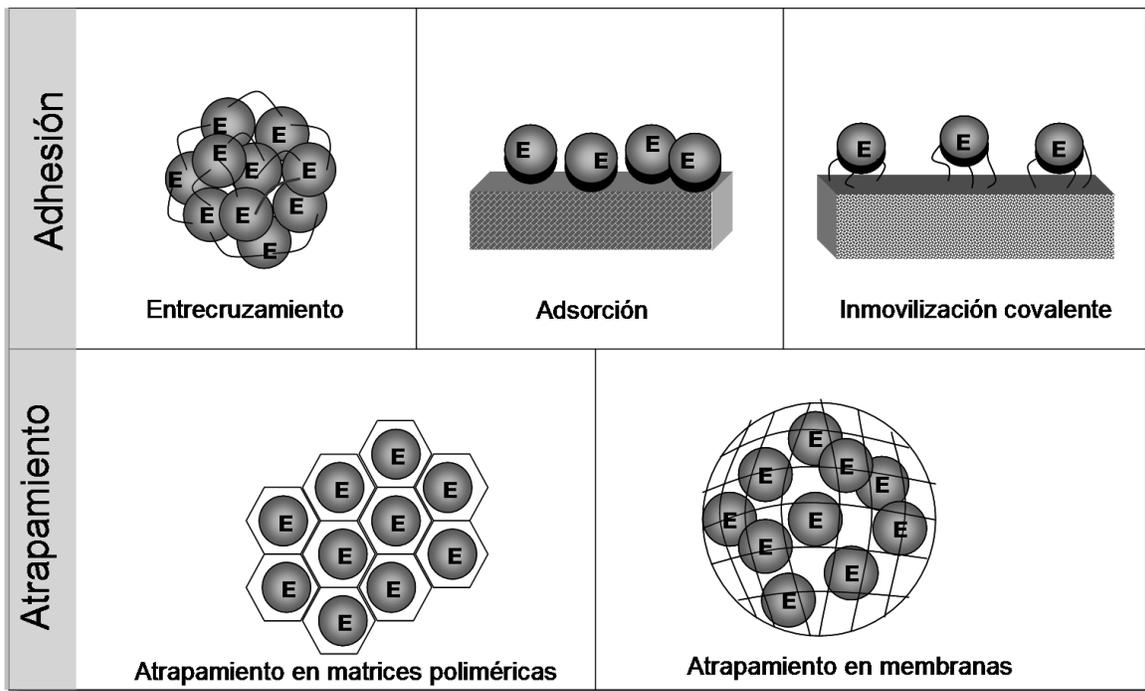


Figura 13 Técnicas de inmovilización enzimática. Tomada de Montiel, 2008

Tesis

Tabla 2 Técnicas de inmovilización enzimática

Técnica	Fundamento	Ventajas	Desventajas	Tipo de soporte	Fuente
Adsorción	Interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, tipo salino, etc., entre el soporte y la enzima.	<ul style="list-style-type: none"> - Fácil preparación. - Sin alteraciones de la forma activa de la enzima. 	<ul style="list-style-type: none"> - Altamente dependiente de pH, temperatura y fuerza iónica. 	Soportes sin funcionalizar como silica-gel, sefarosa, celulosa, resinas de intercambio iónico, etc.	Montiel, 2008
Unión covalente al soporte	Formación de enlaces covalentes entre residuos de aminoácidos del exterior de la enzima y el soporte.	<ul style="list-style-type: none"> - No existe dependencia con: pH, fuerza iónica y temperatura. - Mayor estabilidad y recuperación de la enzima. - Mayor utilización de la enzima inmovilizada (más ciclos de reacción). 	<ul style="list-style-type: none"> - Difícil preparación y demanda un conocimiento más amplio de la enzima y el soporte. - Puede alterar la conformación activa de la enzima. 	Resinas epóxicas. Resinas funcionalizadas con glutaraldehído.	Singh, 2003.
Entrecruzamiento	Uso de reactivos bifuncionales que brinden la posibilidad de formar enlaces intermoleculares entre moléculas de enzima.	<ul style="list-style-type: none"> - Formación de entramados que son capaces de resistir condiciones extremas de alta temperatura y pH. 	<ul style="list-style-type: none"> - Difícil preparación - Gran conocimiento de la enzima a entrecruzar. 	La enzima actúa como soporte; se entrecruza con reactivos como glutaraldehído o proteínas sin actividad enzimática como la ASB.	Margolin, 1996; Wong & Wong, 1992

Tesis

Atrapamiento

Confinamiento de la enzima en redes poliméricas o en fibras, similar a una red de pesca donde las enzimas son los peces y la red es el soporte.

- La enzima tiene contacto mínimo con el medio de reacción.
 - Los inmovilizados obtenidos tienden a ser más elásticos y resistentes.
 - La enzima no altera su conformación en el espacio.
- Baja estabilidad de los soportes a altas temperaturas lo que genera que la enzima se libere al medio de reacción.

Alginato, quitosano.
Copolímero PVA-PEG.
PTMS.

Nilsson, et al., 1983

1.8.1 Inmovilización con copolímero alcohol polivinílico(PVA)-polietilenglicol(PEG)

El alcohol PVA y el PEG son polímeros altamente utilizados por sus propiedades tanto mecánicas como por su biocompatibilidad. Este tipo de copolímero es preparado primeramente por la adición de una base fuerte que propiciará la formación del enlace covalente entre la cadena de PVA y la de PEG y la posterior gelación a bajas temperaturas donde la disminución de la temperatura es el estímulo físico que permite la formación de esferas de copolímero generada por las interacciones intermoleculares e intramoleculares de las cadenas de copolímeros; la estructura del copolímero se presenta en la figura 14. Este tipo de geles son ampliamente utilizados en la inmovilización de células (Szczsna-Antczak & Galas, 2001) y el atrapamiento de catalizadores de paladio (Prüsse, Hörold, & Vorlop, 1997). De manera aislada existen reportes de la inmovilización de enzimas como la carbonilreductasa, y la alcoholdehidrogenasa, siendo estas enzimas de la clase de reductasas. El copolímero PVA-PEG es un hidrogel con buenas propiedades mecánicas además de ser un material poroso que permite la difusión del sustrato al sitio activo de la lacasa de *T. versicolor* (Lozinsky & Plieva, 1998).

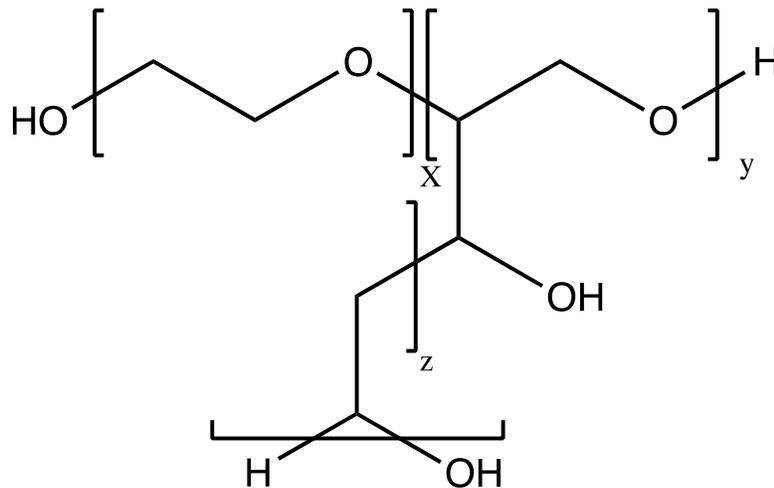


Figura 14 Estructura del copolímero PVA-PEG. Tomada de Suhrenbrock, Radtke, Knop, & Kleinebudde, 2011

1.8.2 Inmovilización en tetrametilortosilicato (TMS)/ politetrametilortosilicato (PTMS) por una técnica de sol-gel

La técnica de inmovilización utilizando un intermediario sol-gel consta de un primer

estado coloidal compuesto por la fase dispersa que en este caso es el tetrametilortosilicato (TMS) que es un precursor de tipo alcóxido (radical orgánico derivado de la pérdida de un hidrógeno de un grupo alcohólico) cuya estructura se presenta en la figura 15 y la fase continua (buffer de fosfatos pH 5.5), esto permite una ruta de síntesis de materiales cerámicos que posteriormente pueden formar una red polimérica de politetrametilortosilicato (PTMS) que es útil para atrapar a la LTV. Una vez que se formó el sistema disperso por medio de un estímulo de desestabilización física del sistema disperso inducida por sonicación se obtiene una masa sólida donde se encuentra atrapada la LTV. Uno de los productos obtenidos en esta transición es conocido con el nombre de gel de sílice, donde además de la fase sólida existe un subproducto denominado disolvente que puede ser agua o alcohol.

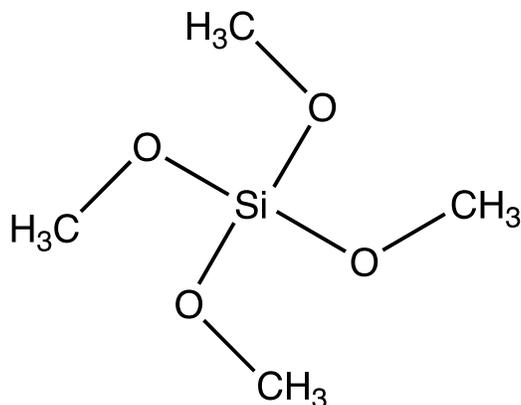


Figura 15 Estructura del TMS.

Esta técnica aprovecha el carácter electrofílico del átomo de silicio unido a los metilos y el carácter nucleofílico del agua y por medio de reacciones de esterificación, hidrólisis y condensación se propicia la polimerización del precursor de tipo alcóxido que en este caso es el TMS, el esquema de síntesis del soporte se presenta en la figura 16. Durante la polimerización se generan intermediarios de tipo alcóxido que de igual manera propician la polimerización (Gleiter, 1995)

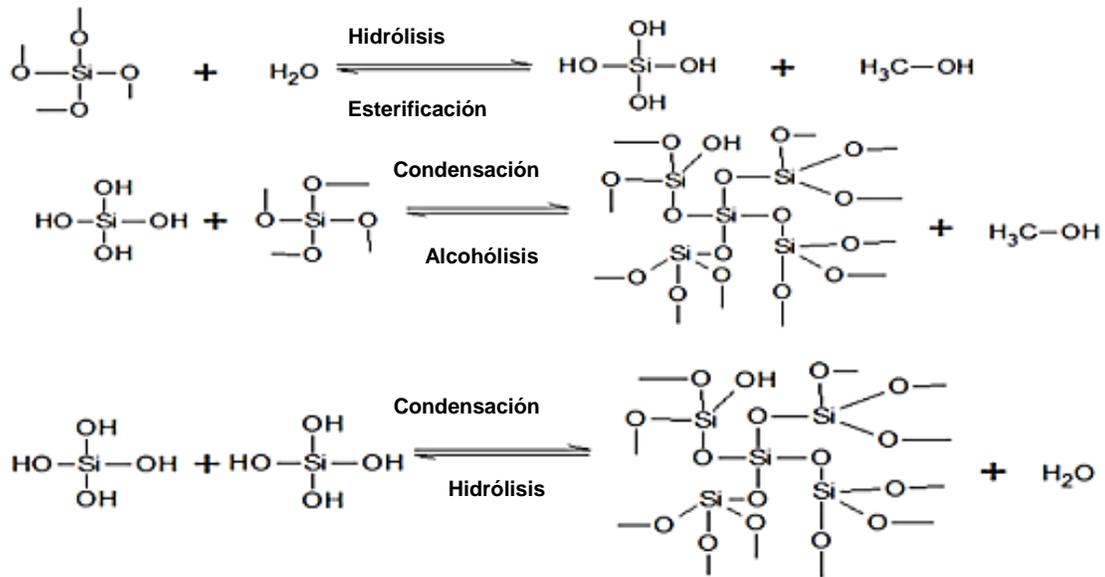


Figura 16 Esquema de síntesis del soporte con un precursor de tipo alcóxido.

En la figura 17 se presenta de manera esquemática como es el comportamiento de este tipo de sistemas desde el precursor de tipo alcóxido, la polimerización y la diversidad de tratamientos que se le puede dar al producto de polimerización según el tratamiento de la muestra para generar desde películas hasta cerámicos densos, además de la formación de redes poliméricas aprovechadas para inmovilizar a la LTV (Kistler & Caldwell, 1933).

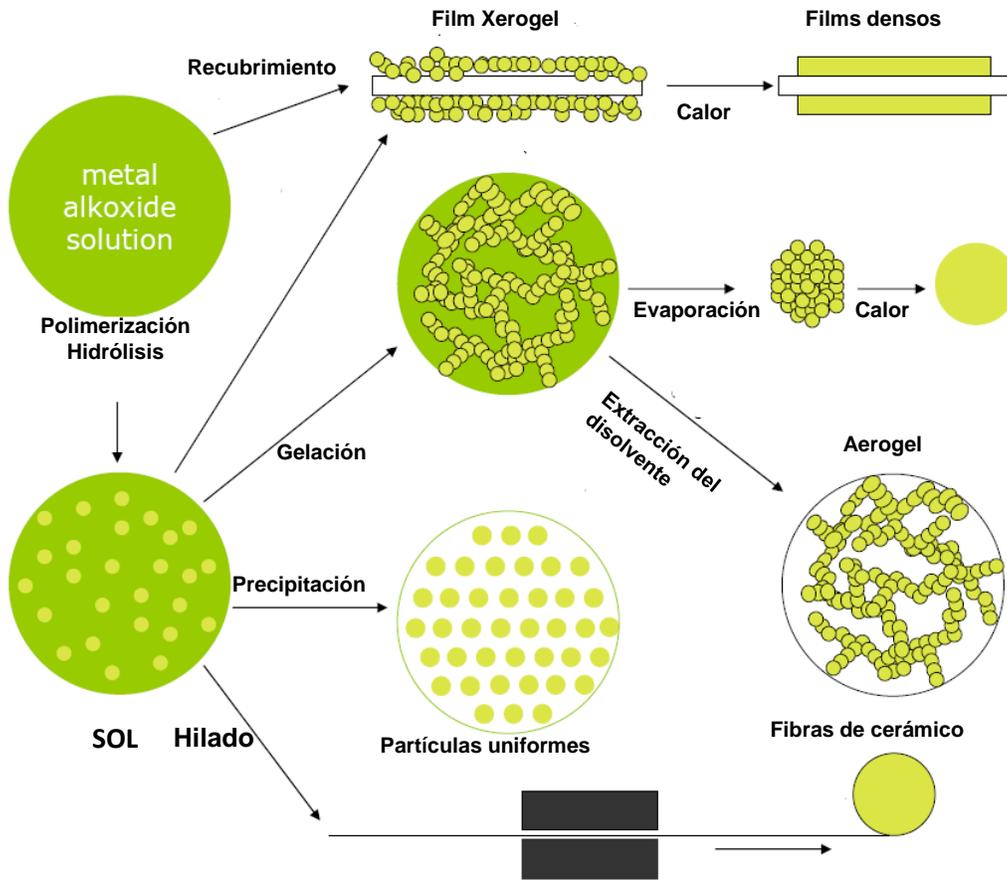


Figura 17 Aplicaciones de la técnica sol-gel.

2. Justificación

La síntesis de PGAL ha sido reportada con anterioridad (López et al., 2013) sin embargo el uso de la LTV para llevar a cabo la polimerización se restringe únicamente a un ciclo de reacción, la inmovilización enzimática como tecnología en biocatálisis logrará confinar a la LTV en los diferentes soportes utilizados para de esta manera poder reutilizar al biocatalizador en diversos ciclos de reacción.

La inmovilización de la LTV permitirá reducir costos en la producción de este nuevo material con potenciales usos en varias disciplinas.

3. Hipótesis

Al utilizar diferentes técnicas de inmovilización de la Lacasa de *Trametes versicolor*, se podrá obtener un biocatalizador de mayor estabilidad que conserve su actividad catalítica, con la posibilidad de poder ser reutilizado en diferentes procesos como la síntesis de biopolímeros.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Inmovilizar mediante diferentes técnicas a la Lacasa de *Trametes versicolor* y llevar a cabo la síntesis de Poli-(ácido gálico).

4.2 Objetivos particulares

- Inmovilizar la lacasa utilizando diferentes técnicas para evaluar la actividad enzimática de los inmovilizados a diferentes pH's y temperaturas, así como evaluar su estabilidad operativa en diferentes condiciones experimentales.
- Determinar las condiciones de reacción de la enzima inmovilizada para obtener la mayor actividad enzimática tanto para oxidar ABTS como para sintetizar PGAL.
- Determinar las condiciones de reacción para la enzima libre para poder

Tesis

obtener la mayor actividad enzimática tanto para oxidar al ABTS como para sintetizar PGAL y así poder comparar los resultados obtenidos con enzima libre e inmovilizada.

- Determinar los ciclos de reuso de la enzima inmovilizada para comprobar la premisa que la inmovilización enzimática permite recuperar el biocatalizador después de ciertos ciclos de reacción
- Llevar a cabo la síntesis de PGAL para obtener un material con aplicaciones potenciales en varias disciplinas
- Caracterizar el PGAL obtenido por diferentes técnicas instrumentales para determinar la estructura más probable del polímero sintetizado
- Obtener un PGAL con pesos moleculares menores a los reportados para obtener un material con mejores propiedades que aquel con alto peso molecular.

5. Materiales y Métodos

5.1 Materiales

La LTV, AG y ABTS, TMS, PVA (P.M.98-100), PEG (P.M. 950-1000) y el resto de reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. La caracterización instrumental de los productos de reacción fue llevada a cabo en la unidad de servicios de apoyo a la investigación (USAI).

5.2 Métodos

La realización del presente trabajo consistió en tres etapas. La primera corresponde a la preparación de los inmovilizados y la caracterización de ellos utilizando ABTS como sustrato. La segunda etapa corresponde al empleo de los inmovilizados para realizar la síntesis de PGAL utilizando el ácido gálico como sustrato y, la última etapa fue la caracterización de los productos de reacción por técnicas instrumentales y recuperación de los inmovilizados.

5.2.1 Etapa 1 Inmovilización de la lacasa de *T. versicolor*

Se llevaron a cabo 3 técnicas de inmovilización de la LTV, 2 de ellas corresponden a técnicas de atrapamiento y 1 de adhesión; estas 3 técnicas se compararon entre ellas y con la enzima libre para determinar cuál de ellas presenta un mejor desempeño en diferentes intervalos de pH, temperatura y condiciones operativas. La curva patrón de ASB se muestran en el anexo 1 del presente trabajo.

5.2.1.1 Actividad enzimática de la enzima libre

La medición de la actividad enzimática de la LTV se realizó usando una solución de enzima a una concentración de 10 mg/mL en buffer de acetatos 100 mM pH 5.5 y, ABTS 9.1 mM. A 2.9 mL de ABTS 9.1 mM se agregó 50 μ L de solución de enzima como iniciador de la reacción y el producto de la reacción (ABTS^{•+}) se monitoreó por 2 minutos cada 10 segundos, a una longitud de onda de 405 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer, Lamda 2S. Los cálculos para la determinación de la actividad enzimática se describen a detalle en el anexo 3 del presente trabajo.

5.2.1.2 Inmovilización por atrapamiento con un copolímero PVA-PEG

Se utilizó una solución de PVA (P.M. 98-100) al 15% m/v y otra de PEG (P.M. 950-1000) 15% m/v. En un volumen total de reacción de 20 mL se mezclaron ambas disoluciones y se calentaron a una temperatura de 90 °C evitando que las soluciones entraran en ebullición y se formaran grumos, posteriormente fueron enfriadas a 40 °C y se agregó 1 mL de NaOH 7 M, como catalizador de la formación de enlaces covalentes entre las cadenas de ambos polímeros; la mezcla se agitó por 30 minutos, transcurrido este tiempo se ajustó a un pH de 5.5 con HCl concentrado (para evitar la posterior desnaturalización de la enzima) evitando siempre en cada paso la formación de grumos. Se agregaron 2 mL de una suspensión de enzima al 10% m/v en buffer de acetatos pH 5.5 100 mM, se agitó la mezcla por 10 minutos y se goteó en aceite de silicón a una temperatura de -20 °C; las esferas ya formadas se dejaron reposar a 4 °C por 24 horas, cumplido este lapso se lavaron 2 veces con buffer de acetatos 100 mM pH 5.5 y una vez con hexano y se almacenaron en buffer de acetatos 100 mM pH 5.5 a 4 °C hasta su uso.

5.2.1.3 Inmovilización por adsorción

La sílica-gel utilizada para la inmovilización se dejó secar en una estufa a 80 °C por 24 horas, posteriormente se pesaron aproximadamente 100 mg de soporte en un tubo eppendorf y, se le agregó 1 mL de solución de lacasa al 10% m/v; se dejó en agitación por 24 horas en una agitadora recíprocante ajustable AROS 160 Thermolyne para propiciar la interacción soporte-enzima, transcurrido este tiempo los inmovilizados se centrifugaron 10 minutos a 10,000 rpm, el sobrenadante se recolectó para la cuantificación de proteína; la sílica-gel se lavó 3 veces con 1 mL buffer de acetatos 100 mM pH 5.5 y los lavados fueron recolectados para la cuantificación de proteína. El inmovilizado se dejó secar sobre una cama de CaCl₂ por 48 horas, posterior a éste tiempo este se almacenó en refrigeración hasta su uso.

5.2.1.4 Inmovilización en tetrametilortosilicato (TMS)/ politetrametilortosilicato (PTMS) por una técnica de sol-gel

La preparación de los inmovilizados se llevó a cabo utilizando 5 mL TMS y 10 mL de buffer de fosfatos 100 mM pH 5.5; se dejaron agitar por aproximadamente 5 minutos hasta observar la formación de pequeñas burbujas de TMS en la fase acuosa, posteriormente se realizó una sonicación hasta que en el sistema disperso se observó solo una fase de color blanco después se agregaron 2 mL de suspensión de enzima al 10% m/v, se agitó por 5 minutos y se dejó reposar a una temperatura controlada de 25 °C en un equipo IKA RCT basic e IKA ETS-D4 fuzzy. El inmovilizado se almacenó en refrigeración hasta su uso.

5.2.1.5 Actividad enzimática cualitativa de los inmovilizados

Una manera rápida de observar si la actividad enzimática no se vio comprometida por la inmovilización, fue mediante una técnica cualitativa de la oxidación del ABTS. Para esta medición se preparó ABTS 9.1 mM y se adicionaron 5 mL a 4 tubos de ensayo 2 de ellos fueron controles negativos que consistieron únicamente en el ABTS, al resto de los tubos se le agregaron aproximadamente 10 mg de cada inmovilizado como iniciador de la reacción enzimática; se esperó a que se llevara a cabo la reacción que evidenciaría la inmovilización de la enzima en los diferentes soportes y la conservación de la actividad enzimática que consistió en un cambio de color.

5.2.1.6 Cuantificación de proteína

A los lavados acuosos provenientes del proceso de inmovilización se le determinó la concentración de proteína total con el método de Bradford, se procedió a realizar una dilución 1:10 de los lavados se tomó una alícuota de 50 µL de estos y se añadió 200 µL de reactivo de Bradford y 750 µL de agua desionizada; se dejaron reaccionar por 10 minutos y luego se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer, Lambda 2S. La concentración de proteína en los lavados se calculó con ayuda de una curva estándar de albumina sérica bovina (ASB) partiendo de una disolución stock al 0.1 mg/mL. Todas las mediciones se realizaron por duplicado.

5.2.1.7 Actividad enzimática de los inmovilizados

Para la determinación de la actividad de la enzima inmovilizada se preparó ABTS 9.1 mM disuelto en buffer de fosfatos 100 mM pH 5.5 y se pesó la cantidad de inmovilizado que equivaliera a 0.5 mg de proteína se agregó 2.9 mL de ABTS y la aparición de la especie (ABTS*)⁺ se monitoreó por 2 minutos cada 10 segundos a una longitud de onda de 405 nm. Los cálculos para la determinación de la actividad enzimática se describen a detalle en el anexo 3 del presente trabajo.

5.2.1.8 Estabilidad de los inmovilizados a la agitación

La determinación de la estabilidad a la agitación se realizó pesando aproximadamente 1 g del inmovilizado copolímero PVA-PEG y 1 g de inmovilizado con PTMS (inmovilizados que tienen a la LTV atrapada en una red polimérica) por triplicado. Se suspendieron los inmovilizados en 10 mL de buffer de fosfatos pH 5.5 100 mM; éstos se dejaron agitando vigorosamente a temperatura ambiente por 24 horas, una vez transcurrido este tiempo se separó el inmovilizado del buffer centrifugándolo por 10 minutos a 10,000 r.p.m. El soporte se secó por 48 horas a temperatura ambiente con la ayuda de una cama de silica; posterior al secado el soporte se pesó y se calculó el % de soporte no disuelto.

5.2.1.9 Termoestabilidad de la enzima inmovilizada

Para la determinación de la termoestabilidad de los inmovilizados se utilizaron temperaturas de 20, 30, 40, 50 y 60 °C y se utilizó una concentración de 9.1 mM de ABTS. Se pesó la cantidad equivalente a 0.5 mg de proteína del inmovilizado para cada temperatura por triplicado. Los inmovilizados se dejaron por una hora a las diferentes temperaturas, transcurrido este tiempo se midió la actividad enzimática de los inmovilizados dejándolos reaccionar con el ABTS por 10 minutos a temperatura ambiente. De igual manera se utilizó un control de suspensión de enzima libre siguiendo la metodología descrita para la enzima inmovilizada. El control de temperatura fue proporcionado por un equipo Thermomixer eppendorf 1.5 mL.

5.2.2.0 Termoactividad de la enzima inmovilizada

Una vez que se midió la termoestabilidad de los inmovilizados se procedió a medir la actividad enzimática de la LTV inmovilizada a diferentes temperaturas. Para medir la termoactividad de los inmovilizados se pesó la cantidad equivalente a 0.5 mg de proteína del inmovilizados por triplicado y se preparó ABTS 9.1 mM. El ABTS se calentó a diferentes temperaturas (20, 30, 40, 50 y 60 °C). Una vez que el ABTS alcanzó las temperaturas de trabajo se colocó el inmovilizado y se dejó reaccionar por 10 minutos. El control de temperatura fue proporcionado por un equipo Thermomixer eppendorf 1.5 mL.

5.2.2.1 Medición de la actividad enzimática a diferente pH

Para la determinación de la actividad a diferente pH se utilizó un intervalo de pH de 3.5, a 7.5 y una concentración de 9.1 mM de ABTS. Se pesó la cantidad equivalente a 0.5 mg de proteína del inmovilizado para cada pH por triplicado. Los inmovilizados se dejaron agitando por una hora a los diferentes pH's a una temperatura de 25°C, posterior a esto se procedió a medir la actividad de los inmovilizados a punto final por 10 minutos a temperatura ambiente. De igual manera se utilizó un control de suspensión de enzima libre.

5.2.2.2 Estabilidad operativa de LTV inmovilizada

La estabilidad operativa de la enzima inmovilizada se determinó utilizando ABTS 9.1 mM como sustrato. Se pesó la cantidad equivalente a 0.5 mg de proteína de inmovilizado. Se midió la actividad enzimática a punto final por 10 minutos a temperatura ambiente; después de la reacción se separó el inmovilizado del medio de reacción y se lavó 3 veces con buffer de fosfatos pH 5.5 100 mM, una vez realizado el lavado nuevamente se lleva a cabo la medición de la actividad enzimática a punto final por 10 minutos. Este procedimiento se repitió hasta que la actividad enzimática disminuyó al menos un 50% de la inicial o desapareció por completo.

5.2.2.3 Estabilidad de la enzima inmovilizada con el tiempo

La estabilidad con el tiempo de la enzima inmovilizada se siguió por un intervalo de 30 días en los cuales se midió la actividad enzimática utilizando ABTS 9.1 mM; para esta determinación se midió la actividad enzimática de los inmovilizados pesando la cantidad equivalente a 0.5 mg de proteína de inmovilizado, la medición se realizó a punto final por 10 minutos cada día por triplicado.

5.3.1 Etapa 2 Síntesis enzimática del poli-(ácido gálico) (PGAL)

5.3.1.1 Síntesis de PGAL con LTV inmovilizada

Se pesaron aproximadamente 8 g de monómero de ácido gálico y se disolvieron en 250 mL de buffer de acetatos 100 mM pH 5.5 agregando 20 mL de NaOH 1 M; se esperó a que se disolviera por completo, y se transvasó a un matraz de 3 bocas color ámbar al cual se le agregaron 200 mg de inmovilizado de silica-gel, 4 g de inmovilizado con copolímero PVA-PEG y 3 g de inmovilizado con PTMS (cada uno por separado en matraces diferentes) dejando que polimerizara por 48 horas con burbujeo constante de aire. Transcurrido este tiempo se filtraron los inmovilizados con ayuda de filtros Whatman y se lavaron con buffer de acetatos 100 mM pH 5.5 y al sobrenadante se le adicionó 1 L de etanol con la intención de que el polímero precipitara. El precipitado se separó del sobrenadante para ser filtrado nuevamente con ayuda de un embudo Millipore y filtros Millex-HN 0.45 micras Millipore, después de esto se eliminó el exceso de disolvente utilizando una estufa a una temperatura de 80 °C y se pesó para calcular el rendimiento.

5.3.1.2 Síntesis de PGAL con LTV libre

Se pesaron aproximadamente 8 g de monómero de ácido gálico y se disolvieron en 250 mL de buffer de acetatos 100 mM pH 5.5 agregando 20 mL de NaOH 1 M; se esperó a que se disolviera por completo, y se transvaso a un matraz de 3 bocas color ámbar al cual se le agregó aproximadamente 1 mg de LTV (equivalente en peso a las unidades de actividad enzimática colocadas en la reacción con inmovilizados), se dejó polimerizar por 48 horas con burbujeo constante de aire. Se realizó el mismo procedimiento que en la sección anterior para obtener el precipitado

5.4.1 Etapa 3 Caracterización del PGAL sintetizado enzimáticamente.

5.4.1.1 Determinación de peso molecular

La determinación de peso molecular se realizó usando la cromatografía de permeación en gel (GPC), utilizando como fase móvil cloruro de litio 0.1 M, utilizando como estándar polietilenglicol (PEG) de distintos pesos moleculares (P.M.) (1010, 3870, 7830, 12320 y 22680); se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución acoplado a un detector de dispersión de luz y una columna de agarosa PL agua gel-OH 50 15 μm . Las muestras se prepararon realizando una disolución 1.5 mg/mL del polímero en cloruro de litio 0.1 M previamente filtrado con una membrana de 0.45 μm .

5.4.1.2 Caracterización de los productos de reacción

Los productos de reacción fueron caracterizados por espectroscopía de IR (FTIR) y resonancia magnética nuclear de protón (RMN- ^1H) en la unidad de servicios de apoyo a la investigación (USAI). Para FTIR se utilizó la técnica de reflectancia por ATR, mientras que para la RMN- ^1H se utilizó resonancia de líquidos utilizando D_2O como disolvente. Ninguna de las muestras requirió tratamiento especial o preparación extra.

5.4.1.3 Medición de la conductividad

La medición de la conductividad de los polímeros sintetizados enzimáticamente, se realizó en el Instituto de Física UNAM por medio del método de las 4 puntas en un electrómetro programable Keithley 6512 max input 250 V utilizándose como fuente de poder un equipo Matrix HPS-3005D. Los polímeros se comprimieron para obtener pastillas de dimensiones conocidas; las pastillas fueron medidas para obtener su ancho, largo y profundidad. Una vez conocidas las dimensiones de la pastilla de polímero se les hicieron pasar diferencias de potencial crecientes y con la ley de Ohm para la geometría rectangular se determinó la conductividad de los polímeros.

6. Resultados y Discusión

6.1 Etapa 1

6.1.1.1 Inmovilización de la lacasa de *Trametes versicolor*

La LTV inmovilizada en copolímero PVA-PEG generó inmovilizados de color blanco de forma esférica con un peso promedio de 65.3 mg, estos inmovilizados se presentan en la figura 18



Figura 18 LTV inmovilizada en un copolímero PVA-PEG

La LTV inmovilizada en TMS/PTMS con una técnica de sol-gel presentó en primera instancia un estado de sistema disperso caracterizado por ser líquido de color con apariencia lechosa posterior a la maduración (eliminación del disolvente formado derivado de la polimerización inducida por la desestabilización del TMS) presentó forma de cristales de color ámbar que al ser triturados formaron un polvo blanco, inodoro y de consistencia suave al tacto, estos inmovilizados se presentan en la figura 19.



Figura 19 LTV inmovilizada usando una técnica de sol-gel con PTMS

Finalmente la LTV inmovilizada por adsorción sobre un soporte de silica-gel presento la apariencia característica similar a la arena de la silica-gel.

6.1.1.2 Cuantificación de proteína y % de inmovilización

Los resultados relacionados a la cuantificación de proteína encontrada en los lavados se resumen en la tabla 3. La técnica de inmovilización en el copolímero PVA-PEG presentó la menor cantidad de proteína residual en los lavados con 8 mg de proteína de los 200 mg inicialmente colocados lo que corresponde a solo un 4% de proteína fuera del soporte, lo que fue un indicativo de que el soporte fue llenado en su totalidad por moléculas de enzima presentando un mayor grado de inmovilización en comparación con los otros soportes, esto se debe a la flexibilidad del gel formado por el copolímero.

Los inmovilizados por adsorción presentaron una ligera diferencia en la cantidad de proteína en los lavados en comparación con la técnica anteriormente discutida, esto es un indicativo de que la superficie total de la sílica también fue ocupada por la enzima dejando sin adsorberse un 5% de la proteína inicialmente colocada. Por último el soporte con menor capacidad de atrapamiento es la red polimérica de PTMS ya que presentó una mayor cantidad de proteína fuera del soporte, este soporte presenta una estructura más rígida que el copolímero PVA-PEG es por ello que su capacidad de albergar más enzima en su centro es más reducida.

Tabla 3 Cantidad de proteína residual en los lavados y % inmovilización en los diferentes soportes.

Técnica	Proteína inicial (mg)	Proteína fuera del soporte (mg)	Inmovilización (%)
PVA-PEG	200	8	96%
Sílica-gel	200	10	95%
PTMS	200	43.6	71.8%

6.1.1.3 Actividad enzimática cualitativa de los inmovilizados

Para corroborar que la enzima no sufría una inactivación como consecuencia del proceso de inmovilización, se realizó una medición cualitativa de la capacidad de la LTV para oxidar el ABTS, dicho sustrato presenta un color característico verde tenue, y una vez que la LTV lo oxida se observa de color verde oscuro; la aparición del color corresponde a la especie $(ABTS^{\bullet})^+$. La reacción que se lleva a cabo entre la LTV y el ABTS se presenta en la figura 20

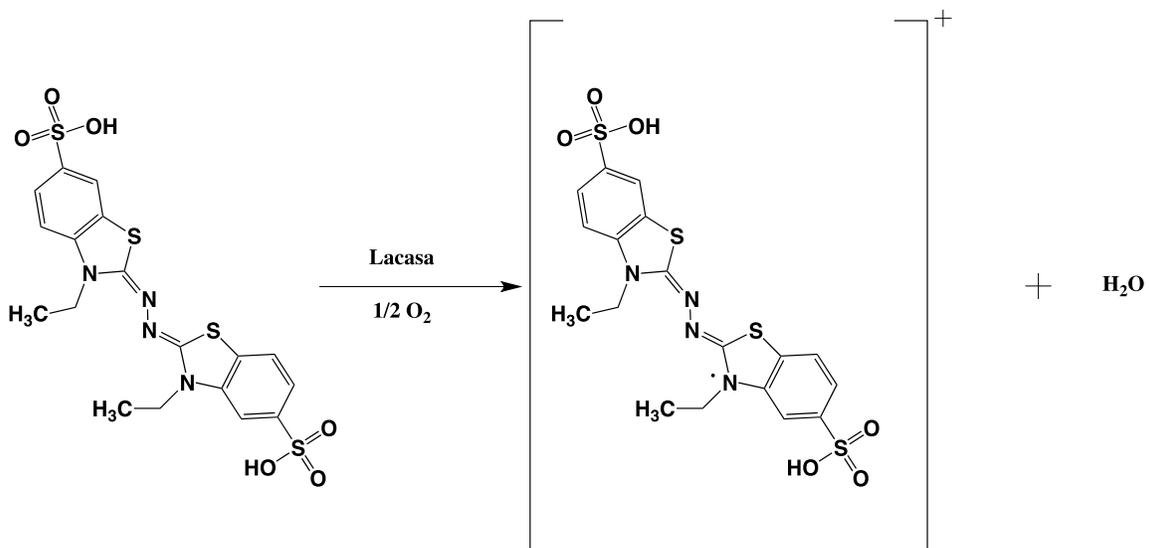


Figura 20 Reacción de la LTV con el ABTS. Tomada de Rehmann *et al.*, 2012

Todos lo inmovilizados conservaron actividad enzimática, sin embargo la reacción con la LTV inmovilizada fue más lenta ya que en los primeros 5 minutos de reacción no se observó cambio alguno, pero transcurridos 10 minutos en la solución comenzó a aparecer un color tenue que fue aumentando de intensidad al pasar 20 minutos hasta observarse colores más intensos que permanecieron por un tiempo prolongado, la tardanza de la aparición de los colores en la reacción se

debió a problemas de transferencia de masa de los sustratos al sitio activo; ya que inicialmente estos se tuvieron que difundir de la superficie del soporte hasta el centro activo de la enzima y posteriormente liberar el producto y la salida de éste al medio de reacción. Dichos procesos implicaron más pasos para que la reacción enzimática se llevara a cabo. A diferencia de la enzima libre donde el sustrato y producto únicamente difundieron del sitio activo. Sin embargo la actividad enzimática de la LTV se mantuvo por lo que estos inmovilizados pudieron ser utilizados para la determinación de la actividad cuantitativa enzimática y los posteriores ensayos correspondientes a la caracterización de estos.

A los inmovilizados obtenidos por la adsorción sobre sílica gel se les determinó si conservaban actividad enzimática con un método rápido obteniéndose que la aparición del color verde oscuro es ligeramente más rápida en comparación con los inmovilizados del copolímero PVA-PGE; ya que el color se presentó después de 3 minutos de la adición de los inmovilizados. El fundamento de esta técnica es que la enzima sólo se encuentra adsorbida en la superficie de la sílica-gel por lo que la entrada del sustrato y liberación del producto del sitio activo se lleva a cabo en un número menor de pasos; a diferencia de la inmovilización con el copolímero PVA-PGE.

Finalmente los inmovilizados obtenidos por la técnica de sol-gel presentaron resultados muy similares a los encontrados con el copolímero PVA-PEG, ya que la enzima se encuentra atrapada en una red polimérica de PTMS que funge como un soporte poroso para que el sustrato se difunda al sitio activo de la enzima. Una vez que la enzima generó el producto este igualmente debe difundir fuera de la red; al igual que los inmovilizados anteriores se conserva la actividad de la LTV.

Las 3 técnicas de inmovilización evidenciaron la conservación de la actividad enzimática de la LTV por lo que se procedió a realizar las evaluaciones posteriores.

6.1.1.4 Actividad enzimática de los inmovilizados y de la enzima libre

Una vez confirmado que los inmovilizados conservaban actividad enzimática se procedió a evaluar la actividad enzimática tanto de los inmovilizados como de la

Tesis

enzima libre. Se realizaron los ensayos enzimáticos para la enzima libre que servirían como parámetro de comparación con la enzima inmovilizada con diferentes técnicas, dichos resultados se presentan en la tabla 4.

Tabla 4 Comparación de la actividad enzimática de las diferentes técnicas de inmovilización enzimática y la enzima libre

Técnica	Actividad enzimática (U/ mg proteína)
PVA-PEG	$8.9 \times 10^{-2} \pm 5.0 \times 10^{-3}$
Adsorción	$2.2 \times 10^{-3} \pm 2.0 \times 10^{-4}$
PTMS	$3.5 \times 10^{-2} \pm 4.9 \times 10^{-3}$
Libre	$1.1 \times 10^{-1} \pm 8.3 \times 10^{-3}$

Para verificar si existía diferencia significativa entre los valores de actividad enzimática promedio se realizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de un factor con un nivel de confianza del 95%, encontrándose que existía diferencia significativa en la actividad enzimática en al menos una de las diferentes técnicas de inmovilización en comparación con la enzima libre; para determinar que grupos eran aquellos que tenían diferencias en la actividad enzimática se procedió a realizar una prueba de Tukey; encontrándose que la actividad enzimática medida para todas las técnicas de inmovilización tenían diferencias significativas en comparación con la actividad enzimática de la enzima libre; en contraste comparando entre ellas los resultados de actividad enzimática de las diferentes técnicas de inmovilización enzimática probadas se encontró que no existe diferencia significativa en ninguna de ellas, los resultados de las pruebas estadísticas se presentan en el anexo 2 del presente trabajo.

Como se mencionó anteriormente la enzima libre no presenta problemas de difusión hacia su sitio activo por lo que la reacción de oxidación es mucho más rápida viéndose reflejado en una actividad enzimática con dos o tres órdenes de magnitud superior a los inmovilizados de LTV. Hornby, Lilley, & Crook (1968) propusieron una modificación a la ecuación de Michaelis-Menten (ver ecuación en anexo 4) donde la velocidad de reacción de una enzima inmovilizada es

dependiente de otros términos; ésta ecuación considera a) términos difusionales debido a que los sustratos tienen que cruzar el interior del gel, microcápsula, fibra o poro del soporte donde se encuentra la enzima inmovilizada; b) términos electrostáticos que se presentan porque el soporte es insoluble en el medio de reacción lo que trae como consecuencia la aparición de la capa de Nernst alrededor del inmovilizado de tal manera que, la presencia de iones en el medio de reacción ocasiona que haya repulsión mutua si el soporte y el sustrato tienen la misma carga, mientras que si las cargas son opuestas entre ambos hay atracción, además considera que también hay un gradiente de concentración en la superficie del inmovilizado y el resto del medio de reacción lo que influye en la actividad enzimática. Los iones fosfato presentes en el medio de reacción pudieron quedar adsorbidos en la superficie de los diferentes soportes, ocasionando la formación de nuevos microambientes en la superficie de los diferentes soportes (pequeñas variaciones de pH debido a la adsorción de estos iones), la presencia de la capa de Nernst y Stern, el impedimento estérico para el caso del copolímero PVA-PEG y PTMS y la porosidad del soporte pudieron ocasionar que el ABTS y el oxígeno no fueran transferidos con eficiencia al sitio catalítico ocasionando una disminución de la actividad enzimática.

6.1.1.5 Estabilidad de los inmovilizados a la agitación.

Para determinar que tanta masa de soporte era estable a la agitación vigorosa y lixiviaba a la enzima al medio de reacción se procedió a realizar el ensayo de estabilidad de los inmovilizados a la agitación. Únicamente se evaluaron los soportes correspondientes a las técnicas de atrapamiento ya que ambos soportes son redes poliméricas capaces de disolverse y liberar a la enzima; la sílica-gel además de ser insoluble en agua, tiene a la enzima adsorbida por interacciones físicas como ión-ión entre algunas otras que no liberan a la enzima al medio de reacción con facilidad. La estabilidad de los dos soportes evaluados fue alta como se muestra en la tabla 5

Tesis

Tabla 5 Estabilidad de los soportes de inmovilización de enzimas a la agitación

Técnica	Estabilidad (%)
PVA-PEG	89.9 ± 1.9%
PTMS	98.7 ± 0.7%

Ambos soportes presentaron un alto grado de resistencia a la agitación vigorosa por lo tanto la disolución del material de soporte es muy baja y por lo tanto también la liberación de la enzima al medio de reacción; por lo cual, el efecto de catálisis por acción de la enzima libre es prácticamente nulo y una gran proporción de la actividad catalítica se debe a la enzima atrapada en el soporte.

La degradación del copolímero PVA-PEG por acción de la agitación se debió principalmente a la larga exposición al medio acuoso. Al tratarse de un hidrogel presentó un fenómeno de aumento de volumen por acción de la interacción del agua con las cadenas poliméricas de soporte; dicho fenómeno de aumento de volumen se presenta y se ha reportado para polímeros de naturaleza altamente hidrofílica como es el caso del PEG y la polivinilpirrolidona (PVP) (Besednjak, 2005), el hinchamiento es una consecuencia macroscópica del fenómeno microscópico de relajamiento de las cadenas de soporte, por lo que las cadenas del polímero se tornaran más laxas facilitando una interacción más íntima del soporte con las moléculas de agua lo que ocasiona su disolución, ayudado por la agitación vigorosa proporcionada al sistema.

La degradación del PTMS fue atribuida el aumento de la energía cinética en el medio ocasionado por la agitación vigorosa, dicha agitación pudo propiciar que la reacción de síntesis del soporte fuera reversible generando la degradación de este a su precursor el tetrametilortosilicato (TMS) debido el ataque nucleofílico del agua a los centros deficientes de electrones en el PTMS como el átomo del silicio, que es susceptible al ataque de una base con pares de electrones disponibles, ocasionando que el soporte se degradará liberando a la enzima al medio de reacción y trayendo como consecuencia que no se pudiera recuperar el 100% de masa inicial de soporte pesado. Sin embargo como se observa en la tabla 5, la resistencia de ambos soportes se encontró arriba del 85% por lo que se pudo

proseguir con las siguientes determinaciones ya que al resistir la agitación vigorosa por tiempos prolongados, los soportes muy probablemente resistan las condiciones del resto de determinaciones realizadas.

6.1.1.6 Termoestabilidad de la enzima inmovilizada.

En la figura 21 se muestra el ensayo de termoestabilidad de la LTV libre e inmovilizada, esta presentó una mayor estabilidad en un intervalo de temperatura de 30 a 50 °C, empezando a perder su actividad enzimática a partir de los 60 °C debido a la inactivación de la LTV por acción de la desnaturalización; de igual manera a 20 °C la LTV presentó una actividad enzimática menor debido a que ésta proviene de un microorganismo fúngico que crece a una mayor temperatura. Farnet, Criquet, Pocachard, Gil, & Ferre (2016) reportaron que la lacasa de *Merasmium quercophilus* conservaba actividad enzimática en un intervalo de temperatura de 40 a 50 °C al igual que la LTV. Diversos autores postulan que las glicosilaciones de la LTV le brindan una mayor estabilidad a temperaturas altas.

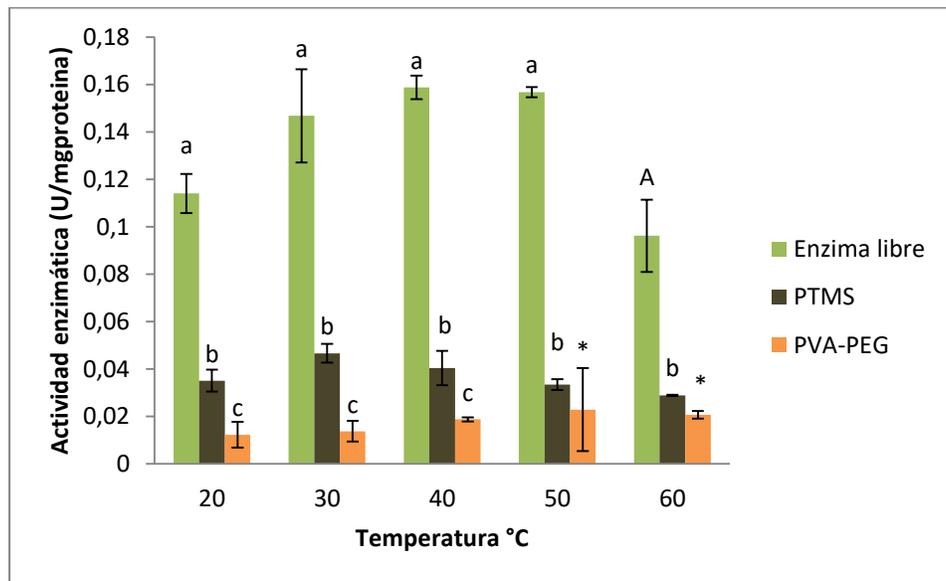


Figura 21 Efecto de la temperatura en la estabilidad enzimática de la enzima libre y los diferentes inmovilizados (a: grupos sin diferencia significativa entre ellos, A: grupos con diferencia significativa b: grupos sin diferencia significativa entre ellos, c: grupos sin diferencia significativa entre ellos, *: no considerado en el análisis).

Se realizó una análisis varianza encontrándose que no existía diferencia significativa en los valores de actividad enzimática de la enzima inmovilizada al incrementar la temperatura del medio de reacción, esto es un indicativo de su

Tesis

estabilidad en todo el intervalo de temperaturas analizado; en comparación con la enzima libre que presenta una pérdida de actividad a partir de los 60 °C; los resultados de las pruebas estadísticas se presentan en el anexo 2 del presente trabajo.

El ensayo de termoestabilidad para los inmovilizados fue realizado para observar si las técnicas de inmovilización promovían la estabilidad de la LTV a temperaturas más altas; los inmovilizados utilizando adsorción en silica-gel no fueron evaluados ya que el fenómeno de adsorción es dependiente de la temperatura de manera que al aumentar la temperatura se promovería la desorción por lo cual la actividad enzimática encontrada y reportada pertenecería a la enzima libre y no a la enzima inmovilizada, lo cual no es considerado como un aporte para este trabajo.

En los inmovilizados se encontró que la técnica de inmovilización utilizando PTMS (figura 21) presentó la mayor estabilidad a una temperatura de 30 °C y dicha estabilidad aunada a la actividad enzimática fue disminuyendo al aumentar la temperatura, en contraste a lo encontrado con la actividad enzimática medida para la enzima libre.

Las pequeñas diferencias en la estabilidad del PTMS se debieron a que se trata de una red polimérica la cual al aumentar la temperatura presentó un proceso de degradación permitiendo la liberación de la enzima al medio de reacción y la formación de subproductos; los cuales pudieron inhibir a la enzima ocasionando que la actividad enzimática disminuyera a temperaturas elevadas; generando un efecto donde a mayor temperatura hay mayor degradación del soporte y mayor generación de subproductos de degradación disminuyendo la actividad, y el segundo factor que influyó fue la pérdida de la actividad debido al aumento de la temperatura que se observó en la enzima libre. La degradación del soporte por la acción de la temperatura se corroboró recuperando el inmovilizado posterior a la reacción enzimática, se secó y se pesó después de esto se encontró que la masa era menor a la colocada inicialmente.

Los resultados de termoestabilidad del copolímero PVA-PEG presentan una mayor estabilidad entre 20 y 30 °C de temperatura. El análisis estadístico llevado a cabo no contempló que al aumentar la temperatura arriba de 40 °C el soporte se degradó y disolvió dejando libre a la enzima de manera que la actividad

monitoreada a esa temperatura corresponde a la enzima libre por lo que estos datos no fueron incluidos en dicho análisis. La inestabilidad térmica de soportes tipo PVA-PEG fue reportada por Fernandes, Marques, Carvalho, & Cabral, (2008).

6.1.1.7 Termoactividad de la enzima inmovilizada

La influencia de la temperatura en la actividad enzimática (termoactividad) de los inmovilizados se evaluó a diferentes temperaturas. De igual manera se realizó un análisis de varianza encontrándose que no existía diferencia significativa en los valores de actividad enzimática en las diferentes condiciones de temperatura, esto es un indicativo de que la enzima inmovilizada no pierde su actividad al aumentar la temperatura lo que probó que la inmovilización mejoró la estabilidad térmica de la enzima a comparación de la enzima libre que presenta una pérdida de actividad a partir de los 60 °C (figura 22); sin embargo hubo ciertas fuentes de variación que se discutirán a continuación; los resultados de las pruebas estadísticas se presentan en el anexo 2 del presente trabajo.

La termoactividad de los inmovilizados copolímero PVA-PEG (figura 22) mostraron la tendencia encontrada para los ensayos enzimáticos de termoestabilidad, donde la mayor actividad se registró a una temperatura de 20 a 30 °C, se observó una disminución y posteriormente un incremento en la actividad en un intervalo de temperaturas de 40 a 50 °C debido al inicio de la degradación del soporte y disolución de éste para dejar a la enzima libre; esta fue la fuente de las diferencias entre los valores de actividad enzimática, de estos resultados se pudo observar que la estabilidad de los inmovilizados al elevar la temperatura es muy poca ya que la reacción enzimática tuvo una duración de 10 minutos y dentro de este intervalo de tiempo se dio inició a la degradación del soporte, a partir de 60 °C nuevamente la actividad disminuye por acción de inactivación térmica de la LTV posterior a la degradación/disolución del soporte.

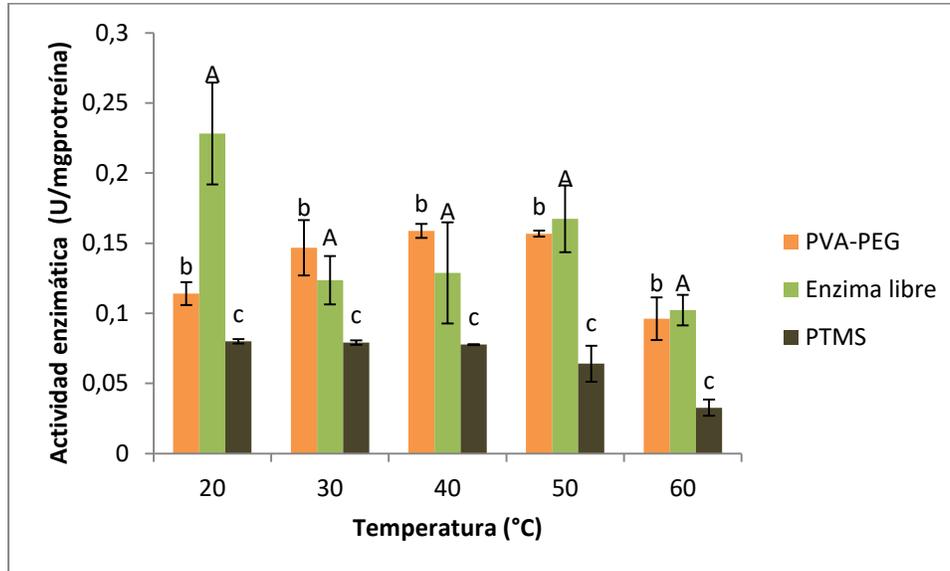


Figura 22 Efecto de la temperatura en la actividad enzimática de los inmovilizados, A: grupos con diferencias significativas, b: grupos sin diferencias significativas, c: grupos sin diferencias significativas)

Los inmovilizados utilizando PTMS (figura 22), mostraron una mayor actividad enzimática en un intervalo de 20 a 40 °C, sin embargo los resultados para esta evaluación proporcionaron más información que lo anteriormente discutido debido a que la pérdida de la actividad se da a mayores temperaturas y el soporte presentó menor degradación al terminar la reacción enzimática que duró 10 minutos, esto fue un indicativo que esta técnica de inmovilización brinda a la LTV una mayor termoestabilidad y termoactividad, debido a que la degradación del soporte se da a tiempos superiores de 10 minutos, pero menores de 1 hora.

De igual manera se observó una pérdida del 25% de la actividad enzimática que inició a temperaturas más elevadas, pero se hace énfasis que para éste caso la pérdida de la actividad enzimática de la LTV inmovilizada se dio de una manera gradual.

6.1.1.8 Actividad enzimática a diferente pH.

Los resultados de la medición de la actividad enzimática de la LTV libre e inmovilizados se presentan en la figura 23. La actividad fue medida a diferentes pH's para observar que el pH de mayor actividad enzimática es de 5.5. La LTV presentó una mayor actividad enzimática en un intervalo de pH de 3.5 a 5.5. La

literatura reporta que utilizando ABTS como sustrato las lacasas de fuentes fúngicas tienen un pH óptimo de actividad ubicado en un intervalo de pH que va desde 3 hasta 6 (Heinzkill, Bech, Halkier, Schneider, & Anke, 1998) por lo que los resultados encontrados concuerdan con los reportados en la literatura. De igual manera los organismos fúngicos crecen de mejor manera en un pH que va de 3 a 7 de manera que su maquinaria enzimática presenta una mejor actividad en este rango de pH; a pH alcalino la enzima adquiere diferentes cargas y la configuración de esta cambia de manera que la actividad enzimática disminuye.

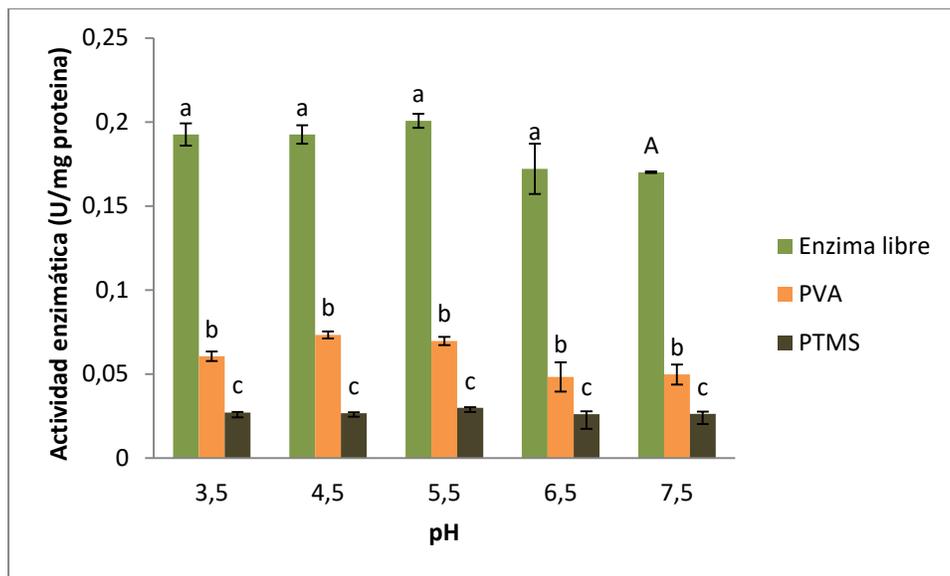


Figura 23 Efecto de la variación de pH en la actividad enzimática de la enzima libre y los inmovilizados (a: grupos sin diferencias significativas, A: grupos con diferencias significativas, b: grupos sin diferencias significativas, c: grupos sin diferencias significativas)

Los inmovilizados utilizando la técnica de adsorción en silica-gel no fueron evaluados ya que el fenómeno de adsorción es dependiente del pH, el estado de ionización de los grupos que interaccionan con el soporte está fuertemente influenciado por el pH y como consecuencia al variar al pH la cantidad de interacciones entre la enzima y el soporte puede ser menor o mayor dependiendo del punto isoeléctrico de la enzima.

Los resultados provenientes de las evaluaciones utilizando el PTMS (figura 23), presentan su mayor actividad en un intervalo de pH de 4.5 a 5.5 mostrando el mismo perfil que la enzima libre, el soporte presentó completa integridad a diferente pH por lo que el soporte es estable a los diferentes pH's evaluados.

Los resultados de los inmovilizados del copolímero PVA-PEG (figura 23), mostraron un pequeño aumento de actividad a pH 5.5 confirmando las evidencias experimentales anteriormente encontradas donde se postuló que el pH de mayor actividad de la LTV se encontró a pH 5.5 (Heinzkill, Bech, Halkier, Schneider, & Anke, 1998). Todos los pH's presentan una actividad enzimática similar por lo que el soporte le brindó una mayor estabilidad a la enzima frente a estos cambios, esto fue confirmado por el análisis de varianza realizado ya que se encontró que no existía diferencia significativa en los valores de actividad enzimática de los inmovilizados medida a diferente pH; sin embargo, si existían diferencias en la actividad enzimática de la enzima libre en pH más neutro, esto es un indicativo de que los inmovilizados le brindan a la enzima una mejor estabilidad a cambios de pH de la enzima libre que conforme aumenta el pH la actividad enzimática va disminuyendo gradualmente, pero que no es significativa; los resultados de las pruebas estadísticas se presentan en el anexo 2 del presente trabajo. Los inmovilizados no presentaron ningún tipo de degradación debido al cambio de pH, esto se corroboró recuperando el inmovilizado y pesándolo posterior a la reacción. En el hidrogel PVA-PEG, al ser una red polimérica el efecto de la protonación o desprotonación de los átomos de oxígeno disponibles le brindó al sistema la posibilidad de tener repulsiones o atracciones electrostáticas que pudieron causar un efecto de hinchamiento o deshinchamiento que benefició la difusión del sustrato al sitio activo al aumentar el pH (Katime I, Katime O, & Katime D, 2004).

6.1.1.9 Estabilidad operativa de LTV inmovilizada

La operatividad de la LTV inmovilizada se evaluó mediante ensayos de ciclos de reuso con la intención de verificar la premisa que la inmovilización enzimática permite recuperar el biocatalizador después de determinados ciclos de reacción. La enzima se recuperó por centrifugación a 10000 rpm durante 10 minutos, después de cada ciclo y posteriormente se colocó en un medio fresco de reacción. La actividad residual se normalizó tomando en consideración al ensayo del primer ciclo de cada biocatalizador estudiado con un 100% de actividad. En la figura 24 se presentan los ciclos de reuso para los inmovilizados utilizando el copolímero PVA-

PEG, se encontró que éstos presentan actividad enzimática aun después de ser utilizados en 10 ciclos de reacción. La pérdida de actividad es debida a que los poros del material pudieron ser ocupados por moléculas de producto por lo cual el acceso de las moléculas de sustrato se ve impedido, esto se observó experimentalmente con el cambio de color de los inmovilizados pasando de su color blanco característico a un color verde oscuro perteneciente al (ABTS^{•+})⁺

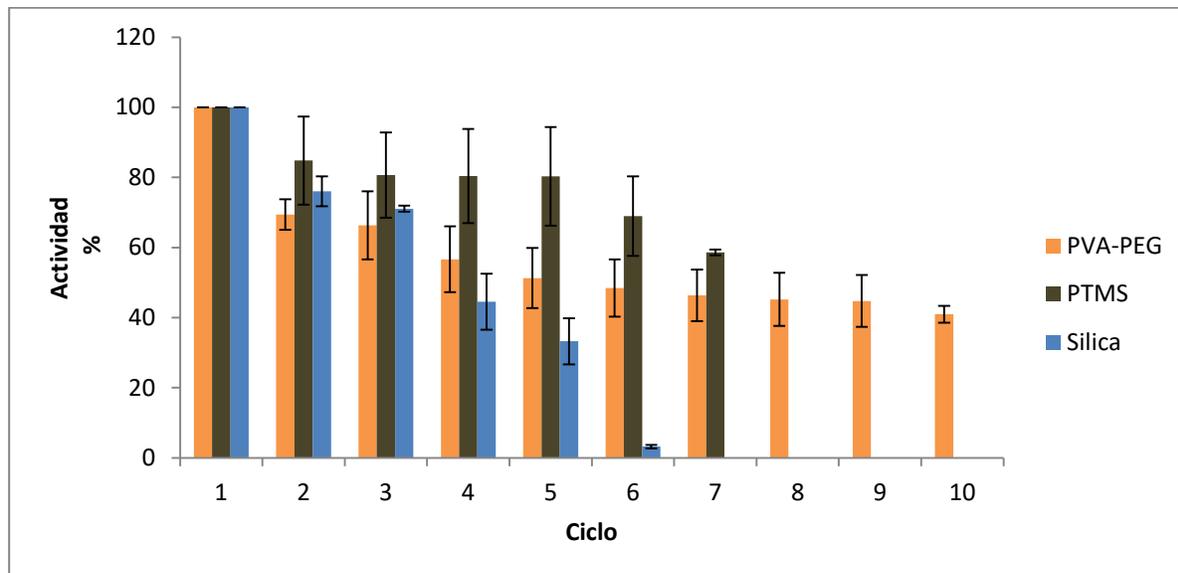


Figura 24 Ciclos de reuso para los inmovilizados utilizando un copolímero PVA-PEG, PTMS y Sílica.

La técnica de inmovilización utilizando PTMS presentó un menor número de ciclos de reuso en comparación con la técnica del copolímero PVA-PEG; ya que al tratarse también de una red polimérica donde la enzima se encuentra confinada, los poros por donde el sustrato ingresa al sitio activo de la enzima se vieron bloqueados por moléculas de producto, de igual manera se corroboró experimentalmente con el cambio de color de los inmovilizados pasando de su color blanco característico a un color verde oscuro perteneciente al (ABTS^{•+})⁺, la cantidad de ciclos de reuso menor a la encontrada con el copolímero PVA-PEG se encuentra relacionada con la porosidad del soporte PTMS ésta red posiblemente cuenta con una red más estrecha debido a la estructura del polímero por lo que la cantidad de poros es menor y más pequeña generando que los poros fueran ocupados en una menor cantidad de ciclos de reacción.

Finalmente, se observó un menor número de ciclos de reuso con la técnica de

inmovilización utilizando adsorción en sílica en comparación con las otras dos técnicas. La desorción debida a los lavados continuos de los inmovilizados para retirar los restos sin reaccionar tuvo como consecuencia la pérdida de la actividad enzimática.

Con anterioridad se han realizado estudios de estabilidad operativa de lacasa inmovilizada Kamitaka, Tsujimura, Setoyama, Kajino, & Kano (2007) reportaron una celda en la que usaron una lacasa de *Trametes sp.* la cual mantiene un 63% de actividad después de 12 horas de uso, de igual manera Casaban (2014) encontró que la LTV inmovilizada en agarosa-glioxil presentaba actividad hasta el noveno ciclo de uso, esto es un indicativo que los inmovilizados preparados en este trabajo presentan una buena estabilidad operativa ya que para la mayoría de los casos se superó o casi igualó a los ciclos de reuso reportados en la literatura a excepción del inmovilizado utilizando sílica que presentó menor estabilidad por lo discutido con anterioridad.

6.1.2.0 Estabilidad de la enzima inmovilizada con el tiempo.

Para determinar si los diferentes inmovilizados presentaban actividad enzimática en tiempos prolongados de almacenamiento se realizó el seguimiento de la actividad enzimática durante un mes cada 5 días.

Los resultados obtenidos en la medición de la actividad enzimática por tiempos prolongados para los inmovilizados utilizando PTMS y el atrapamiento en el copolímero PVA-PEG se presentan en la figura 25, se encontró que ambos conservaron actividad enzimática después de un mes de realizar el proceso de inmovilización, en los últimos tiempos de medición se observó que la actividad enzimática disminuyó en comparación con los primeros tiempos de muestreo, esta disminución aunque es pequeña se debió a la inactivación de la enzima debido a una posible interacción con el soporte que pudo causar la pérdida de la actividad de la enzima, además la posible desnaturalización y lixiviación de la enzima.

Para el caso de los inmovilizados utilizando la técnica de adsorción en sílica (figura 25 eje derecho) se observó un aumento de la actividad enzimática al paso de los días esto por el efecto de la desorción de la enzima del soporte lo que causó que la actividad registrada fuera debida a la enzima libre.

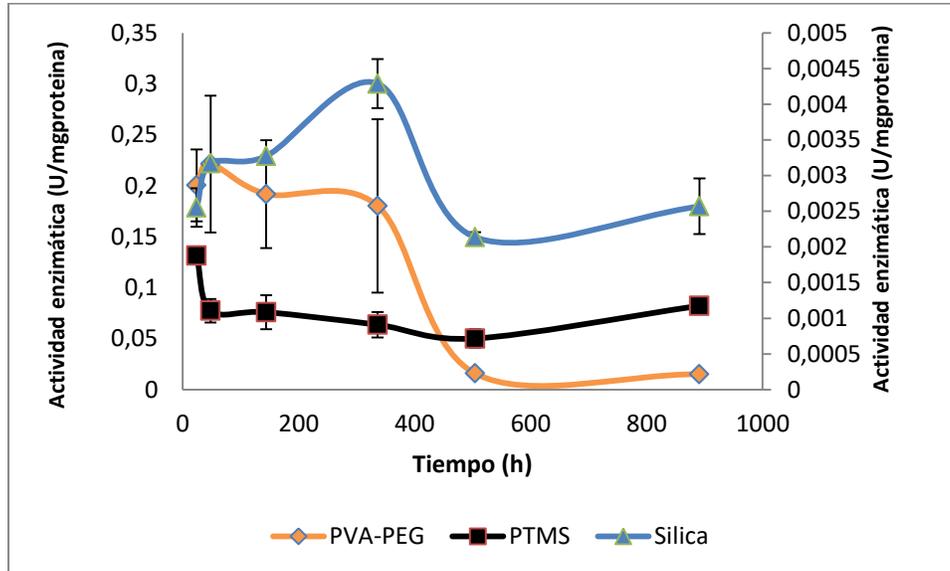


Figura 25 Actividad enzimática en función del tiempo para los diferentes inmobilizados

Los resultados encontrados para las diferentes caracterizaciones realizadas a los inmobilizados mostraron que la inmobilización de la LTV tuvo efecto de disminución significativo en la actividad enzimática, sin embargo las diferentes técnicas de inmobilización le brindaron a la LTV una mayor estabilidad a diferentes intervalos de pH presentándose actividad enzimática aún en un pH que no corresponden a los óptimos según lo reportado en la literatura, además los inmobilizados permitieron que la enzima presentara actividad en un intervalo más amplio de temperaturas, además que los inmobilizados pueden ser utilizados en varios ciclos de reacción y tiempo después de que se llevó a cabo la inmobilización.

6.2. Etapa 2 Síntesis enzimática del PGAL

Una vez realizadas las evaluaciones se escogieron las condiciones de síntesis del poli-(ácido gálico) en todos los inmobilizados y la enzima libre. Estas condiciones fueron establecidas tomando la mayor actividad encontrada a los diferentes pH's, y a una temperatura dada sin degradación del soporte. Siendo las condiciones de reacción: 25 °C a un pH de 5.5.

6.2.1 Rendimientos de reacción

La reacción del PGAL se llevó a cabo con los tres inmobilizados durante 48 horas;

tiempo en el cual los rendimientos encontrados para las síntesis llevadas a cabo en este trabajo se encuentran por debajo del 10% (tabla 6), López (2014) reportó un rendimiento superior al 80% en la síntesis de PGAL utilizando 50.0 U de enzima libre a las 24 horas de reacción. Las reacciones llevadas a cabo en este trabajo se realizaron colocando la cantidad de unidades de actividad enzimática equivalente en peso de enzima libre que correspondió a la cantidad de unidades de actividad enzimática de la enzima inmovilizada (0.07 U) que a su vez correspondió a un peso aproximado de 1.5 mg de enzima libre. De esta manera se pudo observar que la cantidad de enzima colocada influyó directamente en la cantidad de polímero obtenido. El producto es altamente recalcitrante de manera que cierta masa se pierde en el proceso de separación del PGAL ya que queda adherido al papel filtro Whatman. De igual manera la presencia del soporte vuelve más lenta la reacción de manera que el rendimiento es menor como consecuencia de que la reacción disminuye su velocidad por los mecanismos antes discutidos. Se realizó una prueba estadística de análisis de varianza de un factor para observar si existía diferencia significativa entre el rendimiento de síntesis de PGAL con enzima libre y el PGAL sintetizado con enzimas inmovilizadas, encontrándose que no existen diferencias significativas en los rendimientos de PGAL con enzima libre en comparación con los rendimientos de síntesis de PGAL con las 3 técnicas de inmovilización por lo que se pudo decir que tanto la síntesis con de PGAL con enzima libre como con enzima inmovilizada ofrecieron los mismos rendimientos colocando las mismas unidades de actividad enzimática. El análisis estadístico se presenta en el anexo 2 de este trabajo.

Tabla 6. Rendimientos de la producción de PGAL.

Técnica	Rendimiento (%)
PVA-PEG	5.2
PTMS	5.6
Silica	5.7
E. libre	6.1

6.2.2 Caracterización de los productos de reacción

La caracterización de los productos de reacción se llevó a cabo por medio de 4 técnicas instrumentales; la espectroscopia de infrarrojo, la resonancia magnética nuclear de protón, la cromatografía de permeación en gel y la conductividad por el método de las cuatro puntas.

6.2.2.1 Espectroscopía de infrarrojo (FTIR)

El fundamento de la espectroscopia, es la interacción entre la materia y la radiación (en sus diferentes longitudes de onda). La absorción de energía por átomos y moléculas y la emisión de energía radiante de estos. Esta técnica permitió observar los grupos funcionales presentes en las moléculas de polímero ya que estas se encuentran vibrando y al ser excitadas pasan de un estado vibracional a otro.

Los espectros de infrarrojo de los diferentes productos de reacción tanto para LTV libre como inmovilizada y el monómero se presentan en la figura 26. El espectro de infrarrojo del AG mostró bandas de 3500 y 3200 cm^{-1} que pertenecen al estiramiento del hidrógeno del grupo $-\text{OH}$ del carboxilo del ácido gálico dentro de esta banda posiblemente sobrelapada se puede encontrar la banda de estiramiento de los 3 grupos alcohólicos que están unidos al grupo bencénico que vibran alrededor de 3400 y 3200 cm^{-1} ; las bandas confirmatorias del carboxilo están cercanas a 1400 cm^{-1} que pertenecen a la torsión del grupo carboxilo y 1700 cm^{-1} que son de estiramiento, las bandas de los grupos alcohólicos se ubican en frecuencias de 1500 cm^{-1} y bandas de torsión confirmatorias en 600 cm^{-1} . Esto fue un indicio que la polimerización podría generar bandas más anchas debido al aumento de tamaño de la cadena de polímero y con ello la formación de nuevas interacciones debidas a la rigidez del polímero y a las interacciones entre cadenas de polímeros.

La presencia de múltiples átomos de oxígeno e hidrógeno generan una gran cantidad de puentes de hidrogeno que ensanchan las bandas de los grupos funcionales presentes en la molécula por lo que a esto se le puede atribuir que los sobretonos característicos de los grupos aromáticos ubicados entre 750 y 900 cm^{-1} no sean tan evidentes en los espectros mostrados. Igualmente las bandas de los

metilenos en la molécula se vuelven no tan pronunciadas debido a lo anteriormente mencionado.

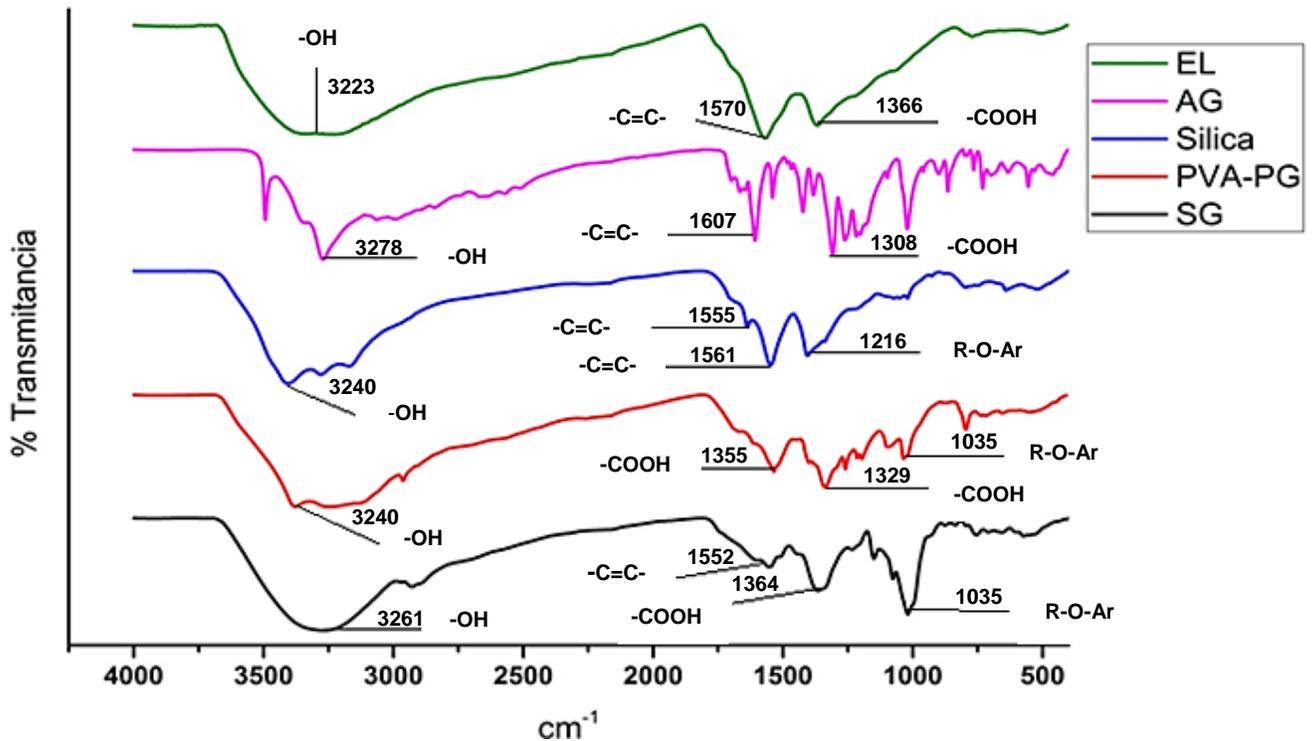


Figura 26 Comparación de los FTIR's de los diversos productos de reacción.

El espectro del polímero del PGAL sintetizado con LTV libre (figura 26) presentó bandas más anchas en comparación con el monómero, esto es una evidencia de la polimerización ya que existe la formación de cadenas de alto peso molecular, aumento de interacciones intramoleculares dentro de la cadena de polímero e interacciones intermoleculares entre cadena y cadena de polímero. Se observó la presencia de la banda característica del grupo carboxilo, por lo que este grupo funcional se ve inalterado por el proceso de polimerización por radicales libres. De igual manera se observó la presencia de las bandas características de los grupos hidroxilo, si estos oxígenos no se encontraran libres se observarían bandas de grupos éter aromáticos entre $1275-1020\text{ cm}^{-1}$, por lo que la presencia de enlaces fenil-oxi entre moléculas de monómero sintetizado con enzima libre quedó descartada. Con anterioridad Božič, Gorgieva, & Kokol (2012) realizaron la polimerización del AG utilizando la LTV como biocatalizador obteniendo productos con estructuras variadas encontrando en sus espectros de FTIR que para el

polímero de AG no solo se formó el enlace fenil-fenil si no una gran variedad de enlaces capaces de emitir vibraciones en otros números de onda, además dichos autores encontraron la posible oxidación previa a la polimerización del AG, esto utilizando como plantilla al quitosano. Los espectros encontrados para el AG y el polímero de AG encontrados por Božić y colaboradores se presentan en la figura 27.

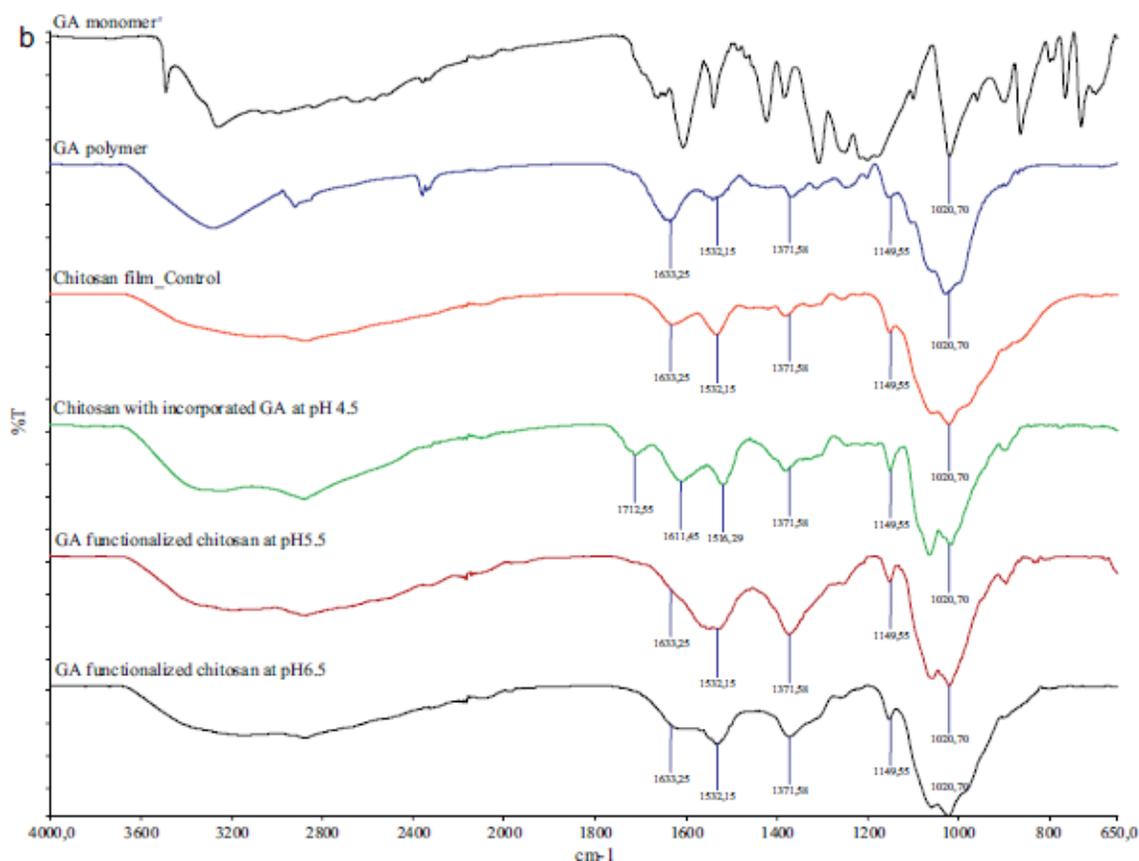


Figura 27 FTIR del polímero de AG. Tomada de Božić et al., 2012

La síntesis de PGAL con enzima libre rindió un polímero lineal a pesar de ser un polímero sintetizado con una catálisis por radicales libres que rinde polímeros con alto grado de ramificación (Billmeyer, 1973), de esta manera se pudo postular que únicamente se presentaron enlaces fenil-fenil basándose en la ausencia de las bandas vibraciones correspondientes a los protones enlazados a los carbonos sp^2 orto al grupo carboxilo.

Para los polímeros sintetizados con LTV inmovilizada utilizando las 3 técnicas de inmovilización se obtuvo un polímero que posiblemente distó de ser lineal (figura

26) como aquel que se obtuvo con enzima libre y se obtuvo un polímero más similar al mostrado en el espectro en la figura 27.

La síntesis de PGAL con LTV inmovilizada presentó la aparición de nuevas bandas, algunas de ellas aparecieron en el mismo intervalo de frecuencia que aquellas encontradas en el espectro del AG (monómero del PGAL), pero nuevamente mucho más anchas en comparación con las del monómero. Se encontró la banda de vibracional del grupo éter aromático en la síntesis de polímero con LTV inmovilizada en copolímero PVA-PEG y el PTMS, lo que indica que hay formación de enlaces fenil-oxi entre las moléculas de AG, estas bandas fueron confirmadas en el rango de $1075\text{-}1020\text{ cm}^{-1}$.

La presencia del grupo carboxilo fue sobrelapada por la fuerte vibración de los grupos hidroxilo del monómero, sin embargo el espectro del PGAL sintetizado con enzima libre sí presentó esta banda, lo que es un indicio que además de la formación de enlaces fenil-oxi hay una porción de la polimerización que está siguiendo un mecanismo que generó un polímero con enlaces de tipo fenil-carboxi. FTIR es una técnica útil para determinar que grupos funcionales se encuentran presentes dentro de una molécula, sin embargo, no permite postular la estructura inequívoca de la molécula. Los resultados encontrados para los 3 polímeros sintetizados con LTV inmovilizada evidenciaron que hay la formación de más de un tipo de enlace por lo tanto la presencia de más grupos funcionales derivados de una nueva posible estructura del polímero; ya que hay la presencia de más bandas que sustentaron este postulado.

6.2.2.2 Resonancia magnética nuclear de protón (RMN- ^1H)

La resonancia magnética nuclear de protón es una técnica que permite estudiar núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones como el átomo de ^1H , esto permite observar la conectividad de los átomos dentro de una molécula. Para obtener el polímero sintetizado con la LTV inmovilizada se utilizó la precipitación con un disolvente orgánico (etanol en este caso), el monómero del PGAL es soluble en etanol por lo que las señales encontradas en los espectros no es debida al AG. Retomando los resultados del % estabilidad a la agitación

Tesis

encontrados para los diferentes soportes (PVA-PEG y PTMS sol-gel), estos soportes presentaron alta estabilidad en condiciones de alta agitación, por lo que a las condiciones de síntesis del PGAL, se descartó la degradación del soporte y aparición de trazas de éste en los espectros ya anteriormente mostrados. De igual modo se hace notar que la silica es insoluble en medio acuoso e insoluble en etanol por lo que fue posible separar en su totalidad este soporte del medio de reacción descartándose de igual manera la contribución de este soporte a las señales encontradas en los espectros de RMN-¹H. Igualmente se recalca que la síntesis del PGAL se realizó en las condiciones de mayor estabilidad tanto térmica como de pH de los inmovilizados.

La resonancia magnética nuclear para la referencia de AG (figura 28) presentó un solo singulete en la zona aromática, la ampliación a la zona de este singulete pertenece a los protones que se encuentran en posición orto al carbono unido al grupo carboxilo, estos protones al encontrarse en el mismo ambiente químico resuenan con la misma intensidad y se encontraron en un desplazamiento químico de 7.00. Adicional a esta señal se presentó una señal que pertenece al disolvente utilizado que fue agua deuterada.

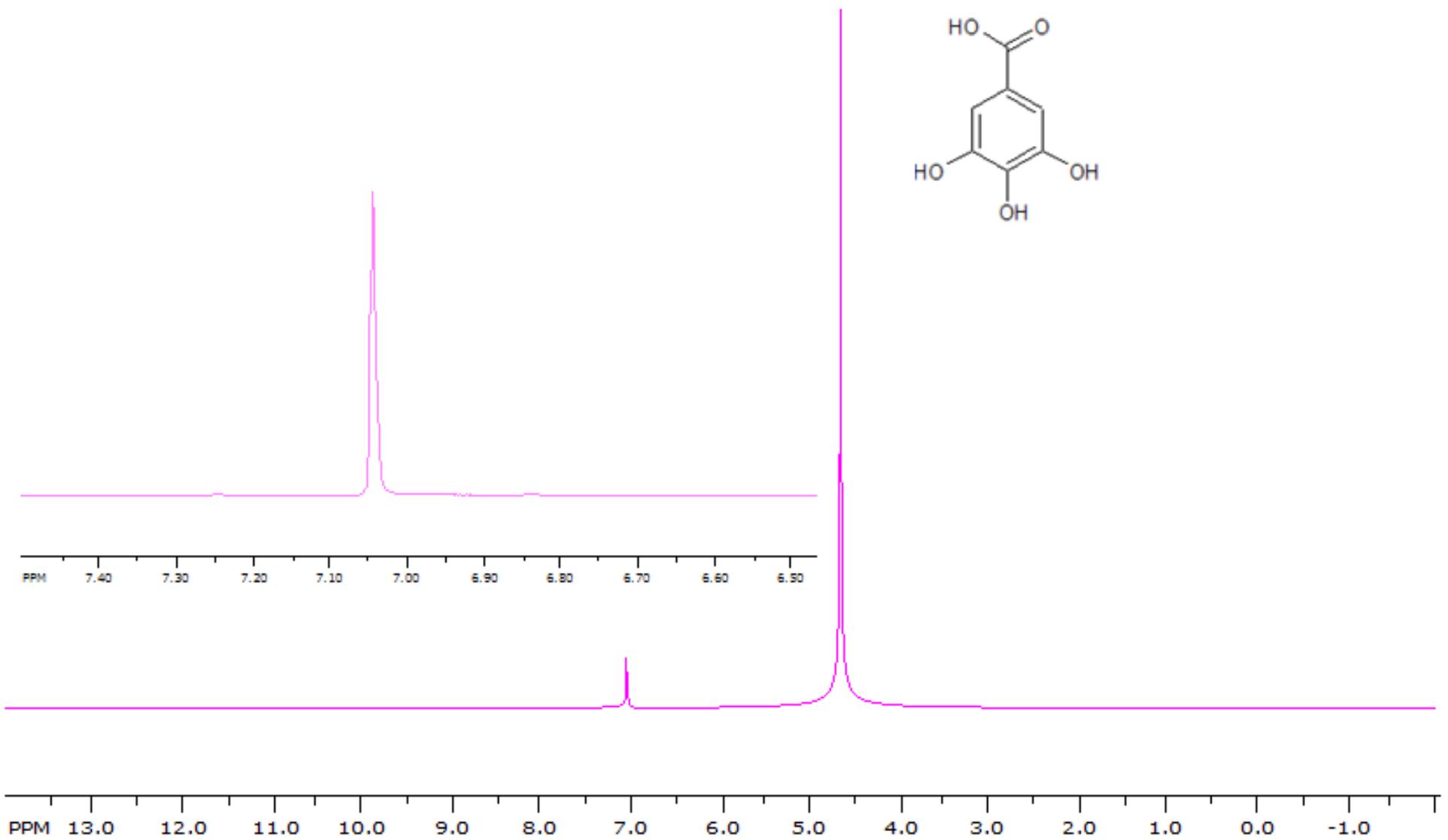


Figura 28 RMN- ^1H del AG

Tesis

La polimerización del AG realizada con enzima libre mostró el espectro de resonancia mostrado en la figura 29, donde se observó una única señal debida al disolvente utilizado que nuevamente fue agua deuterada. La ampliación de la zona aromática no mostró señales en contraste con la resonancia del monómero del PGAL (figura 28); esto mostró consistencias con el trabajo de López (2014) donde de igual manera se sintetizó PGAL utilizando enzima libre. La ausencia de la señal de los protones orto al carbono enlazado al carboxilo indicó un posible acoplamiento fenil-fenil entre las moléculas de monómero. El mecanismo de polimerización generado por la LTV libre indica que la generación de radicales se dio en los carbonos adyacentes al grupo carboxilo y la propagación de la reacción se dio de esta misma manera para generar un polímero sin evidentes ramificaciones.

Es importante recalcar el papel de la transferencia de masa al sitio activo de la LTV; ya que en el caso de la enzima libre no hubo tal transferencia dificultada por la presencia de un soporte lo que facilitó que la reacción siguiera un mecanismo tal que esta se propagó para generar un posible polímero lineal.

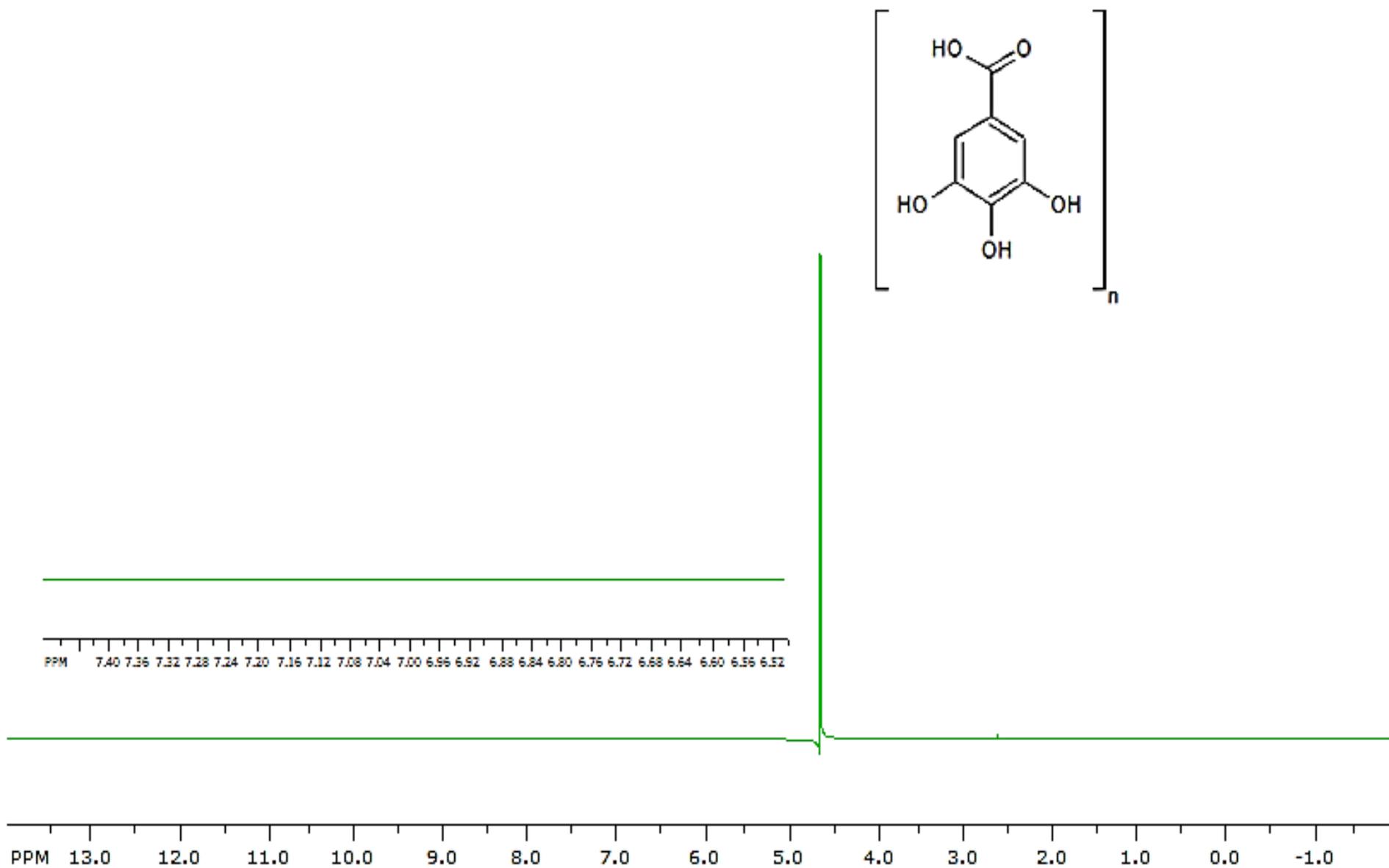


Figura 29 RMN- ^1H del PGAL sintetizado con LTV libre

Los espectros de RMN-¹H de los polímeros sintetizados con la LTV inmovilizada en diferentes soportes se presentan en las figuras 30 (copolímero PVA-PEG), 31 (PTMS) y 32 (sílica).

La polimerización del AG utilizando LTV inmovilizada en varios soportes condujo a la posible aparición de nuevos productos de reacción de diferente estructura al polímero sintetizado con la LTV libre. En los espectros encontrados se observó la señal característica de los protones orto al grupo carbono enlazado al grupo carboxilo, sin embargo esta señal apareció con una menor intensidad en los tres espectros para los tres polímeros, esto es un indicio que la síntesis de PGAL con LTV inmovilizada generó un nuevo tipo de estructura. La cinética de la reacción con LTV inmovilizada como ya se discutió con anterioridad es mucho más lenta que aquella con LTV libre además que la LTV inmovilizada por cuestiones relacionadas con la transferencia de masa tanto de productos como de reactivos. La obtención de un polímero con una estructura diferente a la obtenida con la síntesis LTV libre vino de la generación de radicales libres dentro del sitio activo de la LTV inmovilizada, estos radicales a diferencia de los radicales generados en la LTV libre tuvieron que difundir al exterior del soporte para poder reaccionar con el resto de monómero, sin embargo en la trayectoria de difusión pudieron encontrarse con algunas otras moléculas de AG propiciando el seguimiento a un nuevo mecanismo de reacción donde se pudieron formar nuevos tipos de enlace de tipo fenil-carboxi, fenil-oxi, además del enlace fenil-fenil reportado con anterioridad por colaboradores del laboratorio.

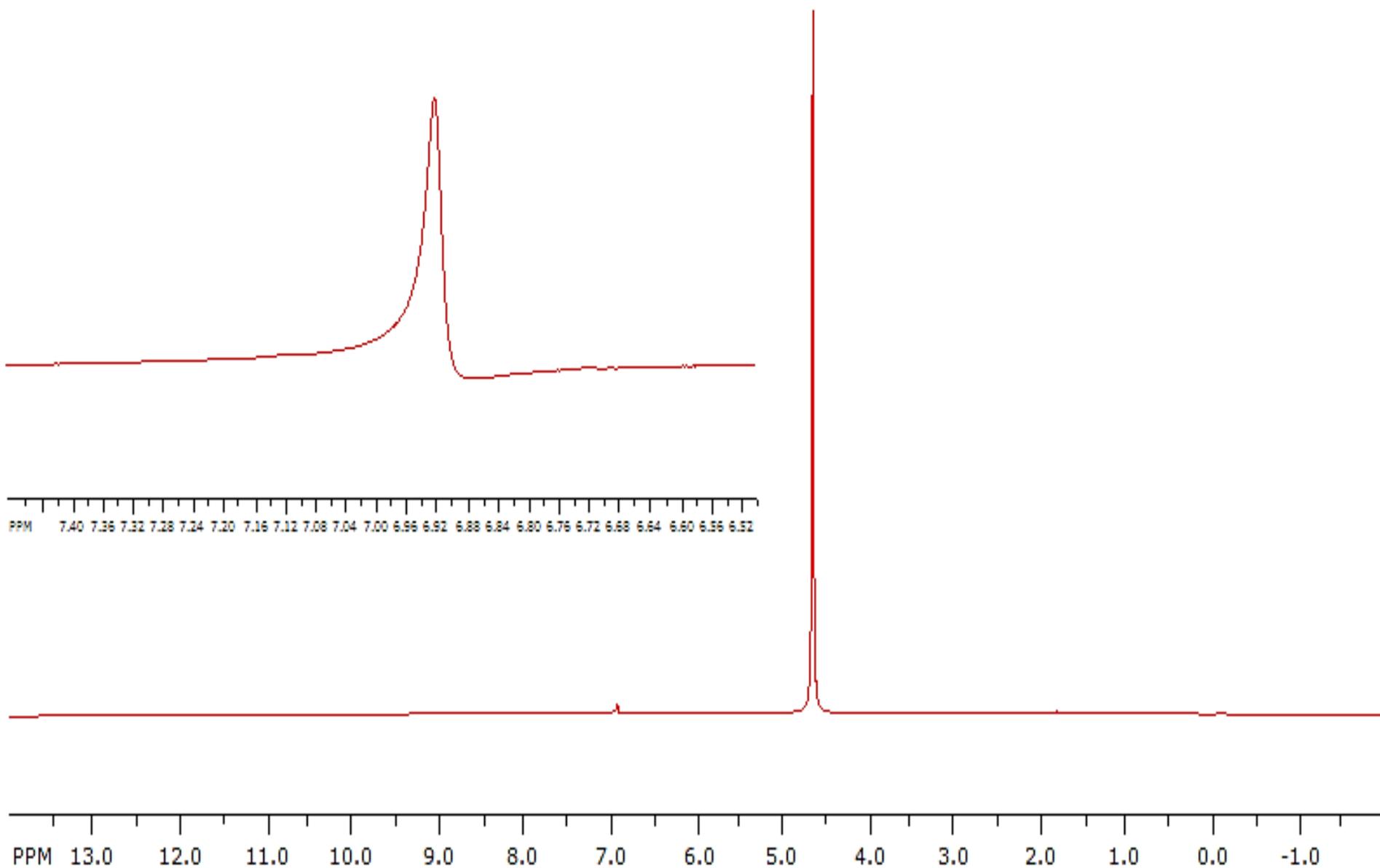


Figura 30 RMN- ^1H del PGAL sintetizado con LTV inmovilizada en copolímero PVA-PEG

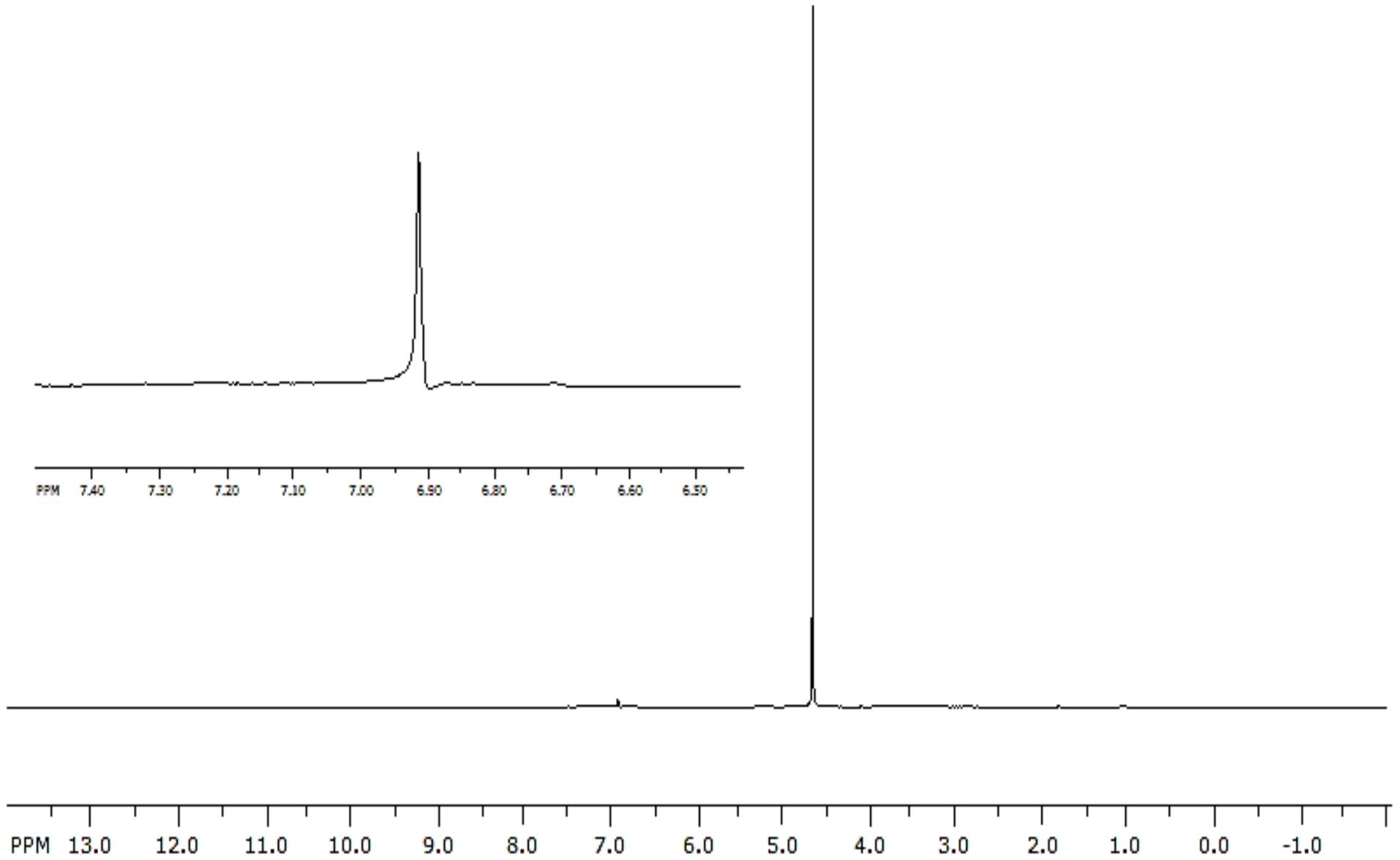


Figura 31 RMN- ^1H del PGAL sintetizado con LTV inmovilizada en PTMS con un intermediario sol-gel

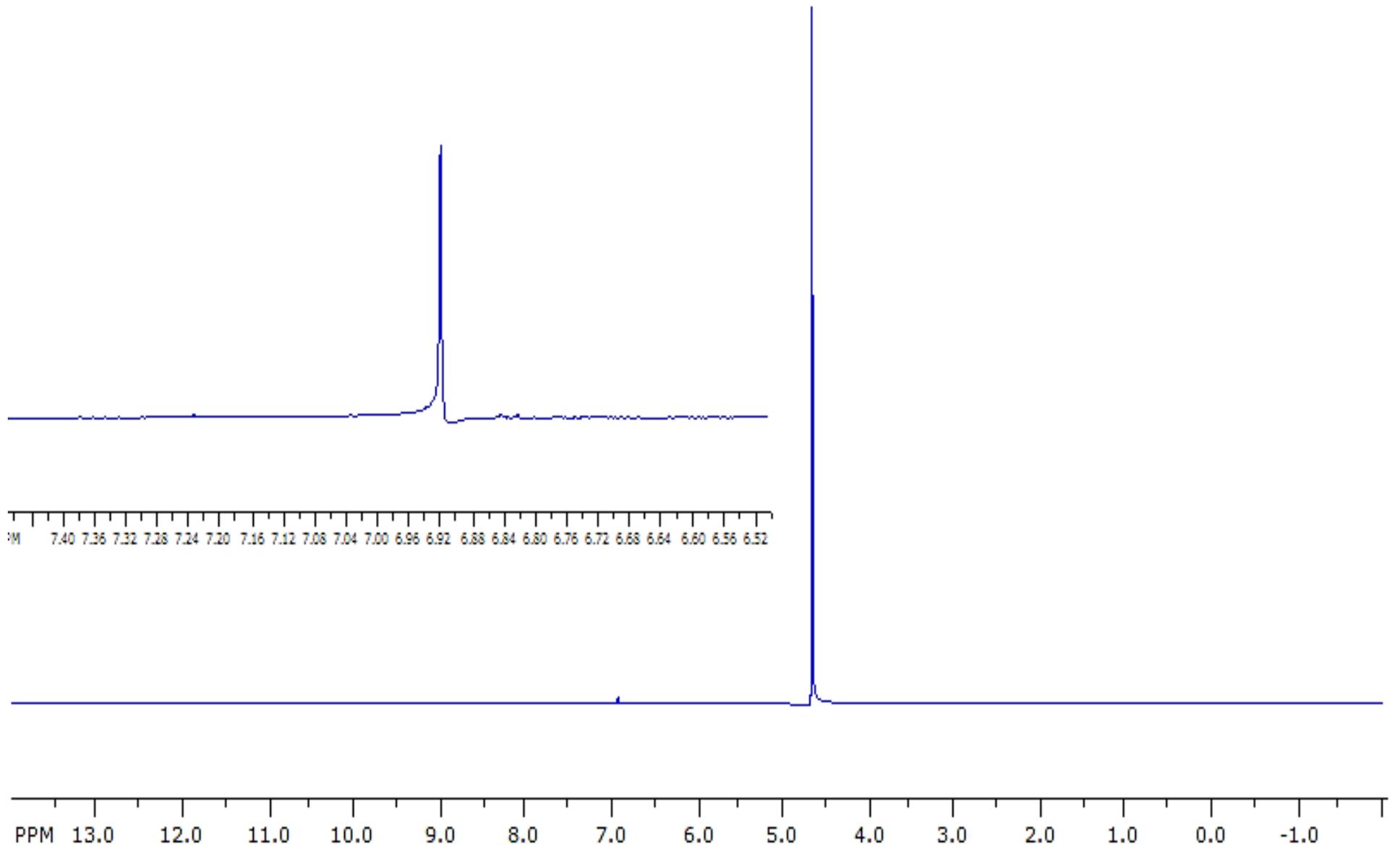


Figura 31 RMN- ^1H del PGAL sintetizado con LTV inmovilizada en silica-gel

De las determinaciones discutidas con anterioridad se postuló que la síntesis de PGAL utilizando LTV inmovilizada en diferentes soportes posiblemente pudo generar un polímero con una estructura similar a la de la lignina, cuya estructura se presenta en la figura 10 del presente trabajo.

6.2.2.3 Peso molecular

La determinación del peso molecular realizada por GPC presentó los resultados resumidos en la tabla 7.

Tabla 7 Resultados de GPC, peso promedio en número (Mn) peso promedio en peso (Mw) e índice de polidispersidad (PDI) de los diferentes PGAL sintetizados enzimáticamente

Técnica	Mn	Mw	PDI
PVA-PEG	1146.5±143.5	1826.0±1206.3	1.8765±1.3050
PTMS	1040.0±12.7	2821.5±310.4	2.7780±0.2644
Adsorción	1060±69.3	2655.0 ±389.0	2.6550±0.3890
E. libre	4084±186.7	5330.5±210.0	1.3780±0.1112

Se realizó un análisis de varianza de los valores de Mn, Mw y PDI correspondiente a los polímeros sintetizados con LTV inmovilizada en PTMS y adsorción en silica-gel únicamente, ya que tanto la varianza del PDI como el Mw correspondientes al polímero sintetizado con LTV inmovilizada en copolímero PVA-PEG presentaba un valor muy alto; se encontró que para en los casos existía diferencia significativa en los diferentes tratamientos por lo que se procedió a realizar un análisis estadístico de Tukey para encontrar en que grupos había diferencia significativa. Nuevamente se encontró que existían diferencias significativas entre los pesos moleculares y el PDI del PGAL sintetizado con LTV libre y aquel sintetizado con LTV inmovilizada confirmando lo mostrado en la tabla 7. La LTV inmovilizada pudo sintetizar polímeros de menor peso molecular, pero más polidispersos. Los análisis estadísticos se muestran en el anexo 2. El peso molecular de los polímeros es una propiedad de gran importancia que dicta muchas de las propiedades de un polímero. Los parámetros de Mn, Mw y el PDI son indicativos de estos. El peso molecular del PGAL sigue un patrón de campana Gaussiana de manera que el Mn

hace referencia a el peso total de todas las moléculas poliméricas contenidas en una muestra, dividido por el número total de moléculas en dicha muestra; mientras que el Mw está basado en el hecho de que una molécula más grande contiene más de la masa total de la muestra polimérica que las moléculas pequeñas (Odian, 1970). La polimerización utilizando la LTV libre presentó un PDI cercano a 1, esto quiere decir que la distribución de pesos es una campana de tipo Gaussina más estrecha. El PGAL sintetizado con enzima libre presenta una mayor homogeneidad en cuanto a los pesos moleculares de las diferentes cadenas presentes, el peso molecular de las cadenas de PGAL fue evaluado por López (2014) rindiendo polímeros de alto peso molecular, y para el presente trabajo de igual manera se realizó la síntesis de PGAL con LTV libre rindiendo de igual manera un polímero de elevado peso molecular. Es importante hacer notar que para el caso de polimerizaciones que siguen el mecanismo de radicales libres se presentan índices de polidispersidad elevados debido a la reactividad de los radicales libres que pueden causar que el polímero tenga alto grado de ramificaciones ya que el crecimiento de las cadenas poliméricas es de tipo exponencial (Billmeyer, 1973).

Las moléculas de PGAL sintetizadas con los diferentes inmovilizados de LTV presentaron PDI's mayores en comparación con el PGAL sintetizado con LTV libre, los mecanismos de transferencia de masa del monómero y la posterior difusión del radical libre del centro catalítico al medio de reacción ocasionaron que las cadenas poliméricas del PGAL fueran construidas de manera irregular obteniéndose distribuciones Gaussianas más amplias en comparación con la distribución de pesos obtenidos con la síntesis de PGAL con LTV libre donde la campana se encuentra coleada o cabeceada debido al efecto Tromsdorff que es comúnmente encontrado en polimerizaciones por radicales libres como la polimerización vinílica. Los hechos anteriormente encontrados confirman que los mecanismos de transferencia de masa que rigen la polimerización del ácido gálico catalizada por LTV inmovilizada en diferentes soportes permitió rendir polímeros de menor peso molecular, lo que dio un indicio de que la inmovilización de la LTV es una técnica útil para obtener polímeros de pesos moleculares menores a los reportados por López (2014) y los sintetizados en el presente trabajo usando LTV libre.

6.2.2.4 Conductividad.

La medición de la conductividad por el método de las cuatro puntas para los cuatro diferentes materiales sintetizados enzimáticamente se resume en la Tabla 8.

Tabla 8. Conductividades de los diferentes PGAL sintetizados enzimáticamente

PGAL	Conductividad (S/m)	Tipo de polímero
Enzima libre	3.2×10^{-5}	Semiconductor
PVA-PEG	2.0×10^{-5}	Semiconductor
PTMS	2.6×10^{-5}	Semiconductor
Sílica	2.0×10^{-5}	Semiconductor

La medición de la conductividad de los diferentes polímeros sintetizados es un indicativo de la estructura de estos y qué tipo de enlace se presentó en los diferentes polímeros sintetizados con las diferentes técnicas de inmovilización. Shirakawa, Louis, MacDiarmid, Chiang, & Heeger (1997) reportaron un aumento en la conductividad del poliacetileno cuando estos se hacían interaccionar con halógenos; el poliacetileno contaba con la propiedad de ser una molécula con sistemas de dobles enlaces conjugados por lo cual puede comportarse como un semiconductor. Al igual que el poliacetileno, el PGAL cuenta con un sistema insaturado de tipo aromático. La presencia de estos sistemas conjugados brinda a las moléculas cierta deslocalización electrónica. Para que un polímero sea considerado como un polímero semiconductor tiene que presentar una conductividad del orden de 10^{-2} a 10^{-9} . Los resultados obtenidos con la medición de la conductividad por el método de las cuatro puntas mostraron que todos los polímeros sintetizados con las diferentes técnicas de inmovilización presentan una conductividad que entró dentro del intervalo para ser considerados semiconductores a pesar de que presentan un menor peso molecular que el PGAL sintetizado con enzima libre. Los estudios realizados por López (2014) indicaron que solo hay la formación de un único tipo de enlace, el enlace fenil-fenil, y este es el responsable de que la molécula de PGAL presente propiedades de semiconductor; sin embargo los resultados encontrados en el presente trabajo

Tesis

respaldados por los espectros de FTIR y RMN-¹H mostraron la posible presencia de enlaces de varios tipos, tanto de tipo fenil-oxi, fenil-fenil y fenil-carboxi entre las moléculas de monómero, sin embargo la presencia de varios tipos de enlaces en la molécula no repercutió en la conductividad medida, es decir la presencia de un único tipo de enlace no es determinante para que el polímero presente actividad optoelectrónica, este tipo de comportamientos de igual manera se presentan en polímeros como la polianilina, policloruro de p-cresol fenileno, poli(p-fenileno etileno) y polifluoreno que no presentan enlaces de tipo fenil-fenil si no de tipo fenil-heteroátomo-fenil o fenil-carbono sp³-fenil o fenil-carbono sp-fenil (Gagnon, Capistran, Karasz, Lenz, & Antoun, 1987; Fridman, 1977)

7. Conclusiones.

- Se logró inmovilizar a la LTV utilizando varias técnicas de inmovilización enzimática y con diferentes soportes con un porcentaje muy alto de inmovilización; la LTV inmovilizada conservó su actividad enzimática y la enzima inmovilizada se pudo reutilizar en varios ciclos de reacción.
- Las mejores condiciones para llevar a cabo la síntesis del PGAL con enzima inmovilizada fueron pH 5.5, a una temperatura de 25°C ya que a estas condiciones se presentó una mayor estabilidad, y actividad.
- La inmovilización de la LTV utilizando la adsorción sobre silica presentó varios inconvenientes debido a la dependencia del fenómeno de adsorción tanto a la temperatura como al pH (cambio de cargas en la superficie de la enzima). Además presentó menores ciclos de reuso en comparación a las otras técnicas evaluadas. Sin embargo, al igual que las otras técnicas de inmovilización, brindó la posibilidad de obtener polímeros de bajo peso molecular.
- Las técnicas de atrapamiento empleadas; tanto en el copolímero PVA-PEG como el PTMS presentaron una mayor cantidad de ciclos de reuso y le brindaron a la enzima un mayor intervalo de actividad a diferentes pH's al crear un microambiente propicio para la actividad enzimática. Sin embargo estos soportes no tienen una gran estabilidad a temperaturas altas ya que se degradan y lixivian enzima por lo que no son del todo útiles en sistemas a temperaturas elevadas.
- Se obtuvieron polímeros de peso molecular menor a los reportados en anteriores trabajos del laboratorio por lo que la inmovilización es una técnica útil para controlar los pesos moleculares del polímero sintetizado.
- El polímero sintetizado posiblemente presentó estructura diferente al sintetizado únicamente con enzima libre, debido a los diferentes mecanismos que dominan la catálisis enzimática de la LTV inmovilizada.
- El PGAL sintetizado a pesar de su posible nueva estructura conserva la propiedad de ser un polímero semiconductor.
- Al medir la actividad enzimática de los inmovilizados posterior a la reacción

de síntesis de PGAL se encontró la inactivación total de la enzima posiblemente por la quelación de los átomos de cobre por las moléculas de polímero y de monómero, esto se ha reportado con anterioridad por (Badhani, Sharma, & Kakkar, 2015).

8. Perspectivas

- Probar nuevas técnicas de inmovilización para la LTV.
- Llevar a cabo la síntesis del PGAL con LTV inmovilizada en diferentes soportes a los utilizados en este trabajo.
- Determinar si las condiciones de reacción para las nuevas técnicas de inmovilización se modifican por efecto de utilizar un soporte diferente.
- Usar nuevos sustratos para la LTV inmovilizada con la intención de observar si se modifica alguno de los parámetros evaluados en el presente trabajo
- Utilizar los inmovilizados de LTV para su aplicación en algún otro campo.
- Mejorar los rendimientos de la síntesis del PGAL utilizando a la LTV inmovilizada
- Determinar de manera más precisa e inequívoca la estructura del PGAL sintetizado con enzima inmovilizada utilizando otras técnicas instrumentales.
- Realizar el resto de las evaluaciones optoeléctricas del PGAL sintetizado con enzimas inmovilizadas, una de ellas es en celdas electrocrómicas las cuales consisten en cronoamperometría acoplada y no acoplada a UV, cronocoulombimetría acoplada y no acoplada a UV.
- Realizar evaluaciones optoeléctricas del PGAL sintetiza con enzimas inmovilizadas para de diodos poliméricos de emisión de luz que consisten en pruebas de fluorescencia, pruebas de emisión de luz para observar la capacidad del polímero para emitir luz blanca, luz verde, luz roja y luz azul.
- Evaluar la posible inactivación de la enzima ocasionada ya sea por el PGAL o el AG.

9. Anexos

9.1 Anexo 1 Curva patrón BSA

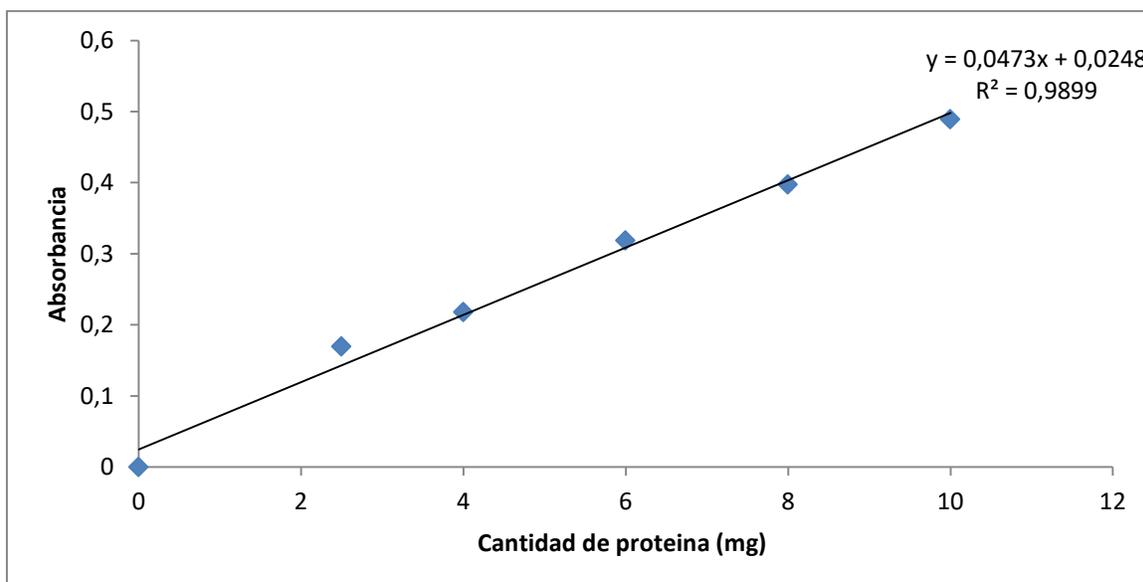


Figura 33 Curva patrón de ASB utilizada para la cuantificación de proteína en los lavados acuosos provenientes del proceso de inmovilización con la cual se determinó el % de inmovilización.

El coeficiente de correlación asociado a la regresión lineal fue de 0.989; este coeficiente de correlación es alto y se consideró que las soluciones de BSA a diferentes concentraciones presentan un comportamiento lineal por lo que es posible a partir de esta curva interpolando los valores de absorbancia y con ayuda de la ecuación de la recta determinar la concentración de proteína en las muestras problema provenientes de los lavados. La fuente de variación del coeficiente se debe a que todos los residuos aromáticos de la proteína no reaccionaron por completo con el reactivo de Bradford por lo que las especies que absorben a una longitud de onda de 595 nm no fueron detectadas por el espectro en el instante de la cuantificación, otros errores asociados a ésta determinación son errores experimentales como una técnica incorrecta de pipeteo.

9.2 Anexo 2 Análisis estadístico de las evaluaciones realizadas

Análisis estadístico de la actividad enzimática.

Para todos los análisis estadísticos se utilizó un nivel de confianza del 95% que correspondió a un $\alpha = 0.05\%$.

Los criterios de aceptación en todos los análisis fueron los siguientes:

- Si la F de tablas es mayor que el valor de f calculada se acepta H_0 .
- Si la F de tablas es menor que el valor de f calculada se rechaza H_0 .

Los valores de la f calculada y la f de tablas para las distintas anovas se presentan en la tabla 9.

Tabla 9 Resultados del análisis estadístico de las evaluaciones realizadas

Determinación	$F_{\text{Calculada}}$	$F_{\text{Teórica}}$	Conclusión	Prueba post-hoc
Actividad enzimática	1131.273	4.066	Se rechaza H_0	Tukey
Rendimiento	1.291	4.066	Se acepta H_0	-
Mn	298.579	6.591	Se rechaza H_0	Tukey
Mw	45.123	9.552	Se rechaza H_0	Tukey
PDI	17.101	9.552	Se rechaza H_0	Tukey
Termoactividad Enzima libre	5.678	2.866	Se rechaza H_0	Tukey
Termoactividad PVA-PEG	0.881	2.866	Se acepta H_0	-
Termoactividad PTMS	0.907	2.866	Se acepta H_0	-
Termoestabilidad Enzima libre	7.243	2.866	Se rechaza H_0	Tukey
Termoactividad PVA-PEG	0.176	2.866	Se acepta H_0	-
Termoactividad PTMS	0.234	2.866	Se acepta H_0	-
pH Enzima libre	3.089	2.866	Se rechaza H_0	-
pH PVA-PEG	0.061	2.866	Se acepta H_0	-
pH PTMS	0.043	2.866	Se acepta H_0	-

Cuando se encontraron diferencias significativas se procedió a realizar una prueba post-hoc para determinar que tratamientos tenían diferencias significativas, los criterios de aceptación se presentan a continuación.

Tesis

- Valor absoluto de la diferencia de las medias aritméticas > HSD: existe diferencias significativas entre los tratamientos.
- Valor absoluto de la diferencia de las medias aritméticas < HSD: no existen diferencias significativas entre los tratamientos.

De esta manera se construyeron las siguientes tablas donde los tratamientos con diferencias significativas se sombreen de color rojo.

Tabla 10 Diferencias de las medias aritméticas de los diferentes Mn

	PVA-PEG	PTMS	Sílica
Libre	2937.5	3044.0	3024.0
PVA-PEG		106.5	86.5
PTMS			20.0

Tabla 11 Diferencias de las medias aritméticas de los diferentes Mw

	PTMS	Sílica
Libre	2439.0	2675.5
PTMS		236.5

Tabla 12 Diferencias de las medias aritméticas de los diferentes PDI.

	Libre	PTMS	Sílica
Libre		1.4709	-1,3472
PTMS			0,1237
Sílica			

9.3 Anexo 3 Cálculos de la medición de actividad

Se utilizaron las siguientes ecuaciones para calcular las unidades de actividad enzimática específica tanto para enzima libre como para enzima inmovilizada.

$$EL = \frac{m * V}{\epsilon * d * Ve * Ce}$$

Ecuación 1 Ecuación para el cálculo de actividad enzimática de la enzima libre

$$EL = \frac{m * V}{\epsilon * d * Cs}$$

Ecuación 2 Ecuación para el cálculo de actividad enzimática de la enzima inmovilizada

EL: Actividad enzimática específica $\left(\frac{U}{mgproteína} \right)$

m: Pendiente $\left(\frac{1}{\text{min}}\right)$

V: Volumen de reacción (mL)

ϵ : Coeficiente de extinción molar $\left(\frac{\text{ml}}{\mu\text{mol}\cdot\text{cm}}\right)$

d: Diámetro de la celda (cm)

Ve: Volumen de enzima (mL)

Ce: Cantidad de enzima (mg)

Cs: Cantidad de enzima en el soporte (mg)

9.4 Anexo 4 Ecuación modificada de Michaelis-Menten para enzimas inmovilizadas

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{k_m' + [S]}$$

Donde

$$k_m' = k_m + \left(\frac{X \cdot V_{\max}}{D}\right) \left(\frac{R \cdot T}{R \cdot T - X \cdot Z \cdot F \cdot V}\right)$$

V= velocidad inicial

V_{max}= velocidad máxima

[S] = concentración de sustrato

K_m= constante de Michaelis-Menten

K_m'= constante aparente de Michaelis-Menten

X= espesor de la capa de Nerst

D= coeficiente difusión

R= constante universal de los gases

T= temperatura

Z= carga del sustrato

F= constante de Faraday

V= gradiente de potencial en el soporte

10. Bibliografía

- Albini, A., Noonan, D. M., & Ferrari, N. (2007). Molecular pathways for cancer angioprevention. *Clinical Cancer Research*, 13(15), 4320–4325.
- Alto, P. (2000). A Novel method for Removing Phenols from Grape Must. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51(4):357-361
- Badhani, B., Sharma, N., & Kakkar, R. (2015). Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *Royal Society of Chemistry Advances*, 5(35), 27540–27557.
- Bauer, C. G., Kühn, A., Gajovic, N., Skorobogatko, O., Holt, P.-J., Bruce, N. C. Scheller, F. (1999). New enzyme sensors for morphine and codeine based on morphine dehydrogenase and laccase. *Journal of Analytical Chemistry*, 364(1–2), 179–183.
- Beniwal, V., Chhokar, V., Singh N., Sharma J.J. (2010). Optimization of Process Parameters for the Production of Tannase and Gallic Acid by Optimization of Process Parameters for the Production of Tannase., *American Journal of Science*, 6(1), 389-397.
- Bento, I., Carrondo, M. A., & Lindley, P. F. (2006). Reduction of dioxygen by enzymes containing copper. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 11(5), 539–547.
- Bertrand, G. (1896). Sur la presence simultanee de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances del Academie des Sciences*. 123(1), 463-465
- Besednjak, A.: *Materiales compuestos*. Ediciones UPC. ISBN: España., 2005.
- Billmeyer F.W, “Ciencia de los Polímeros”, 2^{da} Ed. Reverte, Barcelona., 1973.
- Božić, M., Gorgieva, S., & Kokol, V. (2012). Laccase-mediated functionalization of chitosan by caffeic and gallic acids for modulating antioxidant and antimicrobial properties. *Carbohydrate Polymers*, 87(4), 2388–2398.
- Cañas, A. I., & Camarero, S. (2010). Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnology Advances*, 28(6), 694–705.
- Cárdenas, W., & Dankert, J. R. (2000). Cresolase, catecholase and laccase activities in haemocytes of the red swamp crayfish. *Fish & Shellfish Immunology*, 10(1), 33–46.

- Casaban D., (2014). Inmovilización y estabilización de lacasas para su uso en celdas de biocombustibles. Tesis de licenciatura., Universidad de Paraguay, Facultad de Ingeniería.
- Chelikani, R., Kim, Y. H., Yoon, D. Y., & Kim, D. S. (2009). Enzymatic polymerization of natural anacardic acid and antibiofouling effects of polyanacardic acid coatings. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157(2), 263–277.
- Claus, H. (2003). Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives of Microbiology*, 179(3), 145–150.
- Clutterbuck, A. J. (1972). Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 70(3), 423–435.
- Díaz. R., (2012) Efecto antibacteriano del ácido gálico y de la catequina sobre *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli*., Tesis de licenciatura., Universidad de Chile.
- Durán, N., & Esposito, E. (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: A review. *Applied Catalysis B: Environmental*, 28(2), 83–99.
- Eker, B., Zagorevski, D., Zhu, G., Linhardt, R. J., & Dordick, J. S. (2009). Enzymatic polymerization of phenols in room-temperature ionic liquids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59(1–3), 177–184.
- Espino González, A. (2016). Evaluación de la capacidad antioxidante por EPR del poli(ácido gálico) sintetizado enzimáticamente. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química.
- Farnet, A. A. M., Criquet, S., Pocachard, E., Gil, G., & Ferre, E. (2016). Mycological Society of America Purification of a New Isoform of Laccase from a *Marasmius quercophilus* Strain Isolated from a Cork Oak Litter (*Quercus suber* L.). *Mycological Society of America Stable*, 94(5), 735–740.
- Fernandes, P., Marques, M. P. C., Carvalho, F., & Cabral, J. M. S. (2009). A simple method for biocatalyst immobilization using PVA-based hydrogel particles. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84(4), 561–564.
- Filip, Z., Claus, H., 1995. Effects of soil minerals on the microbial formation of enzymes and their possible use in remediation of chemically polluted sites. Environmental impacts of soil component interactions. CRC Press, Boca Raton, 30, 407–419,
- Fridman. (1974). Simultaneous polymerization and formation of polyacetylene film on the surface of concentrated soluble Ziegler-type catalyst solution. *Journal of*

Polymer Science-Polymer Chemistry Edition, 12(1), 11–20.

- Fridman. (1977). Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacetylene, (CH). *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (16), 578–580.
- Furukawa, T., Bello, F. O., & Horsfall, L. (2014). Microbial enzyme systems for lignin degradation and their transcriptional regulation. *Frontiers in Biology*, 9(6), 448–471.
- Gagnon, D. R., Capistran, J. D., Karasz, F. E., Lenz, R. W., & Antoun, S. (1987). Synthesis, doping, and electrical conductivity of high molecular weight poly(p-phenylene vinylene). *Polymer*, 28(4), 567–573.
- Gamelas, J. A. F., Tavares, A. P. M., Evtuguin, D. V., & Xavier, A. M. B. (2005). Oxygen bleaching of kraft pulp with polyoxometalates and laccase applying a novel multi-stage process. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 33(3–6), 57–64.
- Gleiter, H. Nanostructured materials: State of the art and perspectives. *Nanostructured Materials*, WILEY-VCH, 6: 3-14, 1995.
- Hartmeier, W. (1985). Immobilized biocatalysts - From simple to complex systems. *Trends in Biotechnology*, 3(6), 149–153.
- Hassett, J. E., Zak, D. R., Blackwood, C. B., & Pregitzer, K. S. (2009). Are basidiomycete laccase gene abundance and composition related to reduced lignolytic activity under elevated atmospheric NO₃⁻ Deposition in a northern hardwood forest?, *Microbial Ecology*, 57(4), 728–739.
- Heinzkill, M., Bech, L., Halkier, T., Schneider, P., & Anke, T. (1998). Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (family Coprinaceae). *Applied and Environmental Microbiology*, 64(5), 1601–1606.
- Holm, R. H., Kennepohl, P., & Solomon, E. I. (1996). Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology. *Chemical Reviews*, 96(7), 2239–2314.
- Hornby, W.E.; Lilley, M.D.; Crook, E.M. (1968). Some changes in the reactivity of enzymes resulting from their chemical attachment to water-insoluble derivatives of cellulose. *Biochemistry Journal*, 107(1), 669-674.
- Kamitaka, Y., Tsujimura, S., Setoyama, N., Kajino, T., & Kano, K. (2007). Fructose/dioxygen biofuel cell based on direct electron transfer-type bioelectrocatalysis. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 9(15), 1793–1801.
- Katime I, Katime O y Katime D., (2014), Los materiales inteligentes de este milenio:

Los hidrogeles macromoleculares. Síntesis, propiedades y aplicaciones. Servicio editorial Universidad del país Vasco, España.

- Kistler, S. S., & Caldwell, A. G. (1933). Thermal Conductivity of Silica Aerogel. ***Industrial & Engineering Chemistry***, 26(6), 658–662.
- Kricheldorf; H.R., Stukenbrock, J.J. (1998). New polymer syntheses XCIII. Hyperbranched homo- and copolyesters derived from gallic acid and β -(4-hydroxyphenyl)-propionic acid. ***Journal of Polymer Science Part A Polymer Chemistry***, 36(1), 2347-2357.
- Kunamneni, A., Plou, F. J., Ballesteros, A., & Alcalde, M. (2008). Laccases and their applications: a patent review. ***Recent Patents on Biotechnology***, 2(1), 10–24.
- Larsson, S., Cassland, P., Jonsson, L.J. (2001) Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase. ***Applied Environmental Microbiology***, 67(1), 1163–1170.
- Lee, Y. Y., Prashant, I., & Torget, R. W. (1999). Dilute-Acid Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass. *Advances In Biochemical Engineering/Biotechnology*, 65(1), 94–115.
- Lopez, C., (2014)., Síntesis enzimática de materiales polifenólicos semiconductores. Tesis doctoral. México: UNAM
- López, J., Hernández-Alcántara, J. M., Roquero, P., Montiel, C., Shirai, K., Gimeno, M., & Bárzana, E. (2013). *Trametes versicolor* laccase oxidation of gallic acid toward a polyconjugated semiconducting material. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, 97(1), 100–105.
- Lozinsky, V. I., & Plieva, F. M. (1998). Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 3. Overview of recent research and developments. ***Enzyme and Microbial Technology***, 23(3–4), 227–242.
- Madhavi, V., & Lele, S. S. (2009). Laccase: Properties and applications. ***BioResources***, 4(4), 1694–1717.
- Malkin, R. & Malmstrom, B.G. 1970. The state and function of copper in biological systems. ***Advances in Enzymology***, 33(1), 177–244.
- Margolin, A. L. (1996). Novel crystalline catalysts. ***Trends in Biotechnology***, 14(7), 223–230.
- Martinek, K., & Mozhaev, V. V. (1985). Immobilization of enzymes: an approach to fundamental studies in biochemistry. ***Advances in Enzymology and Related***

Areas of Molecular Biology, 57, 179–249.

- Mayer, A. M., & Staples, R. C. (2002). Laccase: New functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, 60(6), 551–565.
- Montiel Pacheco, C., (2008), Estudio de la oxidación biocatalítica de compuestos heteroatómicos por la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* en medio orgánico. Tesis doctoral. México: IMP
- Morozova, O. V, Shumakovich, G. P., Gorbacheva, M. A., Shleev, S. V, & Yaropolov, A. I. (2007). “Blue” Laccases. **Biochemistry Moscow**, 72(10), 1136–1150.
- Nicholls, D. G. y Ferguson, S.J., Bioenergetics, 3a ed., London, Academic Press, 2002.
- Nilsson K, Birnbaum S, Flygare S, Linse L, Schröder U, Jeppsson U, Larsson P-O, Mosbach K, Brodelius P. (1983). A general method for the immobilization of cells with preserved viability. **European Journal of Applied Microbiology Biotechnology**, 17:319–326
- Odian G., Principles of Polymerization, Mc. Graw Hill inc. New York (1970).
- Osawa, R., Walsh, T. P., & Osawalt, R. (1993). Visual Reading Method for Detection of Bacterial Tannase. **Applied and Environmental Microbiology**, 59(4), 1251–1253.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B., & Sannia, G. (2000). Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, 66(3), 920–924.
- Prüsse, U., Hörold, S., Vorlop, K.-D., Verkapselung mikroskopischer Katalysatoren in gelförmigen Polymernetzwerken. **Chemie Ingenieur Technik**, 1997, 69(1), 100–103.
- Reinhammar BRM. (1984) .Laccase. In: Lontie R Copper proteins and copper enzymes. CRC Press, Boca Raton, 3(1), 1–35.
- Rehmann, L., Ivanova, E., Ferguson, J. L., Gunaratne, H. Q. N., Seddon, K. R., & Stephens, G. M. (2012). Measuring the effect of ionic liquids on laccase activity using a simple, parallel method. **Green Chemistry**, 14(3), 725–733.
- Romero, A. (2016), Síntesis y caracterización de películas de poli-(ácido gálico) entrecruzado con carboximetilcelulosa con potenciales aplicaciones biomédicas, Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de México, Facultad de química.

Tesis

- Shirakawa H., Louis E.W., MacDiarmid A.G., Chiang C.K & Heeger A. J. (1977). Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacetylene, $(CH)_x$, **Journal of Chemistry Society. Chemistry Community**, 578-580..
- Singh B.D., (2003) Biotechnology expanding horizons. Kalyani Publishers., Kalyani, India. 2^oed, 844.
- Solomon, E. I., Sundaram, U. M., & Machonkin, T. E. (1996). Multicopper Oxidases and Oxygenases. **Chemical Reviews**, 96(7), 2563–2606.
- Stahl, P., Kissau, L., Mazitschek, R., Giannis, A., & Waldmann, H. (2002). Natural product derived receptor tyrosine kinase inhibitors: Identification of IGF1R, Tie-2, and VEGFR-3 inhibitors. **Angewandte Chemie - International Edition**, 41(7), 1174–1178.
- Suhrenbrock, L., Radtke, G., Knop, K., & Kleinebudde, P. (2011). Suspension pellet layering using PVA-PEG graft copolymer as a new binder. **International Journal of Pharmaceutics**, 412(1–2), 28–36.
- Szczsna-Antczak, M., & Galas, E. (2001). Bacillus subtilis cells immobilised in PVA-cryogels. **Biomolecular Engineering**, 17(2), 55–63.
- Thurston, C.F., 1994. The structure and function of fungal laccases. **Biological Chemistry**, 1(140), 19-26.
- Vasconcelos, A.-F. D., Dekker, R. F. H., Barbosa, A. M., & Paccola-Meirelles, L. (2001). Comparison of the laccases, molecular marker proteins, and induction of pycnidia by three species of botryosphaeriaceous fungi. **Mycoscience**, 42(1), 543–548.
- Villalpando, J., (2016). Actividad antimicrobiana de polifenoles basados en el ácido gálico sintetizados enzimáticamente, Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química
- Wang, J., Wang, C., Zhu, M., Yu, Y., Zhang, Y., & Wei, Z. (2008). Generation and characterization of transgenic poplar plants overexpressing a cotton laccase gene. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 93(3), 303–310.
- Watanabe, K., Kawakami, T., Baba, K., Oshio, N., & Kimura, T. (2005). Effect of metals on the catalytic activity of sulfated zirconia for light naphtha isomerization. **Catalysis Surveys from Asia**, 9(1), 17–24.
- Wingard, L.B. (1972), Enzyme Engineering, Interscience Publishers, New York. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, 18(2), 226-227.

Tesis

- Wong, S. S., & Wong, L. J. C. (1992). Chemical crosslinking and the stabilization of proteins and enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 14(11), 866–874.
- Xu, F., Kulys, J. J., Duke, K., Li, K., Krikstopaitis, K., Deussen, H. J. W. Schneider, P. (2000). Redox chemistry in laccase-catalysed oxidation of N-hydroxy compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (5), 2052–2056.
- Yoshida, H., 1883. Chemistry of lacquer (Urushi). Part I. Communication from the Chemical Society of Tokio, *Journal of Chemical Society Transformation*. 43 (1), 472-486.
- Zambrano Z.M.L., Cruz M.T., Victoria, Sánchez P.H., Almazán R.L. (1994). Factores Físicoquímicos que controlan la Velocidad De oscurecimiento en Puré de Manzana, Pera y de Plátano. *Información Tecnológica*, 5 (1), 57-62.