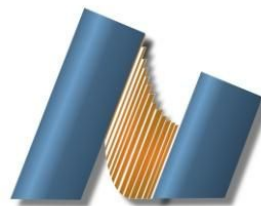




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
CENTRO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA



LICENCIATURA EN NANOTECNOLOGÍA
BIONANOTECNOLOGÍA

SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO CON ACTIVIDAD CITOCROMO P450

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN NANOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
MARIANA ANDRADE SUÁREZ

DIRECTOR DE TESIS
DR. RAFAEL VÁZQUEZ DUHALT

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, NOVIEMBRE 2017



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.

Hago constar que el trabajo que presento es de mi autoría y que todas las ideas, citas textuales, datos, ilustraciones, gráficas, etc. sacados de cualquier obra o debidas al trabajo de terceros, han sido debidamente identificados y citados en el cuerpo del texto y en la bibliografía y acepto que en caso de no respetar lo anterior puedo ser sujeto de sanciones universitarias.

Afirmo que el material presentado no se encuentra protegido por derechos de autor y me hago responsable de cualquier reclamo relacionado con la violación de derechos de autor.

Mariana Andrade Suárez

Dedicatorias

Dedico este trabajo principalmente a mi familia, por el apoyo y confianza que me brindaron a lo largo de la carrera.

A mi madre, Laura, por siempre tener una gran sonrisa, brindarme su cariño y confianza, por enseñarme en cada momento lo valioso que es ser mujer y ser una profesionista, por sus sabios consejos, sus valores y la motivación constante, por su amor.

A mi padre, Paco, por siempre ser tan cariñoso y brindarme todo su apoyo, por estar ahí sin importar la distancia y el tiempo para platicar y darme muchas lecciones de vida. Por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y por el valor que me ha mostrado para salir adelante.

A mis padrinos, Mercedes y Arturo, por apoyarme desde que tengo memoria y que sin su dedicación, tiempo y paciencia jamás habría logrado llegar tan lejos.

A mi confidente, la Dra. Raquel, por su cariño y confianza en todos estos años, por siempre estar ahí en los buenos y malos momentos, por impulsarme, por aconsejarme y apoyarme en todas mis decisiones.

A todos los estudiantes que desean seguir aprendiendo, para todos aquellos que sin importar los retos sigan cultivando su curiosidad y amor a la ciencia.

Agradecimientos

Primeramente, agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNYN) por permitirme formar parte de la tercera generación de la licenciatura en Nanotecnología y por proporcionarme el espacio y las herramientas necesarias para llevar a cabo este proyecto.

Agradezco a mi director de tesis el Dr. Rafael Vázquez Duhalt por integrarme a su grupo de trabajo y por conceder este proyecto, por su paciencia, dedicación y enseñanzas a lo largo de este trabajo.

Agradezco a los miembros del comité, la Dra. Katrin Quester, la Dra. Rina Koyani, el Dr. Javier Pérez Robles y la Dra. Karla Alejo González por su apoyo, interés y sugerencias a mi proyecto, permitiendo desarrollar un trabajo de mayor calidad.

Agradezco a las técnicas de laboratorio, la Dra. Katrin Quester y la M.C. Itandehui Betanzo por su asistencia técnica y disposición en cuanto a los materiales y equipos que se utilizaron para realizar este proyecto. Al Sr. Francisco Ruiz Medina por su apoyo técnico con el microscopio electrónico de transmisión (TEM).

Agradezco a los miembros del Departamento de Bionanotecnología del Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNYN), en especial a la Dra. Rina Koyani por transmitirme su conocimiento científico y su paciencia a lo largo de este proyecto; a la Dra. Ana Rodríguez por su tiempo, paciencia y sincera amistad; a la Dra. Karla Alejo por su cariño, comprensión y compañía que ha hecho esta experiencia más amena.

Agradezco a la coordinadora de la licenciatura, la Dra. Laura Viana por su apoyo, tiempo y paciencia. A sus asistentes, Laura Osuna y Laura Rosales por brindarme su ayuda en la carrera.

Agradezco a Isabel Pérez Montfort por su confianza y consejos para la realización del trabajo escrito de la tesis, asimismo como brindarme su sincera amistad.

Agradezco a todos mis profesores de la carrera por brindarme su apoyo, confianza, dedicación y disposición a lo largo de la carrera.

Agradezco a todos los miembros de intendencia por mantener limpias las aulas y el laboratorio, a los miembros de vigilancia por mantener seguro el edificio de la licenciatura a lo largo de estos cuatro años y medio de carrera.

Agradezco a todos mis compañeros y amigos de la licenciatura por confiar y creer en mí, y haber hecho de mi etapa universitaria un trayecto de experiencias y momentos que nunca olvidaré.

Resumen

La nanotecnología ha tenido un importante impacto en la biotecnología debido a que se ha logrado modificar los sistemas biológicos utilizando nanomateriales ya sea de origen natural o sintético. En la naturaleza encontramos proteínas altamente especializadas en acelerar reacciones bioquímicas llamadas enzimas. Las podemos considerar nanorreactores, ya que son de escala nanométrica y llevan a cabo reacciones específicas. En este trabajo se estudió el citocromo de la bacteria llamada *Bacillus megaterium* y su mutación en la fenilalanina 87 (CYP_{BM-3} F87A), de los cuales fueron encapsulados mediante la síntesis de nanopartículas de quitosano. La síntesis de las nanopartículas de quitosano fue efectuada utilizando la gelación iónica utilizando como precursor químico el tripolifosfato de sodio (TPP) y se realizó un entrecruzamiento químico a través del uso del glutaraldehído. El quitosano proporcionó protección al citocromo, evitando la degradación y/o inactivación y alargando su tiempo de vida útil, además de proporcionar un aumento en la eficiencia catalítica. Se evaluó la actividad catalítica de las nanopartículas en donde se observó que la actividad enzimática fue de 0.013 U/mL, no fue mayor, por lo tanto se realizó una modificación en el citocromo en donde se agregaron grupos carboxilo del ácido malónico. Al realizar nuevamente la evaluación de la actividad enzimática se observó que hubo mayor estabilidad y mayor actividad enzimática que fue de 0.041 U/mL. Se intentó la funcionalización de las nanopartículas de quitosano mediante tres métodos: el primero consistió en colocar carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS) y ácido fólico; el segundo método consistió en colocar solamente EDC y NHS; finalmente se funcionalizaron las nanopartículas con PEG activado con cloruro cianúrico. Sin embargo, la funcionalización de las nanopartículas no fue exitosa. Con base en los resultados, es posible que la modificación química de las nanopartículas de quitosano conteniendo en su interior el CYP_{BM-3} modificado destruye las nanopartículas e inactiva la enzima. Sin embargo, son necesarias más investigaciones para entender este fenómeno, como realizar modificaciones utilizando el polietilenglicol.

Palabras clave: nanopartículas, quitosano, citocromo, *Bacillus megaterium*, gelación iónica, nanorreactores.

Índice de Contenido

	<i>Página</i>
Dedicatoria	2
Agradecimientos	3
Resumen	5
Lista de figuras	
Figura 1. Estructura general de una enzima.	14
Figura 2. Estructura cuaternaria general del CYP.	16
Figura 3. Imagen de las células de la bacteria <i>Bacillus megaterium</i> .	17
Figura 4. Estructura del CYP _{BM-3} y su mutante F87A.	18
Figura 5. Evaluación de la carga de enzima de nanopartículas.	35
Figura 6. Diagrama de la modificación del citocromo.	36
Figura 7. Evaluación de la actividad enzimática del CYP modificado.	37
Figura 8. Gráfica de saturación de nanopartículas.	38
Figura 9. Imagen TEM de nanopartículas con 0.02% de glutaraldehído.	40
Figura 10. Imagen TEM de nanopartículas con 0.04% de glutaraldehído	41
Figura 11. Esquema de síntesis de nanopartículas mediante gelación iónica.	43
Listas de tablas	
Tabla 1. Mezcla de reacción para la determinación de la actividad catalítica del citocromo.	29
Tabla 2. Desviación estándar de las nanopartículas de quitosano con CYP _{BM-3} F87A con y sin glutaraldehído.	35

Tabla 3. Desviación estándar de las nanopartículas de quitosano con CYP _{BM-3} F87A sin modificar y modificada.	37
Tabla 4. Desviación estándar a diversas concentraciones en mM de peróxido de hidrógeno al saturar las nanopartículas de quitosano con CYP _{BM-3} F87A.	39
Tabla 5. Actividad enzimática de nanopartículas de quitosano con CYP _{BM-3} F87A modificado y sobrenadante al utilizar diferentes métodos de funcionalización.	42
Capítulo 1. Introducción	10
Capítulo 2. Antecedentes	12
2.1. Importancia de la nanotecnología	12
2.2. El citocromo P450 y su importancia médica	13
2.3. CYP bacteriano y su mutante F87A	17
2.4. Nanopartículas de quitosano	19
2.5. Nanorreactores	21
Capítulo 3. Justificación	24
Capítulo 4. Hipótesis	25
Capítulo 5. Objetivos	26
5.1. Objetivos generales	26
5.2. Objetivos específicos	26

Capítulo 6. Materiales y Metodología	27
6.1. Reactivos y enzima	27
6.2. Expresión de la variante CYP _{BM-3}	27
6.3. Purificación de la variante CYP _{BM-3}	28
6.4. Cuantificación de la actividad catalítica del CYP _{BM-3}	29
6.5. Modificación de la enzima con carbodiimida y ácido malónico	30
6.6. Síntesis de nanopartículas de quitosano	30
6.7. Determinación de las constantes cinéticas de nanopartículas de quitosano con peróxido de hidrógeno	31
6.8. Funcionalización de nanopartículas	31
6.9. Caracterización por microscopía electrónica de transmisión de las nanopartículas	33
Capítulo 7. Resultados.	34
7.1. Carga de nanopartículas y estabilidad (con glutaraldehído y sin glutaraldehído)	34
7.2. Modificación química de la enzima	36
7.3. Estabilidad de nanopartículas con enzima modificada	36
7.4. Determinación de las constantes cinéticas	38
7.5. Caracterización por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las nanopartículas (con 0.02% y 0.04% de glutaraldehído)	39
7.6. Funcionalización	41
Capítulo 8. Discusión	43

Capítulo 9. Conclusiones	47
Bibliografía y referencias	48
Referencia de imágenes	52
Anexo 1. Metodología	53

Capítulo 1. Introducción

En los años 60's, Richard Feynman, expresó que la nanotecnología sería “un campo que tendrá una gran cantidad de aplicaciones técnicas”. Al finalizar los años 90's se habían logrado diseñar los primeros equipos capaces de medir, observar y manipular la materia a escalas nanométricas [25].

La nanotecnología es el campo de investigación que estudia, diseña y fabrica materiales a escala nanométrica. La nanociencia y la nanotecnología son áreas multidisciplinarias, las cuales tienen aplicaciones que pueden ser útiles para el medio ambiente, en el sector energético, en la construcción, en la informática, en la medicina, en la biología, entre otros [23]. La nanotecnología ha tenido un importante impacto en dos áreas, la biomedicina y la biotecnología; en esta última se ha logrado modificar los sistemas biológicos utilizando nanomateriales ya sea de origen natural o sintético [4].

En la naturaleza podemos encontrar proteínas altamente especializadas en catalizar reacciones bioquímicas llamadas enzimas. Las enzimas catalizan reacciones no solo del metabolismo. Las podemos usar como nanorreactores, ya que son de escala nanométrica y llevan a cabo reacciones específicas [8]. Se han sintetizado nanorreactores de origen natural, como el quitosano, y de origen sintético como de paladio y platino.

Los nanorreactores tienen potenciales aplicaciones en diversas áreas; se usan con el objetivo de solucionar problemas tales como el tiempo de vida en las reacciones catalíticas y su desempeño catalítico. La selectividad de nanorreactores se basa en el proceso que se desea llevar a cabo y mejorar la eficiencia catalítica. También se pueden utilizar los nanorreactores para proteger el cargo orgánico o inorgánico que se encuentra en su interior de la degradación, y pueden incrementar su estabilidad. En el área de nanomedicina, los nanorreactores pueden ser utilizados como nanoacarreadores para terapia, diagnóstico y entrega de fármacos [22]. Estos nanocargadores tienen como ventaja de carga de materiales, biocompatibilidad y biodegradabilidad, estabilidad y robustez, control de liberación, entre otros.

Actualmente se ha logrado encapsular distintas enzimas con fines terapéuticos, como por ejemplo, el citocromo P450. Esta superfamilia de enzimas, descubiertas en los años 50 y se encuentran presente en todos los seres vivos. Se encuentran relacionadas con el metabolismo de un gran número de xenobióticos como drogas, pesticidas, procarcinógenos, anestésicos, solventes orgánicos, etc., así como sustancias endógenas como colesterol, ácidos biliares, vitaminas, entre otros [8].

Entre los tipos de citocromos que se han estudiado, existe el CYP_{BM-3}. Este citocromo proviene de una bacteria llamada *Bacillus megaterium*. Cirino y colaboradores modificaron del CYP_{BM-3} convirtiéndolo en un biocatalizador práctico y mejorando su actividad. Esta modificación, en realidad es una mutante del propio citocromo, se conoce como F87A y se localiza cerca del sitio activo. Se le denomina F87A porque es una variante en donde se sustituyó la de la fenilalanina 87 por una alanina [5,7].

En el presente trabajo un nanorreactor biocatalítico fue sintetizado, en específico se encapsuló el citocromo de la bacteria llamada *Bacillus megaterium* F87A y su variación en la fenilalanina 87 a través de la síntesis de nanopartículas de quitosano. El objetivo es que el quitosano proporcione protección al citocromo, evitando la degradación y/o inactivación y alargando su tiempo de vida útil, además de proporcionar un aumento en la eficiencia catalítica.

Este trabajo se encuentra dividido en diversos capítulos. En el capítulo 2 se describe la investigación y los antecedentes para la realización de este proyecto. Los capítulos 3, 4 y 5 puntualizan la justificación del proyecto, las hipótesis y los objetivos tanto generales como específicos. El capítulo 6 describe detalladamente los materiales y la metodología de todos los experimentos llevados a cabo a lo largo del proyecto. Los capítulos 7 y 8 describen los resultados y los discuten. Finalmente, el capítulo 9 da a conocer las conclusiones con base en los resultados.

Capítulo 2. Antecedentes

2.1. Importancia de la nanotecnología.

En 1959 Richard Feynman, manifestó su deseo de manipular y controlar los materiales a muy pequeñas escalas [25]. Feynman afirmó que la nanotecnología sería “un campo que tendría una gran cantidad de aplicaciones técnicas” y que no rompería ninguna ley física, no obstante, la tecnología de los 60’s no poseía las herramientas necesarias para estudiar este nuevo campo debido a que aún no era posible manipular átomos y moléculas, y mucho menos observarlas. No fue hasta en la década de los 80’s cuando la ciencia y la tecnología tuvieron el avance necesario y se desarrollaron las herramientas necesarias. Hoy en día es posible medir, observar y manipular la materia a escalas nanométricas [25].

La nanociencia es el estudio de las características y los procesos básicos que ocurren en estructuras cuyos tamaños se encuentran entre 1 y 100 nanómetros. El prefijo *nano* proviene del latín y significa “enano”. Un nanómetro (nm) equivale a una milmillonésima parte (1/1,000,000,000) de un metro. Para tener una mejor idea de qué tan pequeño es un nanómetro, tomaremos el ejemplo del diámetro de un cabello humano, el cual es de aproximadamente 75,000 nm [25].

La nanotecnología es el campo de investigación que estudia, diseña y fabrica materiales a escala nanométrica [25]. Por otro lado la nanociencia y la nanotecnología son áreas multidisciplinarias, las cuales tienen aplicaciones que pueden ser útiles para el medio ambiente, en el sector energético, en la construcción, en la informática, en la medicina, en la biología, entre otros.

La nanotecnología ha tenido un gran interés en las áreas de la biomedicina y biotecnología, formando nuevos campos híbridos denominados nanomedicina, bionanotecnología o nanotecnología biomédica [4]. Este nuevo campo se enfoca principalmente en modificar sistemas biológicos empleando nanomateriales de origen natural o sintético.

También se enfoca en la síntesis y en la modificación de las nanoestructuras utilizando los sistemas biológicos como modelo.

Los avances en la bionanotecnología han permitido proponer soluciones a diversos problemas que enfrentamos hoy en día. Su impacto puede darse en tres principales áreas: energía, ambiente y salud.

En el área de energía, se han utilizado nanomateriales que mejoran la producción, eficiencia y manejo de la energía y sus fuentes. Por ejemplo, se han utilizado las microalgas para la producción de biodiesel [26].

En el área ambiental, se ha propuesto la eliminación de agentes tóxicos y contaminantes como los plaguicidas, utilizando nanopartículas de quitosano con actividad peroxidasa versátil [2].

En el área de salud, se ha mejorado la prevención y los tratamientos de diversas enfermedades infecciosas. Por ejemplo, la prueba molecular llamada GeneXpert utiliza una muestra de saliva para detectar la mutación en ciertas regiones del gen *rpoB* de *M. tuberculosis* mediante el uso de la técnica de fluoróforos. Esta técnica permite detectar el ADN de la *M. tuberculosis*. Esta prueba tiene más de un 95% de sensibilidad y toma al menos un día para ser procesada [24]. Por otro lado, las técnicas de detección y tratamiento para algunos tipos de cáncer han mejorado, ofreciendo las terapias génicas como opción viable.

También se han desarrollado nanoestructuras que reconocen elementos nocivos para la salud dentro del cuerpo y los eliminan [26]. Este trabajo es una propuesta para desarrollar una nanopartícula que contenga un catalizador o enzima. El objetivo principal de la utilización de un material nanoestructurado, el quitosano, es que proteja a la enzima de ser degradado y que sirva para localizar elementos nocivos.

2.2. El citocromo P450 y su importancia médica.

Las reacciones bioquímicas son aquellas reacciones que se llevan a cabo en los organismos vivos. Estas reacciones son realizadas por proteínas altamente especializadas

llamadas enzimas, las cuales son catalizadores que aumentan la velocidad de transformación en la mayoría de las reacciones químicas dentro de las células. Estas enzimas aceleran las tasas de reacción más de un millón de veces, permitiendo que las reacciones catalíticas sucedan en fracciones de segundos y en condiciones fisiológicas [6].

Las enzimas tienen dos propiedades principales: la primera consiste en su capacidad de incrementar la velocidad de las reacciones químicas sin que las propias enzimas se degraden o sin sufran un cambio permanente en su estructura. La segunda propiedad es realizar las reacciones catalíticas manteniendo un equilibrio químico en los reactivos y productos [6].

Todas las enzimas tienen un sitio activo el cual es exclusivamente para la adhesión del sustrato. Se le denomina holoenzima al conjunto de cofactor, coenzima y sitio activo. En la Figura 1 se puede observar la estructura general de una enzima. La interacción entre el sustrato y el sitio activo de la enzima es muy específica. Los sitios activos usualmente están conformados por aminoácidos que se reúnen en la estructura terciaria de la proteína plegada. Inicialmente, los sustratos se unen al sitio activo mediante interacciones no covalentes e hidrofóbicas. Una vez realizada la unión entre el sustrato y el sitio activo, los mecanismos de reacción se aceleran formando un producto [6].

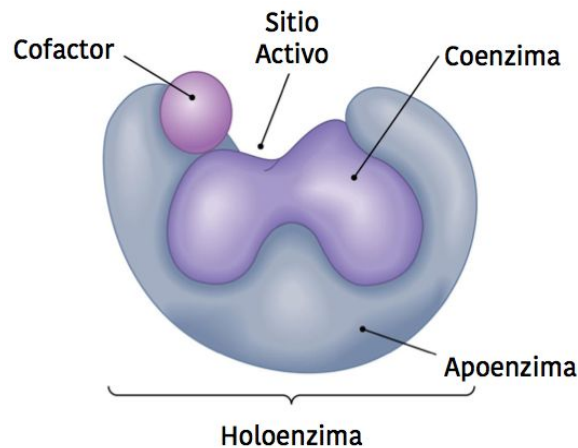


Figura 1. Estructura general de una enzima (1).

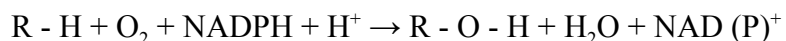
La superfamilia de citocromos P450 se descubrió por primera vez en los años 50 por el investigador alemán Martin Klingenberg mientras hacía estudios con el citocromo b5. En dichos

estudios encontró la presencia de un pigmento que se encontraba unido al monóxido de carbono con una banda de absorbancia de 450 nm de longitud de onda [8].

Posteriormente, en 1964, los investigadores Omura y Sato [17] identificaron la naturaleza hemoprotéica de este pigmento cuando estudiaron diversos microsomas hepáticos de distintas especies de mamíferos. Detectaron la reducción por el NADPH y que el pigmento podía unirse al monóxido de carbono mostrando un pico particular a 450 nm bajo el espectro UV y es por ello que se le denominó citocromo P450 donde ‘P’ es por “pigmento” y ‘450’ por el pico de la absorbancia en el espectro UV [8].

El citocromo P450 puede encontrarse en los animales, plantas y protistas; además, existe en la naturaleza desde antes de la división de los eucariotas y procariotas. Al cabo de diversas investigaciones se encontró que los citocromos P450 se encuentran relacionados con el metabolismo de un gran número de xenobióticos como drogas, pesticidas, procarcinógenos, anestésicos, solventes orgánicos, etc., así como sustancias endógenas como colesterol, prostaglandinas, ácidos biliares, vitaminas, entre otros [8].

Los citocromos P450 son una superfamilia de hemoproteínas que activan el oxígeno para catalizar la oxidación de sustratos mediante la siguiente reacción:



Actualmente, se han identificado más de 7,700 secuencias codificando P450, de las cuáles 2,740 se encuentran en animales y 2,675 en plantas. Además, se ha descubierto que tienen una amplia diversidad funcional, es decir, son capaces de catalizar muchos procesos y pueden transformar con un alto número de sustratos como el dimetoxifenol, entre otros. Entre las diversas reacciones de catálisis que puede realizar el citocromo P450, se encuentran las reacciones de oxidación (N-oxidaciones, S-oxidaciones, epoxidaciones, hidroxilaciones aromáticas y alifáticas, desalquilaciones, desulfuraciones, desaminaciones y deshalogenaciones) [8].

De manera general, los citocromos P450 de eucariotas tienen un peso molecular aproximado de 50 a 60 kD. Como ya se mencionó anteriormente es una molécula de origen hemoprotéico. En la Figura 2 se observa el grupo hemo.

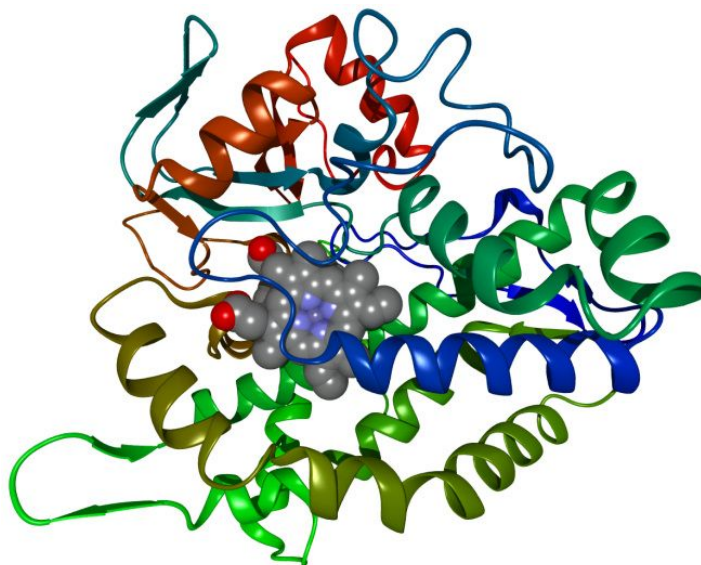


Figura 2. Estructura cuaternaria general del CYP donde se observa el grupo hemo en el centro de la estructura en color gris. Las zonas de color rojo del grupo hemo representan los oxígenos, mientras que la zona de color lila es el sitio activo (2).

Con el objetivo de excluir los compuestos xenobióticos y/o tóxicos del organismo se producen ciertas reacciones de biotransformación catalizada por los citocromos P450 con el propósito de incrementar su hidrofobicidad y así lograr su rápida excreción. La desintoxicación se da en dos pasos o fases. En la Fase I se produce una modificación en el xenobiótico mediante oxidación, reducción o hidrólisis, mediada por CYP, lo que permite la aparición de grupos polares aumentando su hidrosolubilidad y así posibilitar su excreción o su conjugación. En la Fase II, el compuesto oxidado, que puede ser un xenobiótico o un metabolito de la Fase I, se conjuga con sustancias endógenas, habilitando el transporte en el organismo y su excreción [8].

2.3. CYP bacteriano y su mutante F87A.

Entre los tipos de citocromos que se han estudiado, existe un citocromo de gran interés que se conoce como CYP_{BM-3}. Este citocromo proviene de una bacteria llamada *Bacillus megaterium*. La bacteria fue descrita por primera vez por Anton De Bary en 1884. Fue nombrada por su gran tamaño de 1.5 µm de diámetro y 4 µm de largo, tal y como se puede observar en la Figura 3. Este microorganismo es el más grande de todos los bacilos [7].

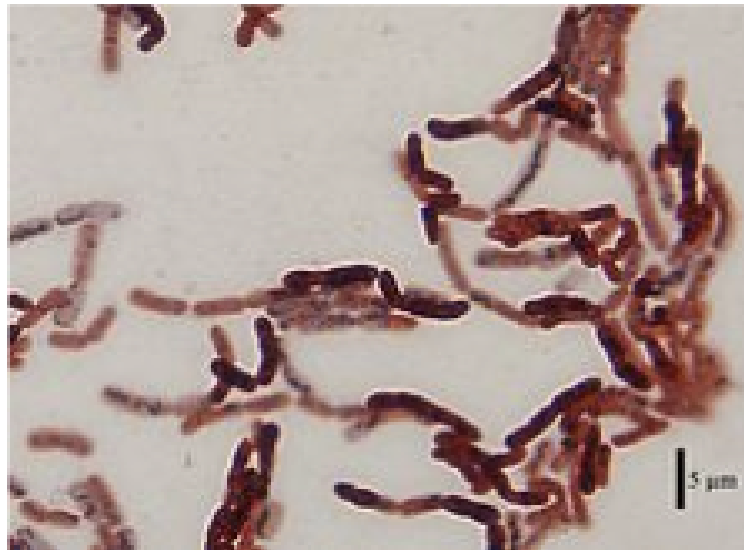


Figura 3. Imagen de las células de la bacteria *Bacillus megaterium* teñidas con Sudan Black B y safranina (3).

En contraste con la *Escherichia coli*, la bacteria *Bacillus megaterium* no produce endotoxinas asociadas con la membrana externa, y al combinarse con su crecimiento en una variedad de fuentes de carbonos y medios simples, tiene grandes aplicaciones en la industria alimentaria y farmacéuticas. Por otro lado, esta bacteria ha sido estudiada genéticamente y es muy susceptible a la manipulación [7].

Dada la naturaleza de los citocromos P450, éstos son ineficientes para realizar reacciones de peroxigenasa porque se degradan o se inactivan por el peróxido; es por ello que se buscaron métodos para modificar al propio citocromo y tratar de resolver esta ineficiencia [5].

Cirino y Arnold pudieron hacer la modificación del dominio hemo del CYP_{BM-3} convirtiéndola en un biocatalizador práctico y mejorando su actividad. Ésta modificación, que en realidad es una mutante del propio citocromo, se conoce como F87A y se localiza cerca del sitio activo. Se le denomina F87A porque se sustituyó la fenilalanina 87 por una alanina [5].

Usualmente, el sitio activo del CYP_{BM-3} se encuentra completamente protegido por el mismo citocromo, lo cual evita que el sustrato pueda acoplarse con facilidad. Cuando se realiza la modificación, se forma una brecha lo suficientemente amplia como para que el sustrato pueda acoplarse, en la Figura 4 se puede observar la diferencia entre ambas [5].

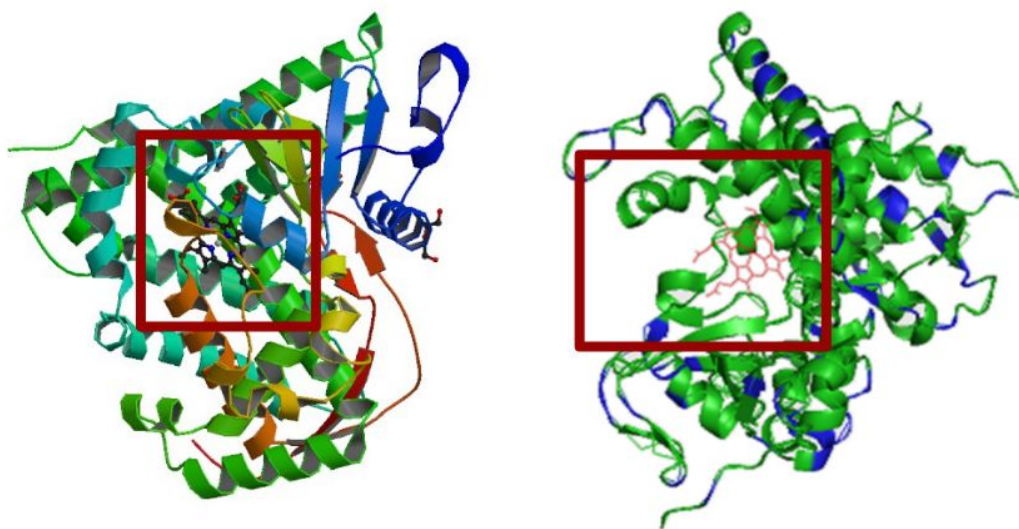


Figura 4. De izquierda a derecha: CYP_{BM-3} y la mutante F87A del CYP_{BM-3}. En los recuadros rojos se puede observar el espacio disponible para activar el sitio activo (4).

Este citocromo P450 de *Bacillus megaterium* fue encapsulado exitosamente dentro de cápsides virales con el propósito de aprovechar las propiedades de éstas mismas como nanovehículos para el transporte de enzimas con aplicaciones médicas tanto en el bacteriofago P22 como en cápsides del virus clorotico del frijol Cowpea [23].

2.4. Nanopartículas de quitosano.

Con el paso de los años, la investigación del quitosano ha aumentado considerablemente por ser un polímero natural prometedor para el suministro de fármacos, de genes terapéuticos y como estructuras para la protección de otras proteínas, como las enzimas por encapsulamiento [9].

La quitina y el quitosano son algunos de los biomateriales que son empleados para formar nanopartículas, por su resistencia, estabilidad, no tóxico y fácil obtención. Comercialmente, la quitina es obtenida del exoesqueleto de los crustáceos, principalmente del camarón y del cangrejo. De manera general, la quitina es un copolímero cuyas unidades son de *N*-acetil-glucosamina y *N*-glucosamina distribuidos a través de una cadena biopolimérica, sin embargo, las conformaciones pueden variar dependiendo del método de obtención, es decir, si el número de unidades de *N*-acetil-glucosamina supera el 50%, el material es llamado quitina y cuando el número de unidades de *N*-glucosamina es mayor del 50% se le llama quitosano [13].

El quitosano se obtiene mediante un proceso de desacetilación alcalina de la unidad *N*-acetil-glucosamina de la quitina [24]. Al desacetilar la quitina, el quitosano se convierte en un biopolímero o polisacárido natural que constituye de residuos de β -(1 \rightarrow 4) ligado a 2-amino-2-deoxy-glucopiranososa (GlcN) y 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopiranososa (GlcNAc) [19].

El quitosano también se obtiene comercialmente y usualmente tiene un peso molecular de entre 3,800 y 20,000 Da. Por otro lado, el quitosano es una molécula catiónica en condiciones neutras de pH, que contiene grupos amino libres y por lo tanto es insoluble en agua. En bajos pH, los grupos amino se protonan permitiendo que sea soluble en agua [1].

El quitosano es uno de los biomateriales más estudiados por tener propiedades que interesan en las áreas de medicina y farmacéutica, por su biocompatibilidad, ya que no causa reacciones alérgicas ni rechazo. Por otro lado, dentro del cuerpo humano, el quitosano se rompe lentamente en moléculas de azúcares aminados que son metabolizados y absorbidos. El quitosano puede degradarse por la acción de los lisosomas, no es tóxico y es fácil de retirar del

organismo, es antimicrobiano y capaz de absorber metales tóxicos además de tener una excelente adhesión [1].

Se ha logrado encapsular diversas enzimas dentro de nanopartículas de quitosano. Un ejemplo es la síntesis de nanopartículas de quitosano dentro de las cuales se encapsuló una enzima llamada lacasa. La lacasa es una enzima que se encuentra en plantas, hongos, insectos y bacterias. Esta enzima ha sido de gran interés debido a sus aplicaciones para eliminar contaminantes utilizando el proceso de biorremediación. La lacasa se puede usar para procesar y degradar contaminantes en la industria textil, en el lavado de algodón, en la eliminación de tintes en ciertos productos, entre otros. Sin embargo, por sí misma difícilmente puede cumplir su función debido a la rápida degradación de ésta en condiciones de operación. Es por ello que se planteó la posibilidad de encapsular la enzima en nanopartículas de quitosano. Los resultados demostraron que el quitosano protegió la enzima aumentando su tiempo de vida en condiciones reales de operación [15].

También se ha logrado encapsular la enzima peroxidasa versátil, que se encuentra principalmente en hongos y tiene aplicación biotecnológica por su versatilidad y robustez. Esta enzima es capaz de degradar agentes xenobióticos que se encuentran en los pesticidas. Alarcón (2016) cubrió la enzima con nanopartículas de quitosano para proteger a la enzima de la degradación y potenciar su actividad oxidativa [2].

La encapsulación de enzimas mediante nanopartículas de quitosano resulta atractiva debido a sus ventajosas propiedades: por su biodegradabilidad, baja toxicidad y gran área superficial. Actualmente existen diversos métodos para sintetizar nanopartículas de quitosano que incluyen: fusión de gotas de emulsión y desolvatación, micelas inversas, gelación iónica y entrecruzamiento [1].

La síntesis de nanopartículas de quitosano mediante el método de gelación iónica es de gran interés debido a que el proceso es muy sencillo. Consiste en diluir en solución acuosa el quitosano con ácido acético o con cualquier ácido y posteriormente se obtiene una “secuencia” de quitosano. En dicha secuencia se agregan gotas de un material polianiónico como por el ejemplo el tripolifosfato de sodio (TPP), el cual servirá como un entrecruzante químico. Debido a que el quitosano tiene una carga levemente positiva y el TPP una carga negativa, éstos se

precipitan y se forman partículas esféricas. Una desventaja de la gelación iónica es que las nanopartículas presentan muy poca resistencia mecánica [1].

Debido a esta poca resistencia mecánica se puede agregar un paso más en la síntesis, el cual consiste en hacer otro entrecruzamiento, pero en este caso de tipo covalente. Este método entrecruza los grupos funcionales amino del quitosano con grupos aldehídos de un agente entrecruzante, como por ejemplo el glutaraldehído. El uso del glutaraldehído aportará la estabilidad que la partícula necesita. Por otro lado se obtendrá una forma más esférica y un tamaño determinado. El tamaño de la partícula depende del tamaño de la gota y el tiempo de colocación entre gota y gota. Entre más tiempo se deje, más grande será la partícula [1].

Para obtener una síntesis exitosa utilizando los métodos de gelación iónica con TPP y entrecruzado con glutaraldehído se necesita cierto control durante la síntesis, como por ejemplo, la síntesis debe estar en agitación rápida, los reactivos deben estar conservados de forma adecuada, entre otros [12].

En este trabajo se sintetizaron nanopartículas de quitosano utilizando el protocolo descrito por Calvo *et al.* [3] el cual utiliza el método de gelación iónica. Además, se implementó el método de entrecruzamiento covalente. Las nanopartículas de quitosano encapsulan la moléculas del citocromo CYP_{BM-3} y su mutante F87A con el objetivo de protegerlo de su degradación y potenciar su actividad.

2.5. Nanorreactores.

Con los grandes avances en la nanotecnología y bionanotecnología, utilizando como modelo la naturaleza, se han desarrollado sistemas o productos que tienen aplicaciones en diversas áreas. Muchos científicos han dedicado sus esfuerzos a estudiar los nanorreactores, un concepto que emergió en los años 90's [22].

Los nanorreactores son sistemas a escala nanométrica que tienen la función específica de facilitar las reacciones químicas. En la naturaleza, los nanorreactores se encuentran en diversos sistemas biológicos, en específico, en algunas proteínas como las enzimas que actúan como nanorreactores [8].

Actualmente, se ha demostrado que los nanorreactores son capaces de cambiar la naturaleza química de las moléculas y lo que hay dentro de las moléculas. Se ha observado que este cambio permite la aceleración de las reacciones bioquímicas y por más tiempo de lo habitual. Con esta propiedad se abre la posibilidad de sintetizar nanopartículas, las cuales tendrán esta propiedad. Al hacerlo se puede obtener en sí, una herramienta básica la cual otorgará muchos beneficios.

Es posible diseñar nanorreactores de diversos materiales y formas. Por ejemplo Shustova y colaboradores [12] reportaron la construcción de un nanoreactor metálico-orgánico que puede imitar las propiedades de emisión de la fluorescencia de un sistema cuyas moléculas de bencilideno están dentro de un “barril” conformado por proteínas. Shustova y colaboradores observaron que la fluorescencia de los “barriles” sintéticos es similar a la de la proteína de origen natural. Este nanoreactor puede utilizarse para controlar selectivamente las interacciones de moléculas que tienen propiedades físicas específicas [12].

Zhang, Dai y colaboradores se interesaron en nanorreactores en forma de nanoesferas. Estas nanoesferas tienen un núcleo de metal (paladio y platino) dentro de una capa exterior de sílica microporosa. Se observó, mediante microscopía electrónica de transmisión, que los racimos de paladio del núcleo catalizan la oxidación alílica de sustratos lo suficientemente pequeños como para entrar en los poros de la cubierta porosa del nanoreactor, como el acetato de colesterilo o el ciclohexano [12].

Los nanorreactores se clasifican en tres categorías principales: nanorreactores naturales o sintéticos, nanorreactores biológicos y nanorreactores auto ensamblados.

- I. *Nanorreactores naturales o sintéticos.* Se dividen en tres subclases: (1) sólidos inorgánicos como zeolitas, arcillas y silicas mesoporosas. (2) Nanoestructuras orgánicas, ya sean estructuras orgánicas covalentes o polímeros microporosos. (3) Hibridaciones orgánico-inorgánicas, por ejemplo zeolitas con grupos orgánicos [22].
- II. *Nanorreactores biológicos.* Éstos comprenden moléculas, ensamblados y sistemas biológicos utilizados en la síntesis de nanomateriales. Se utilizan para esto “cajas” hechas

de proteínas, ensamblajes de proteínas, capas de ADN, y otros. Presentan la ventaja de la facilidad con la que se puede modificar su estructura, asimismo muestran un alto grado de organización y presentan regiones de autoensamblaje bien definidas [22].

III. *Nanorreactores auto ensamblados*. Son estructuras tridimensionales generadas mediante interacciones reversibles y no covalentes, como puentes de hidrógeno entre las subunidades complementarias. Las micelas, emulsiones, vesículas y cápsulas moleculares no covalentes son ejemplos de nanorreactores auto ensamblados [22].

Como se mencionó anteriormente, en el área de nanomedicina, los nanorreactores pueden ser utilizados como nanoacarreadores para terapia, diagnóstico y entrega de fármacos; tienen como ventaja la capacidad de carga, biocompatibilidad y biodegradabilidad, estabilidad y robustez, control de liberación, entre otros [22]. Este trabajo se enfatiza en aquellos nanorreactores que puedan ser encapsulados con el propósito de proteger y estabilizar los nanorreactores para así realizar la catálisis enzimática.

Cuando los nanorreactores efectúan la catálisis enzimática se tienen que considerar varias cosas. En primer lugar, las propiedades fisicoquímicas de estos nanorreactores se ven afectadas por parámetros externos como la temperatura, el pH o la fuerza iónica, en otras palabras, entre más controlados estén los parámetros externos mayor control habrá sobre la estabilidad de los nanorreactores y su actividad catalítica [14].

Por otro lado, la actividad enzimática dentro de un nanoreactor puede verse afectada por las limitaciones de transferencia de masa, la obstrucción del sitio catalítico de las enzimas y la disminución de la velocidad de difusión de sustrato (debido a una alta concentración de enzimas). Todos estos factores son importantes; es por ello que se debe determinar el número de moléculas de enzimas adecuado para obtener una actividad enzimática eficaz [14].

Capítulo 3. Justificación

Existen diversas enzimas que pueden ser utilizadas con fines industriales y biotecnológicos; sin embargo, el tiempo de vida de estas enzimas suele ser corto y se degradan o inactivan rápidamente. Es por ello que se plantea sintetizar nanopartículas de quitosano para encapsular las enzimas, proporcionando protección y estabilidad, y así aumentar el tiempo de vida de estos nanorreactores. Por otro lado, se propone también funcionalizar las nanopartículas utilizando diversos métodos y materiales, y evaluar su desempeño.

Capítulo 4. Hipótesis

Las nanopartículas de quitosano proporcionan protección al citocromo P450, evitando su degradación y/o inactivación y alargando su tiempo de vida útil, además proporcionan un aumento en la eficiencia catalítica.

Capítulo 5. Objetivos

5.1. *Objetivos Generales*

- Sintetizar nanopartículas de quitosano y evaluar su eficiencia catalítica al añadir CYP_{BM-3} F87A.

5.2. *Objetivos Específicos*

- Obtener la enzima CYP_{BM-3} con su variante F87A.
- Sintetizar las nanopartículas de quitosano.
- Medir la actividad catalítica de las nanopartículas de quitosano y del citocromo CYP_{BM-3}F87A empleando diversos protocolos.
- Evaluar la cinética catalítica de las nanopartículas en presencia de peróxido de hidrógeno.
- Diseñar protocolos de funcionalización de las nanopartículas empleando distintas técnicas y evaluar su actividad catalítica y estabilidad.
- Caracterizar las nanopartículas de quitosano con microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Capítulo 6. Materiales y Metodología

6.1. Reactivos y enzima.

La enzima utilizada en este trabajo fue el dominio hemo de la variante F87A del citocromo CYP_{BM-3} proveniente de la bacteria *Bacillus megaterium*. El tripolifosfato de sodio (TPP), ácido acético, dimetoxifenol (DMP), ácido 2- (N-morfolino) etanosulfónico hidrato (hidrato de MES), trizma, quitosano, glutaraldehído, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, 1,1,1-trifluoruro-5,5-dimetil-2,4-hexadiona (PTA), metoxipolietilenglicol activado con cloruro cianúrico (mPEG) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (ST. Louis, MO, Estados Unidos). El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se obtuvo de Hycel (Zapopan, Jalisco, México).

6.2. Expresión de la variante CYP_{BM-3}

El pre inóculo, con el medio de cultivo Luria-Bertani (LB, 200 µg/mL de ampicilina), fue generado utilizando la cepa transformada con el plásmido correspondiente. Posteriormente, del pre inóculo, se obtuvo aproximadamente una alícuota de 0.5 mL. Se agregó 50 mL de medio Terrific Broth (TB) en un matraz ocupando aproximadamente el 20% del espacio total disponible. Cada litro de TB contenía 12 g de triptona, 24 g de extracto de levadura, 4 mL de glicerol y 100 mL de una solución amortiguadora de fosfato de potasio, 0.17 M de KH₂PO₄ y 0.72 M de K₂HPO₄ con un pH de 7.4. Posteriormente se añadió 0.5 mM de tiamina y elementos traza (se preparó de acuerdo a lo reportado por Joo *et al.* 1999 [11]) al medio TB.

Se disolvieron los siguientes compuestos en 10 mL de una solución de HCl 90% v/v de agua destilada: 0.011 g MgCl₂ 2H₂O, 0.3 g de FeCl₂ 6H₂O, 6H₂O, 0.0065 g de ZnCl₂ 4H₂O, 0.002 g CoCl₂ 6H₂O, 0.01 g de Na₂MoO₄ 2H₂O, 0.0038 g CaCl₂, 0.0126 g CuCl₂ 2H₂O y 0.002 g H₂BO₃.

Se inoculó la *E. coli* en el medio TB en los matraces, los cuales fueron colocados en agitador orbital a una velocidad de 100 rpm a una temperatura de 25°C durante 44 h, transcurrido el tiempo se agregó 0.5 mM de IPTG y 1 mM de ácido aminolevulínico y nuevamente fue agitado en las mismas condiciones anteriores. Se recuperaron las bacterias por centrifugación a 3,500 rpm durante 45 minutos a 4°C. El sobrenadante fue descartado y se recuperó el precipitado bacteriano, el cual fue conservado a -80°C.

6.3. Purificación de la variante CYP_{BM-3}

Se pesó el precipitado bacteriano, y por cada gramo se añadió 10 mL de solución amortiguadora de lisis, la cual contenía 10 mM de imidazol, 50 mM de NaH₂PO₄ y 300 mM de NaCl con un pH de 8. Posteriormente se sonicó en baño de hielo (con el objetivo de producir lisis celular). El ciclo de soniacado fue de 9.9s de pulso por cada 9.9s de descanso durante 2 minutos, se utilizó la macro punta del sonicador con una potencia de 36%. El ciclo se repitió de 5 a 6 veces.

Después de la sonicación, se formó un homogenizado, el cual fue centrifugado por 15 minutos a 12,000 rpm a 4°C. El sobrenadante fue filtrado por una membrana de 0.22 µm. El extracto se concentró mediante la ultrafiltración con AMICON a través de una membrana de 10 kDa. Se redujo el volumen a 1/5 del volumen inicial.

Debido a que las CYP_{BM-3} F87A tienen una etiqueta de 6 histidinas, se purificó en un solo paso mediante cromatografía de afinidad a níquel. La columna que se utilizó fue la HisTrapTM FF de 5 mL precargada con níquel (GE Healthcare). Posteriormente se purificó nuevamente mediante la cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC por sus siglas en inglés “Fast Protein Liquid Chromatography”). Se utilizó el programa predeterminado para la purificación de proteínas con etiquetas de histidinas del equipo “ATKA prime plus Protein Purification System” (AKTA prime plus, GE Healthcare). El programa que se utilizó tiene un gradiente de concentración de imidazol de 50 mM de NaH₂PO₄ y 300 mM de NaCl con un pH de 8 hasta 500 mM de imidazol, 50 mM de NaH₂PO₄ y 300 mM de NaCl con un pH de 8; el flujo utilizado fue de 5 mL/min.

Posteriormente las fracciones coloreadas fueron retiradas. Dichas fracciones son el CYP_{BM-3} F87A, las cuales fueron sometidas a un cambio de solución amortiguadora mediante diálisis. El buffer utilizado fue el MES 50 mM con un pH 8 y 10% de glicerol. Se dejó por toda la noche. Después se concentró con mucho cuidado la solución mediante la ultrafiltración en donde se utilizó una membrana de 30 kDa. Finalmente la solución fue colocadas en alícuotas y conservadas a -20°C.

6.4. Cuantificación de la actividad catalítica del CYP_{BM-3}

La cuantificación de la enzima se realizó en el espectrofotómetro UV-vis Perkin-Elmer series 836 ET utilizando la absorbancia de la banda Soret a 450 nm con un coeficiente de extinción de 95,000 M⁻¹cm⁻¹ [18]. La actividad enzimática se determinó mediante la transformación del 2,6-dimetoxifenol. La mezcla de reacción fue analizada a 468 nm durante tres minutos. Las determinaciones se realizaron por triplicado. En la siguiente tabla se muestra la mezcla de reacción y las cantidades de buffer, enzima, sustrato (DMP) y peróxido de hidrógeno que se usaron. El blanco utilizado en este caso fueron 1000 µL de buffer MES 50 mM.

Tabla 1. Mezcla de reacción para la determinación de la actividad catalítica del citocromo

Solución	Cantidad (µL)	Cantidad (mM)
Buffer MES 50 mM	935	0.4675
Enzima purificada	50	3.26 x 10 ⁻⁶
Dimetoxifenol (DMP)	10	5 x 10 ⁻⁵
Peróxido de Hidrógeno (H ₂ O ₂)	5	5

6.5. Modificación de la enzima con carbodiimida y ácido malónico.

En un tubo Falcon de 15 mL se colocó el CYP purificado, se agregó el ácido malónico y la carbodiimida, en este caso se calculó el número de residuos en un mol de proteína y se agregó el doble de moles de carbodiimida y ácido malónico. Una vez realizado el cálculo se determinó que se debía agregar 3.43mg de carbodiimida (N-(3-dimethylaminopropil)-N'-etilcarbodiimida hidrocioruro) y 0.34mg de ácido malónico, fue mezclado suavemente por 2 horas. Posteriormente la muestra fue trasladada a una membrana para diálisis y se realizó la diálisis con buffer MES 50 mM pH 7.5 y 10% de glicerol con una temperatura de 4°C por 8 horas.

Al finalizar la diálisis, con extremo cuidado, se retiró la enzima modificada (CYP_{BM-3} F87A) y se analizó la actividad de la enzima modificada utilizando los datos de la Tabla 1 en el espectrofotómetro, mencionada en la sección 3.3. Una vez realizado el análisis, se colocó la enzima modificada en alícuotas de 1 mL y fueron congeladas a -20°C.

6.6. Síntesis de nanopartículas de quitosano

Las nanopartículas de quitosano fueron sintetizadas mediante el método de gelación iónica descrita por Calvo *et al.* [3]. En la sección de anexos se encuentran los cálculos realizados para las soluciones utilizadas en este trabajo.

En un vaso de precipitado pequeño, con su respectivo agitador magnético, se colocó 5 mL de TPP y 50 µL de enzima CYP_{BM-3} (gota por gota), posteriormente se dejó reaccionar por 30 minutos a una velocidad rápida. Al finalizar este tiempo, se colocó, gota por gota, 1 mL de la solución de quitosano (0.00605 mM) y se dejó reaccionar por otros 30 minutos. Finalmente se colocó 250 µL de glutaraldehído al 0.04% y se dejó reaccionar por 30 minutos más.

Al finalizar la reacción, las nanopartículas fueron centrifugadas en la centrífuga SORVALL* Legend RT a 3,000 rpm por 10 minutos a 10°C. Al finalizar, el sobrenadante fue retirado y centrifugado en la ultracentrífuga Beckman Coulter Optima XPN-100 a 45,000 rpm por 3 horas con una temperatura de 4°C.

Al terminar la ultracentrifugación se retiró el sobrenadante, el precipitado que contenía las nanopartículas se resuspendió con 1mL de buffer Tris-HCl, las nanopartículas fueron dispersadas en el sonicador Sonics & Materials Inc. Vibra Cell™, en donde se utilizó un programa de 5 segundos de pulso y 5 segundos de descanso a 35%, este proceso fue repetido hasta tener una solución homogénea. Finalmente se evaluaron las nanopartículas en el espectrofotómetro a 495 nm por 3 minutos; se realizaron triplicaciones de cada muestra.

6.7. Determinación de las constantes cinéticas de las nanopartículas de quitosano con peróxido de hidrógeno.

Se evaluó la oxidación del 2,6-dimetoxifenol en presencia de diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno. Las concentraciones de peróxido de hidrógeno usadas fueron de 1 a 15 mM. Cada reacción se repitió tres veces y se obtuvo el promedio de éstos resultados.

6.8. Funcionalización de nanopartículas

Se utilizaron tres métodos de funcionalización. Para todos los métodos de funcionalización, se sintetizaron cuatro lotes (I, II, III y IV) de nanopartículas utilizando el proceso mencionado en la sección 3.5, posteriormente se verificó la actividad enzimática en el espectrofotómetro utilizando el proceso de la sección 3.6. Al finalizar éste análisis, se guardó en refrigeración el grupo I (control).

Funcionalización con ácido fólico

Los lotes (II, III y IV) de nanopartículas fueron mezclados y puestos en un solo tubo Falcon de 15 mL. Posteriormente se agregó, gota por gota, 31.2 µL de ácido fólico, 13.5 µL de carbodiimida (EDC) y 16.5 µL de NHS (N-hidroxisuccinimida); las concentraciones se calcularon dependiendo del número de moles de la enzima, en este caso, en este caso se calculó

el número de residuos en un mol de proteína y se agregó el doble de moles de carbodiimida, ácido fólico y NHS. Fue puesto en agitación suave por dos horas y posteriormente fue ultracentrifugado a 45,000 rpm por 3 horas con una temperatura de 4°C en la ultracentrífuga Beckman Coulter Optima XPN-100. Posteriormente se midió la actividad enzimática en el espectrofotómetro utilizando la mezcla de reacción descrita en la Tabla 2.

Funcionalización con NHS y EDC

Los lotes (II, III y IV) de nanopartículas fueron mezclados y puestos en un solo tubo Falcon de 15 mL. Posteriormente se agregó, gota por gota, 13.5 μ L de EDC y 16.5 μ L de NHS (N-hidroxisuccinimida); las concentraciones se calcularon dependiendo del número de moles de la enzima, en este caso, en este caso se calculó el número de residuos en un mol de proteína y se agregó el doble de moles de carbodiimida y NHS. Fue puesto en agitación suave por dos horas y posteriormente fue ultracentrifugado a 45,000 rpm por 3 horas con una temperatura de 4°C en la ultracentrífuga Beckman Coulter Optima XPN-100. Posteriormente se midió la actividad enzimática en el espectrofotómetro utilizando la mezcla de reacción descrita en la Tabla 2.

Funcionalización con polietilen glicol (PEG)

Los lotes (II, III y IV) de nanopartículas fueron mezclados y puestos en un solo tubo falcon de 15 mL. Posteriormente se agregó, 2.5 mg de mPEG (metoxipolietilenglicol activado con cloruro cianúrico). Las concentraciones se calcularon dependiendo del número de moles de la enzima, en este caso, en este caso se calculó el número de residuos en un mol de proteína y se agregó el doble de moles de carbodiimida y de mPEG. Fue puesto en agitación suave por dos horas y posteriormente fue ultracentrifugado a 45,000 rpm por 3 horas con una temperatura de 4°C en la ultracentrífuga Beckman Coulter Optima XPN-100. Posteriormente se midió la actividad enzimática en el espectrofotómetro utilizando la mezcla de reacción descrita en la Tabla 2.

6.9. Caracterización por microscopía electrónica de transmisión de las nanopartículas

Las nanopartículas de quitosano con actividad citocromo CYP450 fueron caracterizadas en un microscopio de transmisión (TEM) JEOL JEM-2100F. Las nanopartículas fueron dispersadas con el sonicador Sonics & Materials Inc. Vibra Cell™, posteriormente fueron colocadas en una rejilla 400 mesh de cobre. En dicha rejilla se colocaron 2 µL de nanopartículas y se dejó secar por aproximadamente dos minutos, posteriormente se colocaron 2 µL de ácido fosfotungstácico (PTA) (2.039×10^{-7} moles/ 2µL) y nuevamente se dejó secar por otros dos minutos.

Capítulo 7. Resultados

En este capítulo se presentan todos los resultados obtenidos a lo largo del trabajo. Se realizó la evaluación de las nanopartículas y se determinó su estabilidad utilizando el glutaraldehído a una concentración de 0.04% y 0.02%. Además, se realizó la saturación catalítica de las nanopartículas utilizando el peróxido de hidrógeno a diversas concentraciones para obtener los valores de la V_{\max} y K_m , y su curva. Las nanopartículas fueron sintetizadas y funcionalizadas utilizando tres distintos métodos y materiales.

7.1. Carga de nanopartículas y estabilidad (con glutaraldehído y sin glutaraldehído)

La síntesis de nanopartículas con actividad CYP_{BM-3} con su mutante F87A fue realizado utilizando el protocolo de Calvo *et al.* [3]. En este trabajo se realizó la síntesis de cuatro lotes que contenían glutaraldehído (a una concentración de 0.04%) y otros cuatro sin glutaraldehído con el objetivo de conocer su comportamiento y hacer la comparación entre ambas.

Se evaluó la permanencia de la enzima dentro de las nanopartículas a las 0 horas, 24 horas y a las 48 horas de incubación, tal y como se muestra en la Figura 5. En ella podemos observar una pérdida de la actividad enzimática dentro de las nanopartículas en las primeras 24 horas. El entrecruzamiento con glutaraldehído reduce mínimamente ésta pérdida pero no la evita del todo.

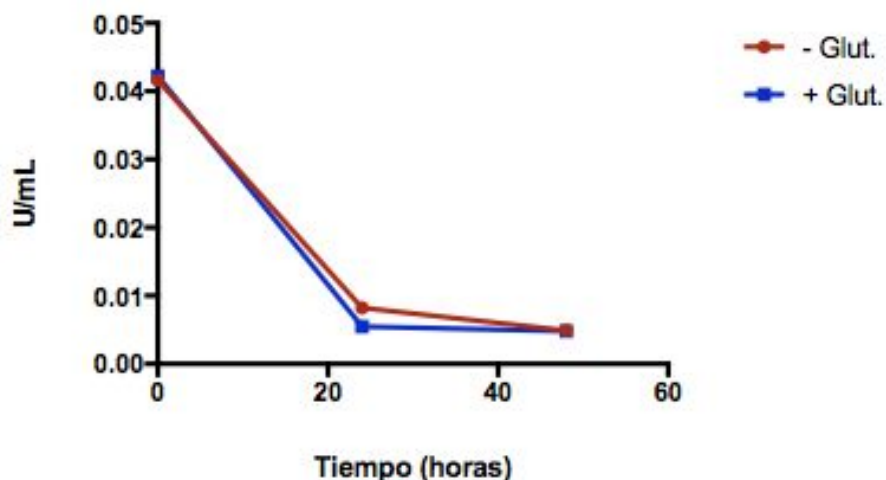


Figura 5. Evaluación de la carga de enzima de nanopartículas y su permanencia encapsulada

En este ensayo se estimó la capacidad de carga mediante la siguiente ecuación:

Capacidad de carga (CP) = actividad enzimática de las NP's/actividad enzimática de la enzima pura

$$CP = \frac{0.0129}{0.0252} = 0.5119 \times 100\% = 51.19\%$$

Se obtuvo una capacidad de carga de 51.19% de encapsulación exitosa (se debe tomar en cuenta que en cada síntesis se colocó 15 μ L de enzima cuya concentración es de 0.0252 U/mL).

En la tabla 2 se muestran las desviaciones estándar de las nanopartículas de quitosano con CYP_{BM-3} F87A con glutaraldehído y sin glutaraldehído.

Tabla 2. Desviación estándar a las 0 h, las 24 h y las 48 h de las nanopartículas de quitosano con CYP_{BM-3} F87A con y sin glutaraldehído.

	0 h	24 h	48 h
NP's con glutaraldehído	0.002	0.00053	0.00018
NP's sin glutaraldehído	0.0010	0.0063	0.00037

7.2. Modificación química de la enzima.

En los resultados anteriores se mostró la pérdida de la actividad enzimática. Con el objetivo de incrementar las interacciones favorables entre la enzima y el quitosano, se introdujeron grupos carboxilo en la superficie de la proteína. La idea es incrementar las cargas complementarias entre los aminos del quitosano y los carboxilos de la proteína. Se realizó una modificación en la enzima CYP_{BM-3} F87A con ácido malónico en presencia de carbodiimida con el objetivo de agregar más grupos carboxilos al CYP modificando los aminos. En la Figura 6 se muestra un diagrama de la modificación del citocromo al añadir los grupos carboxilo del ácido malónico.

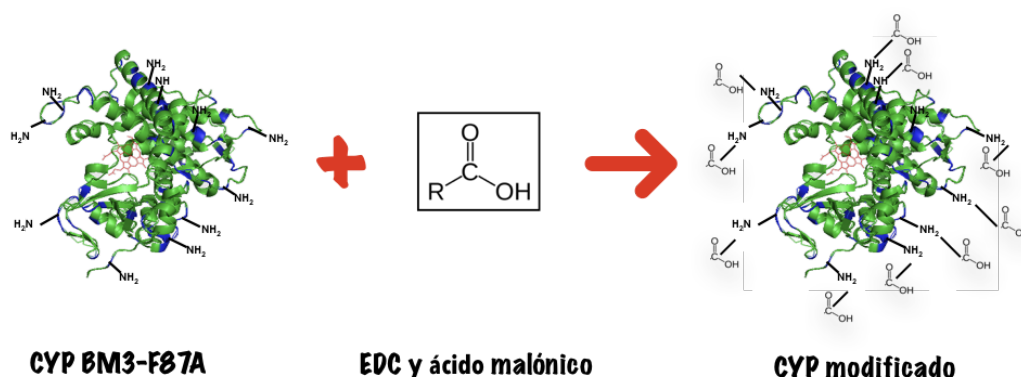


Figura 6. Diagrama de la modificación del citocromo añadiendo más grupos carboxilo. La modificación fue realizada utilizando la carbodiimida y el ácido malónico (5)

7.3. Estabilidad de nanopartículas con enzima modificada

Una vez realizada la modificación de la enzima, se prosiguió realizar la síntesis de nanopartículas siguiendo el protocolo mencionado en la sección de metodología 6.6. La actividad inicial de las nanopartículas cargadas con la enzima modificada (0.041 U/mL) fue 3 veces mayor que la obtenida usando la enzima no modificada (0.013 U/mL). Esto demuestra que la carboxilación de la superficie de la enzima promueve una mayor carga de las nanopartículas.

En la Figura 7, se muestra la evolución con respecto al tiempo de la actividad enzimática de las nanopartículas de quitosano con la enzima modificada, comparada con la no modificada. Las nanopartículas con la CYP carboxilada solo pierden el 10% de su actividad en 48 horas, comparado con el 30% de la enzima no modificada en solo 24 horas de almacenamiento. Concluyendo, que además de obtener una mayor carga, la enzima carboxilada mostró también una mejor estabilidad y permaneció más tiempo encapsulada.

En la tabla 3 se muestran las desviaciones estándar de las nanopartículas de quitosano con CYP_{BM-3} F87A modificada y sin modificar.

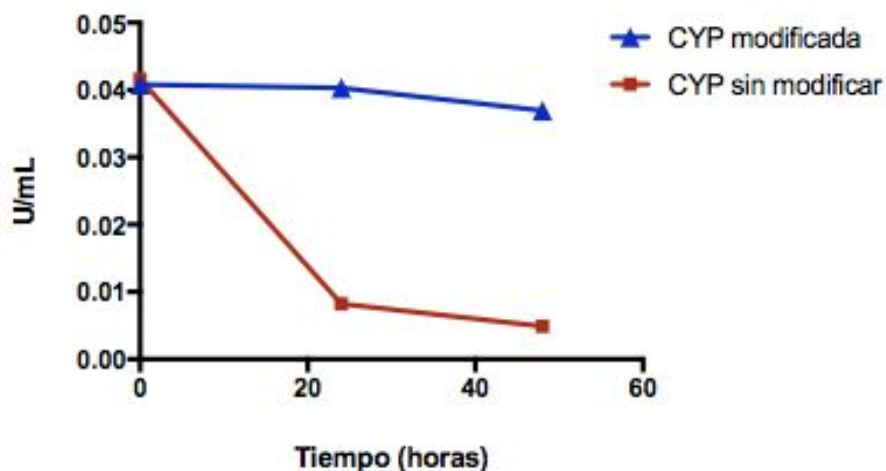


Figura 7. Evaluación de la actividad enzimática de las nanopartículas de quitosano con la enzima modificada con carbodiimida y ácido malónico. La evaluación fue a las 0, 24 y 48 horas después de la síntesis.

Tabla 3. Desviación estándar a las 0 h, las 24 h y las 48 h de las nanopartículas de quitosano con CYP_{BM-3} F87A sin modificar y modificada

	0 h	24 h	48 h
NP's con CYP _{BM-3} F87A sin modificar	0.002	0.00053	0.00018
NP's con CYP _{BM-3} F87A modificada	0.0069	0.0009	0.0005

7.4. Determinación de las constantes cinéticas

Al obtener una exitosa encapsulación y actividad de las nanopartículas de quitosano con la enzima modificada se prosiguió a determinar las constantes catalíticas variando la concentración de peróxido de hidrógeno. En la Figura 8 se puede observar la saturación de las nanopartículas, en este caso los datos fueron ajustados al modelo cinético de Michaelis-Menten utilizando un software llamado GraphPad Prism 7. El mismo software arrojó la velocidad máxima $V_{\max} = 0.054 \text{ U/mL}$, mientras que la constante de Michaelis-Menten fue de $K_m = 5.02 \text{ mM}$.

En la tabla 4 se muestran las desviaciones estándar para cada una de las concentraciones del peróxido de hidrógeno al saturar las nanopartículas de quitosano con $\text{CYP}_{\text{BM-3}} \text{ F87A}$ modificada.

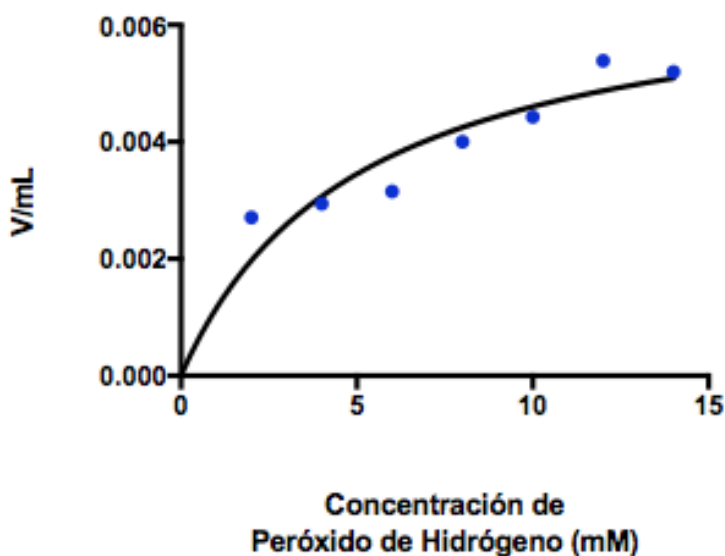


Figura 8. Gráfica de saturación de nanopartículas, de quitosano con actividad P450, con peróxido de hidrógeno.

Tabla 4. Desviación estándar a diversas concentraciones en mM de peróxido de hidrógeno al saturación con peróxido de hidrógeno a las nanopartículas de quitosano con $\text{CYP}_{\text{BM-3}} \text{ F87A}$

Concentración (mM)	Desviación Estándar
2	0.000399
4	0.000434
6	0.000465
8	0.000589
10	0.000653
12	0.000794
14	0.000765

7.5. Caracterización por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las nanopartículas (con 0.02% y 0.04% de glutaraldehído)

Se tomaron micrografías de TEM de dos síntesis de distintas nanopartículas. En la Figura 9 se pueden observar las nanopartículas de quitosano con 0.02% de glutaraldehído. Las nanopartículas tienen tendencia a aglomerarse, sin embargo, se puede observar que las nanopartículas tienen una forma esférica consistente.

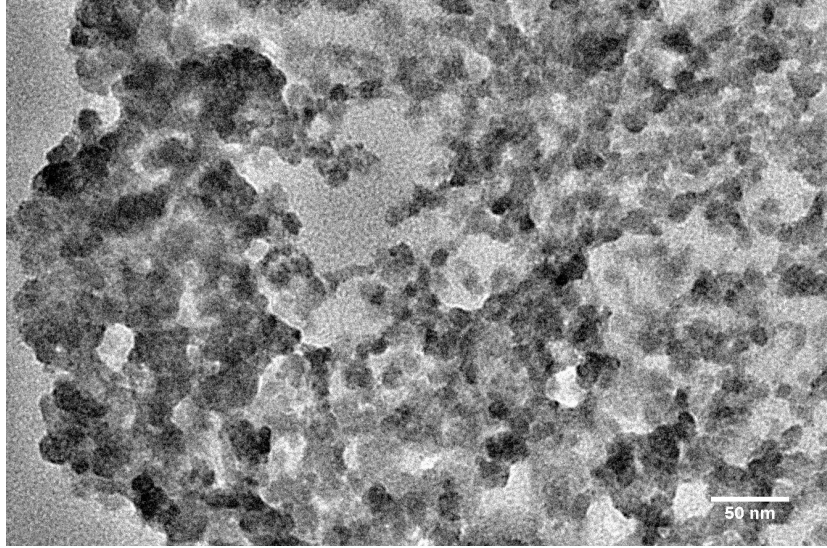


Figura 9. Imagen de TEM de nanopartículas de quitosano con actividad del citocromo P450 con 0.02% de glutaraldehído.

Debido a la aglomeración de nanopartículas de la Figura 9, la preparación se sometió a una sonicación para disgregar las nanopartículas biocatalíticas y se realizaron nuevas microfotografías. Las imágenes que se muestran en la Figura 10. En la Figura 10a se pueden observar pequeñas aglomeraciones. En las Figuras 10a, 10b, 10c y 10d se pueden observar formas esféricas de diversos tamaños que oscilan entre 20 y 100 nm.

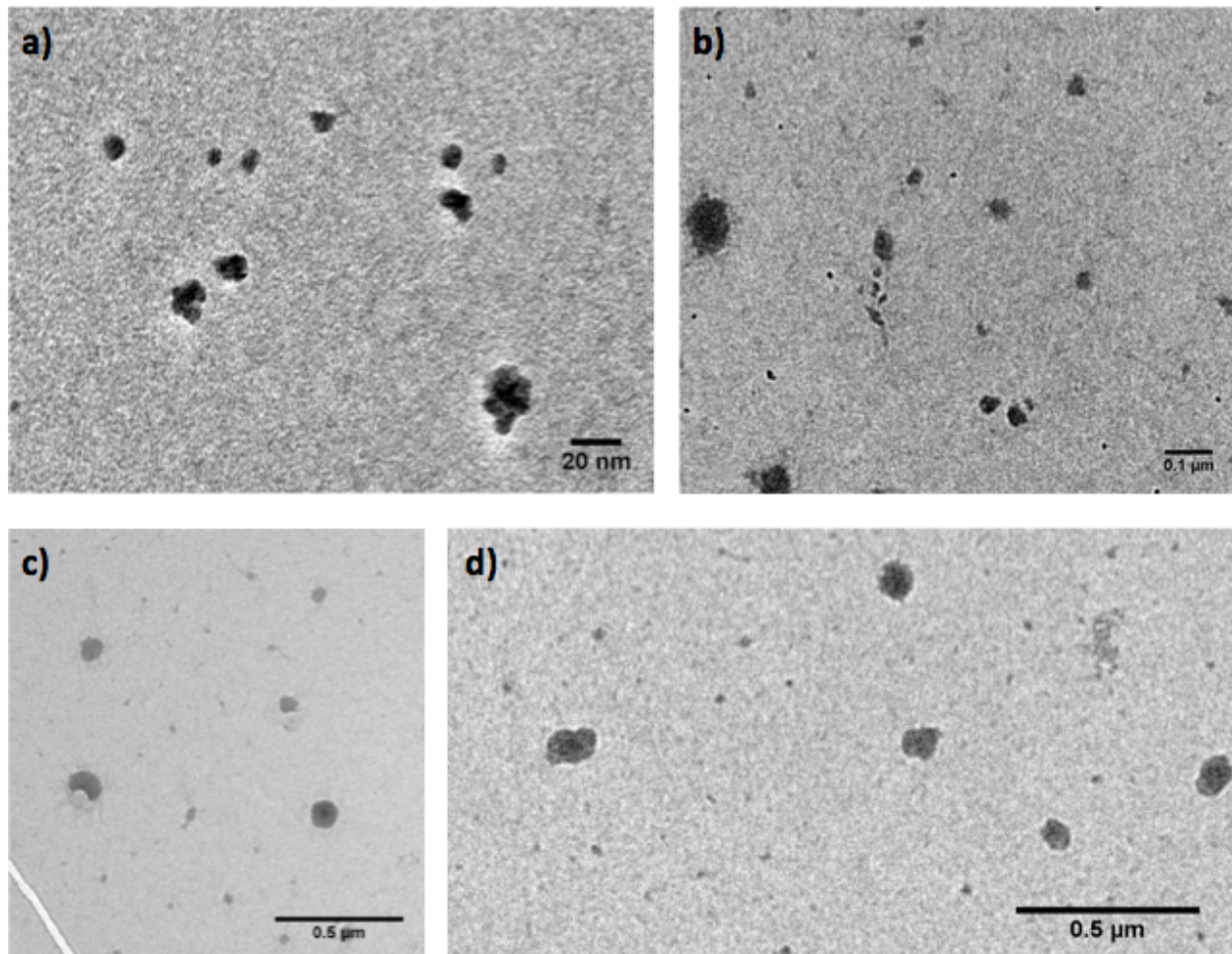


Figura 10. Imágenes de TEM de nanopartículas de quitosano con actividad del citocromo P450 con 0.04% de glutaraldehído.

7.6. Funcionalización

Al obtener actividad de las nanopartículas se prosiguió funcionalizar las nanopartículas mediante diversos métodos y reactivos. El primer método consistió en funcionalizar las nanopartículas con ácido fólico en presencia de EDC y NHS. Sin embargo, al efectuar la evaluación espectrofotométrica de la actividad catalítica se observó que no había actividad en las nanopartículas ni en el sobrenadante. Lo mismo sucedió funcionalizar las nanopartículas

solamente con EDC y NHS. Este último experimento fue con el propósito de realizar un entrecruzamiento, sin embargo, tampoco se encontró actividad en las nanopartículas o sobrenadante. Finalmente, se funcionalizaron las nanopartículas con el PEG activado con cloruro cianúrico, en donde también se perdió la actividad en las nanopartículas, se observó cierta actividad en el sobrenadante. A continuación, en la tabla 5, se observa lo descrito anteriormente.

Tabla 5. Actividad enzimática de las nanopartículas de quitosano con CYP_{BM-3} F87A modificado y del sobrenadante al utilizar los diferentes métodos de funcionalización.

<i>Método de Funcionalización</i>	Actividad Enzimática	
	<i>Nanopartículas</i>	<i>Sobrenadante</i>
Ácido fólico + EDC + NHS	No	No
EDC + NHS (entrecruzamiento)	No	No
mPEG activado con cloruro cianúrico	No	Sí

Capítulo 8. Discusión

Existen muchos métodos de síntesis de nanopartículas de quitosano, sin embargo, en este trabajo se utilizó el método de gelación iónica y entrecruzar el quitosano con el glutaraldehído. Con este método las nanopartículas se forman debido a las interacciones inter- e intramoleculares de los grupos amino del quitosano. Se utilizó el tripolifosfato de sodio (TPP) porque es un polianión y puede adecuarse a los grupos amino del quitosano, básicamente es un entrecruzante químico y proporcionó la particular forma esférica de las nanopartículas.

Sin embargo las nanopartículas no tienen resistencia mecánica, es por ello que se utilizó el glutaraldehído. El glutaraldehído tiene grupos aldehídos los cuales se entrecruzan con los grupos funcionales amino del quitosano, de esta forma se otorga resistencia, estabilidad, tamaño y forma más definida en las nanopartículas.

En la Figura 11 se muestra un esquema de la síntesis de nanopartículas. Se forman nanopartículas esféricas porque el quitosano tiene una carga positiva y el TPP tiene carga negativa, esto hace que se precipitan y se formen las partículas [1].

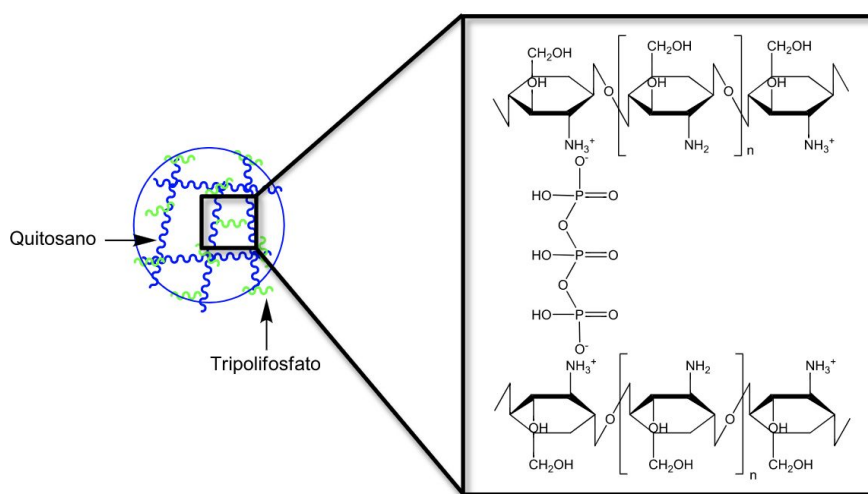


Figura 11. Esquema de la síntesis de nanopartículas de quitosano utilizando la gelación iónica. En el recuadro de la izquierda se pueden observar los grupos aminos del quitosano entrecruzados con los grupos fosfato del TPP (6).

Por otro lado el proceso de gelación iónica tiene muchas ventajas, principalmente que el proceso es relativamente sencillo y se evita el uso de solventes orgánicos y temperaturas altas, permitiendo la encapsulación de moléculas frágiles como las proteínas, en otras palabras es ideal para encapsular enzimas. Bodmeier y colaboradores en 1989 fueron los primeros en preparar nanopartículas de quitosano utilizando el TPP, formando hidrogeles, los cuales tienen una superficie de carga positiva y una muy buena capacidad de encapsulación [1].

Sin embargo, la gelación iónica tiene un gran inconveniente, las nanopartículas no tienen resistencia mecánica. Es por ello que en la síntesis se agregó el glutaraldehído con el propósito de estabilizar las nanopartículas y otorgar la resistencia mecánica necesaria para poder cumplir su función. Además, el tamaño de las nanopartículas fue consistente. En trabajos anteriores se han reportado tamaños de nanopartículas que oscilan entre los 10 y 400 nm [27]. En este trabajo se obtuvieron tamaños dentro de ese intervalo, lo cual confirma que utilizar el método es efectivo. Por otro lado, las imágenes de TEM confirmaron la forma esférica de las nanopartículas de quitosano. Además, el tamaño de nanopartícula no se vio afectado por la concentración de glutaraldehído.

En este trabajo se obtuvieron exitosamente las nanopartículas de quitosano mediante la gelación iónica y se logró encapsular dentro de ellas el citocromo P450 de la bacteria *Bacillus megaterium*. En diversos trabajos se ha reportado la exitosa encapsulación de estas enzimas [6].

Si bien, inicialmente se logró encapsular el citocromo de la bacteria *Bacillus megaterium* con el fin de aumentar la carga de enzima en las nanopartículas de quitosano, se modificaron los grupos amino presentes en la superficie de la enzima introduciendo grupos carboxilo con el fin de aumentar las interacciones de la proteína con los aminos del quitosano. La estrategia fue exitosa ya que se logró encapsular 3 veces más enzima. Adicionalmente, otra ventaja de la modificación de la enzima es que permaneció más tiempo encapsulada que la enzima no modificada. Esto sin duda se debe a una mayor interacción entre los grupos amino del quitosano y los grupos carboxilo de la proteína modificada.

La cinética enzimática de las nanopartículas biocatalíticas mostró un comportamiento de Michaelis-Menten y se ajustó a una hipérbola rectangular. Se obtuvo la constante de afinidad de $K_m = 5.02$ mM y una velocidad máxima $V_{max} = 0.054$ U/mL.

En estudios previos, se han funcionalizado el CYP_{BM-3} F87A con PEG que contiene ácido fólico. Este tipo de funcionalización puede servir como un nanovehículo para tratar el cáncer de mama utilizando la terapia enzimática con el objetivo de aumentar la activación del profármaco tamoxifeno reduciendo significativamente la dosis de este fármaco para destruir las células tumorales y disminuir los efectos secundarios causados por la quimioterapia. Por otro lado, al cubrir el citocromo con polietilenglicol, no se observó actividad inmunogénica [16].

Con los previos estudios [16] y con los resultados obtenidos (mencionados en la sección de resultados 7.3) se abre la posibilidad de utilizar estas nanopartículas con el citocromo CYP_{BM-3} con más grupos carboxilo para aumentar la activación del profármaco tamoxifeno. Sin embargo se requieren de más experimentos para comprobar el comportamiento.

En este trabajo se utilizaron tres métodos distintos de funcionalización. En el primero las nanopartículas de quitosano fueron funcionalizadas solamente con ácido fólico en presencia de NHS y EDC. Al efectuar la evaluación de carga se encontró que no había actividad en el sobrenadante ni en las nanopartículas, esto puede ser debido a una disrupción de las nanopartículas originada por la introducción del ácido fólico y la pérdida del balance de cargas en la gelación iónica. De esta manera, la enzima se libera y entonces es susceptible de ser modificada por el ácido fólico inactivándola.

El efecto inactivador del protocolo de modificación se comprobó cuando se sometieron las nanopartículas a una modificación solo en presencia de EDC y NHS (segundo método de funcionalización), sin ácido fólico. Aquí se encontró también una pérdida de la actividad tanto en las nanopartículas como en el sobrenadante. Este resultado sugiere que la presencia de los activadores de carboxilos, EDC y NHS, podrían estar promoviendo la reacción intermolecular de los grupos aminos y carboxilos libres de la molécula de enzima entrecruzándolos y alterando su estructura tridimensional y finalmente inactivándola.

Finalmente se funcionalizaron las nanopartículas utilizando PEG activado con cloruro cianúrico, hay trabajos reportados en donde las nanopartículas de quitosano con actividad lacasa

fueron funcionalizadas con este PEG, y se reportó un ligero aumento de la actividad enzimática en comparación con la enzima libre [15]. Sin embargo, en este trabajo, al efectuar la funcionalización con el PEG se observó que las nanopartículas no contenían actividad, pero el sobrenadante sí tenía actividad. Esto sugiere que el PEG activado con cloruro cianúrico no se retuvo dentro de la nanopartícula, probablemente el CYP_{BM-3} modificado destruye las nanopartículas e inactiva la enzima. Sin embargo, son necesarias más investigaciones para entender este fenómeno.

Con base a los resultados, de la funcionalización de las nanopartículas de quitosano, nos sugieren que la modificación química de las nanopartículas de quitosano conteniendo CYP modificado destruye las nanopartículas e inactiva a la enzima, es decir, se destruye la capa de quitosano, esto hace que la enzima no se pueda mantener dentro de la nanopartícula de quitosano. Sin embargo, futuras investigaciones son necesarias para entender este fenómeno.

Con base a los resultados de la sección 7.3 se desprende que la estabilidad de las nanopartículas de quitosano previamente cargadas con CYP no es suficiente cuando se someten a una reacción de modificación química en la cual intervengan los grupos amino y carboxilo. Sin embargo, se requiere de más investigación para determinar las causas de la pérdida de actividad durante la funcionalización de las nanopartículas biocatalíticas.

Capítulo 9. Conclusiones

La síntesis de nanopartículas de quitosano aplicando el protocolo de Calvo 1997 y el método de gelificación iónica, utilizando como contraión el tripolifosfato de sodio (TPP), proporcionó estabilidad a las nanopartículas de quitosano. El entrecruzamiento con el glutaraldehído confirió a las nanopartículas de quitosano una mayor estabilidad y resistencia mecánica contrastando con aquellas nanopartículas sin glutaraldehído.

Con la exitosa síntesis de nanopartículas de quitosano, se logró encapsular la mutante F87A del dominio hemo del citocromo bacteriano CYP_{BM-3}. Interesantemente, al agregar los grupos carboxilo provenientes del ácido malónico sobre la superficie de la molécula del citocromo, se logró potenciar la actividad de la enzima e incrementar su permanencia dentro de las nanopartículas de quitosano.

La evaluación cinética del citocromo modificado con más grupos carboxilo demostró tener una K_m menor, lo que indica que hay buena afinidad de la enzima con su sustrato indicando relativamente baja limitaciones de transferencia de masa del sustrato hacia el interior de las nanopartículas. Así mismo una mayor estabilidad y eficiencia catalítica.

La funcionalización de las nanopartículas no fue exitosa debido a que el CYP_{BM-3} F87A se liberaba del interior de la nanopartícula de quitosano. Con base en los resultados, es posible que la modificación química de las nanopartículas de quitosano conteniendo en su interior el CYP_{BM-3} modificado destruye las nanopartículas e inactiva la enzima. Sin embargo, son necesarias más investigaciones para entender este fenómeno.

Bibliografía y referencias

- [1] Agnihotri, S. A., Mallikarjuna, N. N. & Aminabhavi, T. M. (2004). *Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery*. Journal of Controlled Release 100 (2004) 5-28.
- [2] Alarcón Payán, Dulce Anahí. (2017). *Diseño de nanopartículas de quitosano con actividad peroxidasa para la degradación de contaminantes*. (Tesis de Maestría). Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Baja California, México.
- [3] Calvo, P., Remuñan-López, C., Vila-Jato, JL. & Alonso, MJ. (1997). *Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines*. NCBI. Oct;14(10):1431-6.
- [4] Chan WCW. (2006). *Bionanotechnology progress and advances*. Biol. Blood Marrow Transpl. Pgs., 12, 87–91.
- [5] Cirino, P. C. & Arnold, F. H. (2002). *Regioselectivity and Activity of Cytochrome P450 BM-3 and Mutant F87A in Reactions Driven by Hydrogen Peroxide*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. Pgs. 932-937.
- [6] Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. The Central Role of Enzymes as Biological Catalysts. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9921/>
- [7] Eppinger, M., Bunk, B., Johns, M. A., Edirisinghe, J. N., Kutumbaka, K. K., Koenig, S. S. K., Creasy, H. H., Rosovitz, M. J., Riley, D. R., Daugherty, s., Martin, M., Elbourne, L. D. H., Paulsen, I., Biedendieck, R., Braun, C., Grayburn, S., Dhingra, S., Lukyanchuk, V., Ball, B., Ul-Qamar, R., Seibel, J., Bremer, E., Jahn, D., Ravel, J. & Vary, P. (2011) *Genome Sequences of*

the Biotechnologically Important Bacillus megaterium Strains QM b1551 and DSM319. Journal of Bacteriology. American Society for Microbiology. Vol. 193. No. 16. Pgs. 4199-4213.

[8] Gallego-Fernández, A., Asunción de Sande-García, M., Marín-Fernández, A. M., Blanco Ramos, S., & González-Galán, M. J. (2011). *Aspectos Fundamentales del Citocromo P450*. Editorial: ADEMÁS comunicación Gráfica, s.l. Pgs. 7-33.

[9] Gan, Q. & Wang, T. (2007). *Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier - Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release*. Colloids and Surfaces. Elsevier 59 (2007) 24-34.

[10] Helmholtz-Zentrum Berlin für Materialien und Energie. (2017). *New model for bimolecular reactions in nanoreactors*. ScienceDaily. Accesado el 15 de Octubre del 2017. De la liga: <https://www.sciencedaily.com/releases/2017/08/170804091344.htm>

[11] Joo, H., Arisawa, A., Lin, Z. & Arnold, FH. (1999). *A high-throughput digital imaging screen for the discovery and directed evolution of oxygenases*. Chem. Biol. Oct;6(10):699-706.

[12] Journal of the American Chemical Society. (2016). *Nanoreactors: Small Spaces, Big Implications in Chemistry*. J. Am. Chem. Soc. 2016, 138, 1743-7445. DOI: 10.1021/jacs.6b05393.

[13] Khor, E. & Yong-Lim, L. (2003). *Implantable applications of chitin and chitosan*. Elsevier. Biomaterials 24, 2339-2349.

[14] Koyani, Rina, Pérez-Robles, Javier, Cadena-Nava, Ruben y Vazquez-Duhalt, Rafael. (2016). *Biomaterial-based nanoreactors, an alternative for enzyme delivery*. De Gruyter. DOI: 10.1515/ntrev-2016-0071.

- [15] Koyani, Rina y Vázquez-Duhalt, Rafael. (2016). *Laccase encapsulation in chitosan nanoparticles enhances the protein stability against microbial degradation*. Environmental Science and Pollution Research. No.23. DOI: 10.1007/s11356-016-7072-8.
- [16] Mortera Domínguez, Gabriela & Vázquez Duhalt, Rafael. *Conjugados biocatalíticos basados en quitosano*. Instituto de biotecnología-UNAM, Cuernavaca, Morelos, México.
- [17] Omura, T. & Sato, R. (1964). *Cytochrome P-450: An Inconspicuous Start*. J. Biol. Chem. 239:2370-8. Institute for Protein Research, Osaka University, Japón.
- [18] Quaroni, Luca; Seward, Harriet; McLean, Kirsty; Girvan, Hazel; Ost, Tobias; Noble, Michael; Kelly, Sharon; Price, Nicholas; Cheesman, Myles; Smith, Ewen & Munro, Andrew. (2004). *Interaction of Nitric Oxide with Cytochrome P450 BM3*. Biochemistry, 43, 16416-16431.
- [19] Quester, Katrin; Juárez-Moreno, Karla; Secundino, Ismael; Roseinstein, Yvonne; Alejo, Karla; Huerta-Saquero, Alejandro & Vazquez-Duhalt, Rafael. (2016). *Cytochrome P450 Bioconjugate as a Nanovehicle for Improved Chemotherapy Treatment*. Macromolecular Bioscience. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10856-010-3998-4>
- [20] Quiñones, L., Rosero, M., Roco, A., Moreno, I., Sasso, J., Varela, N., Cáceres, D. & Saavedra, I. (2008). *Papel de las enzimas citocromo P450 en el metabolismo de fármacos antineoplásicos: Situación actual y perspectivas terapéuticas*. Revista Médica Chile. 136: 1327-1335.
- [21] Rampino, A., Borgogna, M., Blasi, P., Bellich, B. & Cesàro, A. (2013). *Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability*. International Journal of Pharmaceutics. Elsevier. 455 (2013) 219-228.

[22] Sadjadi, Samahe. (2016). *Introduction to Nanoreactors*. En el libro: *Organic Nanoreactors: From Molecular to Supramolecular Organic Compounds*. Primera edición. Pgs. 1-10.

[23] Sánchez Sánchez, Lorena Paulina y Vázquez-Duhalt, Rafael. *Cápsides virales como nanoacarreadores enzimáticos para quimioterapia*. Revista Digital Universitaria [en línea]. 1 de Agosto del 2014, Vol. 15, No.8. Disponible en Internet: <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num8/art61/> , ISSN: 1607-6079.

[24] Soberón Mainero, Xavier y González Covarrubias, Vanessa. *Enfermedades infecciosas, hacia una medicina personalizada*. Revista Digital Universitaria [en línea]. 1 de junio del 2014, Vol. 15, No.6. Disponible en Internet: <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num6/art43/> , ISSN: 1607-6079.

[25] Takeuchi, Noboru. (2013). *Nanociencia y nanotecnología. La construcción de un mundo mejor átomo por átomo*. Fondo de Cultura Económica (FCE). Pgs., 14-15, 49, 50.

[26] Vázquez Muñoz, Roberto. *La bionanotecnología y su divulgación científica en México*. Revista Digital Universitaria [en línea]. 1 de marzo del 2013, Vol. 14 No.3. Consultada el 4 de Octubre del 2017. Disponible en Internet: <http://www.revista.unam.mx/vol.14/num3/art22/#a> , ISSN: 1607-6079

[27] Zhao, L.M., Zhang, Z. L., Chen, J. M., Shi, D. D., Yang, J. & Tang, Z. X. (2011). *Preparation and Application of Chitosan Nanoparticles and Nanofibers*. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 28 (03), 353-362.

Referencia de imágenes

- (1) Estructura de una enzima. Accesado en abril del 2017. Obtenido de la liga: https://www.google.com.mx/search?q=partes+de+una+enzima&espv=2&tbm=isch&imgil=uk_n7AkqgGjV4M%253A%253BA1zTDIf-qtv8dM%253Bhttp%25253A%25252F%25252Fidaliabiologia.blogspot.com%25252F2010_10_10_archive.html&source=iu&pf=m&fir=uk_n7AkqgGjV4M%253A%252CA1zTDIf-qtv8dM%252C_&usg=__ilNgQ2_SVu sGN1Gqi9Y2KdNQMyU%3D&biw=998&bih=663&ved=0ahUKEwi8-4iL1pDTAhXog FQKHbaCDsMQyjcIJQ&ei=Z6XmWPyrLeiB0gK2hbqYDA#imgrc=CPJd7S11T6EyyM
- (2) Estructura general del Citocromo P450. Accesado en abril del 2017. Obtenido de la liga: http://www.wikiwand.com/de/Cytochrom_P450
- (3) Imagen de la bacteria *Bacillus megaterium*. Obtenido de la liga: https://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus_megaterium
- (4) CYP_{BM-3} y la mutante F87A del CYP_{BM-3}. Obtenido del software PyMOL 2.0.
- (5) Diagrama de la modificación del citocromo añadiendo más grupos carboxilo. Obtenido del software Maestro 11.
- (6) Esquema de la síntesis de nanopartículas de quitosano utilizando la gelación iónica. Alarcón Payán, Dulce Anahí. (2017). *Diseño de nanopartículas de quitosano con actividad peroxidasa para la degradación de contaminantes*. (Tesis de Maestría). Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Baja California, México.

Anexo 1. Metodología

Determinación de los moles de CYP_{BM-3} F87A

Se utilizó la siguiente ecuación para determinar los moles de la enzima modificada:

$$\text{Concentración} = \frac{\Delta C}{\text{min}} = \frac{\Delta C}{\epsilon * l} = \frac{\text{Promedio de la pendiente de la absorbancia}}{(95000/M*cm)(1 \text{ cm})} = 'x' \text{ Moles}$$

Determinación de cantidades para la carbodiimida y el ácido malónico.

Se determinó en gramos las cantidades necesarias para modificar y aumentar la actividad enzimática del CYP_{BM-3}, en este caso se utilizó la carbodiimida y el ácido malónico.

$$\text{Carbodiimida} = (31 \text{ lisinas})(\text{Concentración en moles del CYP})(\text{Peso molecular})(1.6)$$

$$\text{Ácido malónico} = (62 \text{ lisinas})(\text{Concentración en moles del CYP})(\text{Peso molecular})(1.6)$$

Para ambos casos el resultado quedó en g/mL, es decir, por cada 1 mL de enzima se colocó 'x' gramos.

Solución de Quitosano

En un vaso de precipitado se colocaron 100 ml de agua destilada filtrada, 0.25g de quitosano y 2 ml de ácido acético. Se coloca un agitador magnético y se deja mezclar por 24 horas. Posteriormente se filtró la solución de quitosano y se midió el pH con un potenciómetro, se equilibró la solución con ácido clorhídrico (1M) e hidróxido de sodio (1M) hasta que se obtuvo un pH de 3. Posteriormente se almacenó en refrigeración a 10°C.

Tripolifosfato de Sodio (TPP)

En un vaso de precipitado se colocó 100 ml de agua destilada y filtrada, y 0.025 g de TPP. Se disolvió y se midió el pH ajustandolo a 9 con ácido clorhídrico (1M) y cloruro de sodio (1M). Posteriormente se filtró y se guardó en refrigeración a 10°C.

Glutaraldehído 0.04%

Para esta reacción se requiere que el glutaraldehído esté a una concentración de 0.04% para 15 ml, para ello se utilizó la ecuación (N) para calcular la cantidad de glutaraldehído:

$$\begin{aligned}C_1V_1 &= C_2V_2 & (N) \\(100\%)(15mL) &= (0.04\%) V_2 \\V_2 &= 6\mu L\end{aligned}$$

Se colocó 6μL de glutaraldehído en un frasco ámbar y 15 mL de agua destilada, posteriormente se colocó en refrigeración a 10°C.

Buffer Trizma-HCl

Para la enzima CYP450 se necesita que este buffer tenga una concentración de 50 mM para 100 ml, para ello se utilizó la ecuación (N):

$$Peso (g) = (Peso molecular)(Volumen deseado)(Concentración) \quad (N)$$

Por lo tanto se realizó lo siguiente:

$$Peso = (121.14 g/mol)(100 ml)(50mM) = 0.6057 g$$

Por lo tanto se pesó 0.6057g de Trizma y fue disuelto en 100 ml de agua destilada y filtrada, posteriormente se ajustó el pH con el potenciómetro a 8 con ácido clorhídrico (1M). Finalmente fue filtrado y almacenado en el refrigerador a 10°C.

Buffer MES

Para la enzima CYP450 se necesita que este buffer tenga una concentración de 50 mM para 2000 mL, para ello se utilizó la ecuación (N):

$$Peso (g) = (Peso\ molecular)(Volumen\ deseado)(Concentración)$$

Por lo tanto se realizó lo siguiente:

$$Peso = (195.2\ g/mol)(2000\ ml)(0.05M) = 19.52\ g$$

Por lo tanto se pesó 19.52 g de MES y fue disuelto en 2000 ml de agua destilada con 200 mL de glicerol. Posteriormente se ajustó el pH con el potenciómetro a 7.5 con ácido clorhídrico (1M).

TEM PTA

En un tubo eppendorf de 1.5 mL se colocó 0.02g de PTA y 1 mL de agua destilada, se agitó suavemente y utilizando el hidróxido de potasio 1 M se ajustó el pH a 7.