

192  
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

" CINÉTICA DE MICELAS INVERTIDAS DE CATALASA  
EN UN DISOLVENTE APOLAR.  
ENSAYO POLAROGRAFICO."

TESIS

QUE PARA OBTENER  
EL TÍTULO DE BIÓLOGO

PRESENTA

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

CAROLINA SALVADOR HERNÁNDEZ



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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 está 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.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## INDICE

pág

### I INTRODUCCION

1.1. Importancia del agua en los organismos vivos.....	1
1.2. El agua en la célula.....	2
1.3. Propiedades físicas del agua.....	3
1.4. Propiedades fisicoquímicas de las micelas invertidas.....	5
1.4.1. Estructura de las micelas invertidas.....	5
1.4.2. Propiedades del agua de la cavidad micelar.....	7
1.4.3. Intercambio dinámico entre las micelas invertidas.....	7
1.5. OBJETIVO.....	12
1.6. Electrodo de Clark.....	12
1.7. Propiedades de la catalasa.....	13

### II MATERIAL Y METODOS

2.1. Condiciones experimentales generales.....	15
2.1.1. Solubilización del sustrato en el medio micelar.....	15
2.1.2. Preparación de las micelas de catalasa.....	16
2.1.3. Ensayos oximétricos.....	16
2.2. Determinación de la solubilidad del oxígeno en un medio de micelas invertidas de $\text{AOT } 0.2 \text{ M}$ en tolueno.....	17
2.2.1. Por el consumo de oxígeno durante la oxidación de cantidades conocidas de ditionita.....	17
2.2.1.1. Medio acuoso.....	17
2.2.1.2. Medio micelar.....	18
2.2.2. Por la producción de oxígeno a partir de la reducción de cantidades conocidas de perborato de sodio por la catalasa.....	18
2.2.2.1. Medio acuoso.....	18
2.2.2.2. Medio micelar.....	18
2.3. Parámetros cinéticos de la actividad de la catalasa.....	19
2.3.1. Medio acuoso.....	19
2.3.2. Medio micelar.....	19
2.4. Ensayo de la actividad de la catalasa en función del pH.....	19
2.4.1. Medio acuoso.....	19
2.4.2. Medio micelar.....	19
2.5. Inhibición de la actividad de la catalasa con azida de sodio.....	20
2.5.1. Medio acuoso.....	20
2.5.2. Medio micelar.....	20

## INDICE. (continuación)

2.6. Termoestabilidad de la catalasa.....	20
2.6.1. Medio acuoso.....	20
2.6.2. Medio micelar.....	21
<b>III RESULTADOS</b>	
3.1. Determinación de la solubilidad del oxígeno en un medio de micelas invertidas de PGT 0,2 M en tolueno.....	22
3.1.1. Método químico.....	22
3.1.2. Método enzimático.....	23
3.2. Parámetros cinéticos de la actividad de la catalasa.....	24
3.2.1. Determinación de $K_m$ .....	24
3.2.1.1. Medio acuoso.....	24
3.2.1.2. Medio micelar.....	27
3.2.2. Determinación de $K_p$ .....	27
3.2.2.1. Medio acuoso.....	27
3.2.2.2. Medio micelar.....	27
3.3. Ensayo de la actividad de la catalasa en función del pH.....	30
3.3.1. Medio acuoso.....	30
3.3.2. Medio micelar.....	30
3.4. Sensibilidad de la catalasa ante la azida de sodio.....	32
3.4.1. Medio acuoso.....	32
3.4.2. Medio micelar.....	32
3.5. Termoestabilidad de la catalasa.....	34
3.5.1. Medio acuoso.....	35
3.5.2. Medio micelar ( $w_0 = 7$ ).....	35
3.5.3. Medio micelar ( $w_0 = 3$ ).....	37
<b>IV DISCUSION.....</b>	<b>38</b>
<b>V CONCLUSIONES.....</b>	<b>45</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>46</b>

## INDICE (continuación)

2.6. Termoestabilidad de la catalasa.....	20
2.6.1. Medio acuoso.....	20
2.6.2. Medio micelar.....	21
<b>III RESULTADOS</b>	
3.1. Determinación de la solubilidad del oxígeno en un medio de micelas invertidas de AOT 0.2 M en tolueno.....	22
3.1.1. Método químico.....	22
3.1.2. Método enzimático.....	23
3.2. Parámetros cinéticos de la actividad de la catalasa.....	24
3.2.1. Determinación de $K_m$ .....	24
3.2.1.1. Medio acuoso.....	24
3.2.1.2. Medio micelar.....	27
3.2.2. Determinación de $K_p$ .....	27
3.2.2.1. Medio acuoso.....	27
3.2.2.2. Medio micelar.....	27
3.3. Ensayo de la actividad de la catalasa en función del pH.....	30
3.3.1. Medio acuoso.....	30
3.3.2. Medio micelar.....	30
3.4. Sensibilidad de la catalasa ante la azida de sodio.....	32
3.4.1. Medio acuoso.....	32
3.4.2. Medio micelar.....	32
3.5. Termoestabilidad de la catalasa.....	34
3.5.1. Medio acuoso.....	35
3.5.2. Medio micelar ( $w_0=7$ ).....	35
3.5.3. Medio micelar ( $w_0=3$ ).....	37
IV DISCUSION.....	38
V CONCLUSIONES.....	45
BIBLIOGRAFIA.....	46

## FIGURAS

	pág
FIGURA 1. Estructura del bis(2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio (AOT).....	6
FIGURA 2. Estructura de una micela invertida.....	6
FIGURA 3. Posibles formas del intercambio de material entre las micelas invertidas.....	10
FIGURA 4. Determinación de la solubilidad del oxígeno en el tolueno.....	24
FIGURA 5. Curva de saturación de la actividad de la catalasa en el medio acuoso.....	25
FIGURA 6. Curva de Eadie-Hofstee para la actividad de la catalasa en el medio acuoso.....	26
FIGURA 7. Curva de saturación de la actividad de la catalasa en el medio micelar.....	28
FIGURA 8. Curva de Eadie-Hofstee para la actividad de la catalasa en el medio micelar.....	29
FIGURA 9. Curva de pH-actividad de la catalasa en el medio acuoso y en el medio micelar.....	31
FIGURA 10. Curva de inhibición de la actividad de la catalasa por la azida de sodio en el medio acuoso y en el medio micelar.....	33
FIGURA 11. Curva de la termocstabilidad de la catalasa en el medio acuoso y en el medio micelar.....	36

## I. INTRODUCCION

1.1. Importancia del agua en los organismos vivos. Actualmente el agua constituye las tres cuartas partes de la superficie terrestre. El agua, es uno de los componentes esenciales para la vida; sólo el oxígeno es más importante que ella. Sin oxígeno, un organismo (aerobio) sólo sobrevive unos minutos; sin agua, horas o días, según la especie. El agua fué importante desde los orígenes de la vida misma. Se cree que las reacciones químicas, a partir de las cuales posteriormente evolucionaron los procesos biológicos, tuvieron lugar en un disolvente acuoso. El contenido de agua en los organismos varía: por ejemplo en algunas bacterias el agua constituye el 50 % y en algunos vertebrados el 95-97 % de su peso total respectivamente. En los seres humanos, del 60 al 95 % de su peso total es agua, y se encuentra localizada intra y extracelularmente (Bloomfield, 1984). Como consecuencia de esta abundancia, se consideraba al agua como un líquido inerte, meramente destinado a llenar espacios en los seres vivos. Sin embargo, el agua realiza muchas funciones biológicas; se encuentra en los organismos transportando nutrientes y oxígeno a las células y a la vez acarreando productos de deshecho. El agua también interviene en la digestión, actúa como lubricante en el tejido celular, regula la temperatura del cuerpo y el balance ácido-base de los fluidos celulares (Bloomfield, 1984). A nivel molecular el agua interviene en muchas reacciones químicas y en particular en lo relacionado con las macromoléculas celulares. Un



ejemplo de esto son las proteínas y los ácidos nucleicos cuyas propiedades biológicas derivan de sus interacciones con las moléculas de agua del medio que las rodea (Lehninger, 1970).

1.2. El agua en la célula. La matriz citoplásmica de las células animales se observa como una rejilla microtrabecular, en la que una red extraordinaria de estructuras se ramifica a través de todo el citoplasma acuoso, dando lugar a una enorme área de superficie (Clegg, 1984).

Respecto al agua celular, básicamente se presentan dos poblaciones de agua a raíz de la interacción que ésta presenta con la citomatrix: el agua "libre" y el agua de interfase.

Se ha encontrado en la célula que el agua adyacente a la superficie tiene propiedades que difieren del agua libre. Los ensayos de viscosidad demuestran que proteínas inyectadas en el citoplasma de células vivas difunden lentamente como si se estuvieran moviendo en una solución de sacarosa al 60 % (Martinek et al, 1982).

Esta alta viscosidad aparente del medio celular se ha explicado en base en las restricciones estéricas impuestas a la difusión de macromoléculas por el retículo endoplásmico (Mastro y Keith, 1984). Sin embargo, en el interior de los eritrocitos, los cuales carecen de microestructura intracelular, se ha encontrado que la difusión del agua es lenta y el hecho parece ser debido a que el agua en la célula se encuentra altamente estructurada (Tanner, 1983 y Drost-Hansen y Clegg, 1979).

En la actualidad se sabe que las propiedades fisicoquímicas del agua en el medio intracelular como son: la constante dieléctrica, viscosidad y polaridad, se encuentran alteradas por la interacción con los solutos intracelulares; lo que aún se discute es, qué porción del agua en la célula está interaccionando con alguna superficie y cuanta agua libre existe.

Hay un desacuerdo en relación a la distancia desde la superficie de membrana a partir de la cual cambian la estructura y las propiedades del agua. De ser dos monocapas de agua las que se encuentran unidas a una membrana, (aproximadamente 6 Å) éstas involucrarían del 4 al 8 % del agua citoplásmica total (Clegg, 1934). Otros autores proponen que la distancia puede ser de 50 Å y el agua citoplásmica involucrada sería del 33 al 66 % (Israelachvili y Pashley, 1982). Drost-Hansen (Drost-Hansen, 1932) propone que el agua que comprende un grosor hasta de 500 Å de la superficie tiene propiedades alteradas. De ser cierta su hipótesis toda el agua citoplásmica estaría comprometida con alguna superficie.

Actualmente, se reconoce que la citomatriz juega un papel crucial en la determinación de la estructura y propiedades del agua celular.

Las propiedades físicas del agua son las que determinan el tipo de sustancias que se van a solubilizar en ella.

1.3. Propiedades físicas del agua. Las propiedades del agua líquida son consecuencia de su estructura. Los relativamente

elevados puntos de fusión, ebullición, calor de vaporización y tensión superficial, son el resultado de fuertes atracciones intermoleculares en forma de puentes de hidrógeno entre moléculas de agua vecinas. La polaridad y las propiedades del agua para establecer puentes de hidrógeno hacen de ella un disolvente óptimo en la disolución de muchos compuestos iónicos; como las sales, porque la atracción entre el componente iónico de la molécula y el dipolo del agua es suficiente para provocar la atracción entre los iones mismos. Los compuestos polares, no iónicos como los azúcares y los alcoholes simples también son muy solubles en el agua (Lehninger, 1970).

A pesar de que la mayor parte del volumen y masa de las células es agua, se conoce muy poco de la estructura y de las propiedades del agua intracelular. Una de las razones de la falta de este conocimiento, estriba en la dificultad de estudiarla (Clegg, 1984).

Muchas enzimas en la célula actúan en o cerca de la interfase agua / medio orgánico y se les encuentra localizadas en la superficie de la membrana o dentro de ella. Es por ello que recientemente se han estudiado varias enzimas solubles y algunos componentes de membrana, en un sistema de micelas invertidas. Este modelo de membrana permite poner en contacto a una enzima con diferentes micro-ambientes acuosos, al utilizar disolventes apolares y variar la cantidad de agua en la cavidad micelar.

A partir de 1977 surgieron una serie de investigaciones enfocadas al estudio de la catálisis enzimática en medios

micelares con la capacidad de controlar la cantidad de agua. En esta época se usaron tensoactivos sintéticos para solubilizar algunas enzimas. Uno de los primeros trabajos en estos medios fue el de la  $\alpha$ -quimotripsina la que se solubilizó en ciclohexano vía un tensoactivo catiónico ( bromuro de N - metiltrioctilamonio ). Se encontró que prácticamente no había cambio en su espectro de absorción al compararlo con el que presenta en agua, lo que implicaba que la enzima preservaba su estructura nativa en el medio orgánico. Posteriormente, surgió el interés por estudiar la catálisis en los medios micelares y actualmente, existen numerosos ejemplos de como la actividad catalítica de la enzima no sólo se mantiene sino que es muy dependiente de la cantidad de agua en la micela invertida.

#### 1.4. Propiedades fisicoquímicas de las micelas invertidas.

1.4.1. Estructura de las micelas invertidas. Las micelas invertidas se forman al disolver en un disolvente orgánico apolar, un tensoactivo. Este último puede ser catiónico, aniónico, neutro o zwitteriónico. Uno de los tensoactivos aniónicos que se ha utilizado con mayor frecuencia en la caracterización de estas estructuras es el bis (2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio (AOT) (Fig.1). Este tipo de micelas presenta los grupos polares del tensoactivo concentrados en el interior del agregado y sus cadenas hidrofóbicas quedan en contacto con un disolvente apolar. Tienen forma esférica y un diámetro que va de 30 a 60 Å (Fendler, 1980, 1982; Fig. 2).

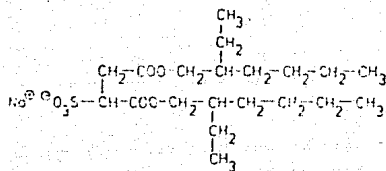


Fig. 1. bis (2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio "Aerosol OT" (AOT). (Tomado de Luisi y Steinmann-Hofmann, 1987).

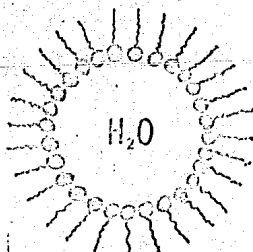


Fig. 2. Micela invertida en un disolvente orgánico apolar. (Tomado de Fendler, 1982).

1.4.2. Propiedades del agua de la cavidad micelar. Las micelas invertidas en un disolvente orgánico apolar son capaces de solubilizar grandes cantidades de agua (1-10 % (w/v) y otras sustancias polares (Douzou, 1980). La capacidad que tienen las micelas invertidas de solubilizar cierta cantidad de agua en un disolvente orgánico apolar depende principalmente del disolvente orgánico y de la naturaleza del tensoactivo utilizado. Se puede expresar el cociente molar del agua entre el tensoactivo como  $w_0$ .

El tensoactivo aniónico AOT, puede solubilizar una cantidad de agua un poco más alta a la que se requiere para hidratar las cabezas del sulfonato y el ión sodio (de cuatro a diez moléculas de agua por molécula de tensoactivo) en un disolvente aromático (Luisi y Magid, 1986; Fig. 1), y sólo aparece agua libre en la micela a  $w_0$  mayores de 10 ó 15.

Cuando se necesita solubilizar una cantidad de agua mayor, es preciso utilizar un disolvente hidrocarbonado alifático (en algunos casos el  $w_0$  es mayor a 70). El tamaño de la micela se incrementa conforme aumenta  $w_0$ . Cuando el volumen de agua se eleva se da lugar a la formación de lo que se llama una microemulsión, cuyo diámetro puede llegar a ser de 50 a 1000 Å.

En la cavidad acuosa de las micelas invertidas se han descrito dos tipos de agua. Primeramente las moléculas de agua que se encuentran firmemente unidas a los grupos polares del tensoactivo y por ello, con un movimiento restringido. En el otro caso, las moléculas de agua ocupan el centro de la micela y presentan propiedades, semejantes a las del agua libre (Douzou,

1980). La rigidez del agua en la cavidad micelar se reduce al incrementar el volúmen de agua en el sistema micelar, hasta un valor límite por arriba del cual ocurre una transición de fase que da lugar a una emulsión.

El agua en la cavidad de la micela difiere del agua libre por muchas propiedades fisicoquímicas. Las diferencias van a depender del grado de hidratación de la micela; al ir incrementando la cantidad de agua, las diferencias serán cada vez menores (Martinek et al, 1986). Un ejemplo del grado con que cambian las propiedades fisicoquímicas del agua en la micela, es en un medio formado por micelas de AOT. A bajos niveles de hidratación de las micelas, el agua solubilizada es 200 veces más viscosa que el agua libre, y su polaridad equivale a la del cloroformo (Martinek et al, 1986). La viscosidad en el interior de las micelas de AOT decrece cuando se incrementa la cantidad de agua solubilizada (Wong et al, 1976).

Es un problema definir y medir el pH de la cavidad acuosa de las micelas invertidas, ya que no existe una determinación directa. Algunos autores tratando de resolver este problema utilizaron una escala de acidez empírica, en el caso de micelas invertidas de AOT en isoctano (Smith y Luisi, 1980). En base a la señal que se presenta en resonancia magnética nuclear (RMN) de  $^{31}\text{P}$  de soluciones de fosfato a diferentes pH, se obtuvo una curva de calibración, la cual sirvió para determinar el pH micelar (Smith y Luisi, 1980). Se consideró que el pK del fosfato era el mismo en ambos sistemas, y se encontró que en la mayoría

de los casos había una pequeña diferencia (se desplaza de 0.4 unidades de pH hacia, arriba) entre el pH de la cavidad acuosa y el pH del buffer en el agua libre, cuando el amortiguador era un compuesto inorgánico. Las diferencias son mayores cuando el amortiguador es un compuesto orgánico. Se ha observado que por arriba de  $W_0=20$  el pH micelar corresponde al pH del agua libre (Luisi y Magid, 1986).

#### 1.4.3. Intercambio dinámico entre las micelas invertidas.

Existen dos alternativas para explicar como las micelas invertidas interactúan en el medio orgánico. Una de ellas es cuando las cavidades intercambian su contenido mediante la transferencia de agua y otros solubilizados a través de la monocapa interfacial, que permanece intacta. En este caso la transferencia del contenido de las micelas va depender de su tamaño (Luisi y Magid, 1986; Fig. 3). Actualmente, el mecanismo más aceptado es cuando dos cavidades micelares se unen de manera que sus monocapas se fusionan, dando lugar a la formación de un dímero transitorio; de esta manera el intercambio del material entre las cavidades no depende de su tamaño (Luisi y Magid, 1986; Fig. 3). Sin embargo, en el caso de las macromoléculas como con las enzimas, este modelo ya no funciona. Se ha observado que no es posible el intercambio entre micelas invertidas del citocromo c y de la citocromo oxidasa (Ayala *et al*, 1986).

Debido a su característica dinámica, el sistema de micelas invertidas en un disolvente orgánico alcanza fácilmente su



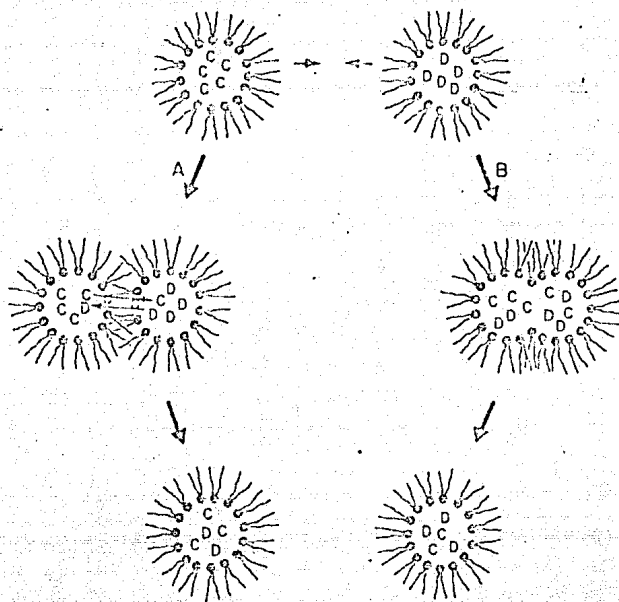


Fig. 3. Posibles formas de intercambio de material entre micelas invertidas: (A) cuando se mantiene íntegra la membrana interfacial y (B) por la formación de un dímero transitorio. (Tomado de Luisi y Magid, 1986).

equilibrio. Por ejemplo, las micelas invertidas de AOT en hidrocarburos se forman por simple agitación, y una vez formadas se pueden guardar por semanas e incluso meses sin sufrir ningún cambio (Martinek *et al.*, 1986).

Considerando lo descrito anteriormente, las micelas invertidas de compuestos anfifílicos en disolventes orgánicos apolares, ofrecen las condiciones necesarias para que una proteína se encuentre en un medio ambiente óptimo que se asemeja al natural ya que se pueden controlar el pH, la temperatura, etc. pero lo más importante es que se puede controlar la cantidad de

agua en la cavidad micelar (Martinek et al, 1986).

Por otra parte, como ya se mencionó anteriormente el agua en la cavidad de las micelas invertidas se encuentra estructurada y esta característica semeja el estado en que el agua se encuentra en la célula.

Muchas enzimas se han estudiado en un medio de micelas invertidas en disolventes orgánicos. Entre otras cosas estudian la actividad catalítica de la enzima ya que la solución coloidal de agua en un disolvente orgánico (estabilizado, con compuestos anfifílicos) representa un medio microheterogéneo universal para llevar a cabo reacciones enzimáticas.

Las reacciones enzimáticas en un sistema de micelas invertidas, se han medido hasta ahora por métodos espectroscópicos (espectrofotometría, fluorescencia, RMN; Barbaric y Luisi, 1981; Walde et al, 1988; Wolf y Luisi, 1979) ya que la muestra es transparente y homogénea. Sin embargo, cuando los sistemas presentan un mayor contenido de agua (emulsión), es difícil su estudio por medio de estas técnicas, debido a la turbidez que presentan. En algunos casos las reacciones medidas en estos medios, se paran de alguna forma en el disolvente orgánico para posteriormente medir la actividad en el medio acuoso (mediante la cuantificación de sustratos o productos formados) (Luisi y Steinmann-Hofmann 1987). Lo anterior implica que no miden directamente la reacción en el medio orgánico.

En la actualidad no se han reportado trabajos en los cuales se

utilicen técnicas polarográficas para medir reacciones enzimáticas en disolventes orgánicos apolares. Uno de los métodos más usados en la medición de las cinéticas enzimáticas de primer orden en los medios acuosos es el del electrodo de Clark (Roth y Jensen, 1967).

### 1.5 OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fué el de analizar la confiabilidad del uso del electrodo de Clark, en la medición de una reacción enzimática o química, que implicará el consumo o la producción de oxígeno en el disolvente orgánico apolar.

En la producción de oxígeno se utilizó como modelo experimental a la reducción del perborato de sodio por la catalasa, solubilizada en micelas invertidas de AOT en tolueno. Se midieron los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $K_p$ ; las curvas de pH-actividad e inhibición con azida de sodio y la termoestabilidad en el medio micelar.

El consumo de oxígeno en el disolvente orgánico se llevó a cabo a través de la oxidación de cantidades conocidas de ditionita; lo anterior permitió conocer la solubilidad del oxígeno en el medio micelar.

1.6. Electrodo de Clark. Este electrodo posee un cátodo de platino y dos ánodos de plata. Los tres constituyentes se encuentran inmersos en una solución de cloruro de potasio y aislados del medio externo por una membrana de teflón. El teflón es permeable a muchos gases, de manera que cuando éstos pasan por ella se ponen en contacto con el cátodo de platino.

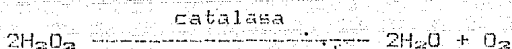
Si se fija un potencial de 0.8 v a través de los elementos del electrodo, el oxígeno sufre una reducción en el cátodo. A su vez en el ánodo, se lleva a cabo la oxidación de la plata, y de esta forma se completa el circuito. El flujo de corriente es directamente proporcional a la concentración de oxígeno de la solución (Cooper, 1977).

1.7. Propiedades de la catalasa. Esta enzima se encuentra presente en casi todos los organismos con respiración aerobia. Esta enzima también se haya presente en plantas verdes, pero en la mayoría de los trabajos que se han reportado, utilizan la catalasa que se aísla de bacterias o mamíferos, donde se encuentra en mayor concentración (Disseroth y Dounce, 1970).

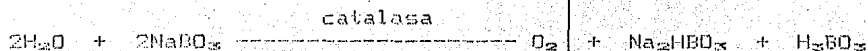
La localización subcelular de la catalasa de hígado, esta restringida a los peroxisomas y la enzima probablemente es incorporada dentro de estos organelos durante su biogénesis (Reid III et al, 1981).

La catalasa protege a la célula de la acción oxidante del peróxido de hidrógeno producido por la superóxidodismutasa y por las flavoproteínas.

El control celular del peróxido de hidrógeno se lleva a efecto por una de las reacciones bioquímicas, donde la catalasa juega un papel importante ya que es un excepcional mediador de la descomposición de dos moléculas de peróxido de hidrógeno a oxígeno molecular y agua (Dixon y Webb, 1979). La reacción es la siguiente:



Además del peróxido de hidrógeno, la catalasa también puede utilizar como sustrato el perborato de sodio teniendo lugar la reacción siguiente:



La reacción de la catalasa es 10 % más rápida cuando se utiliza el agua oxigenada como sustrato (Goldstein, 1968).

Por técnicas como son la microscopía electrónica, la difracción de electrones y la dispersión de rayos X a ángulo bajo, se ha reportado que la catalasa es una molécula ligeramente elipsoide con un radio de 40 Å en promedio (Reid III et al, 1981).

Todas las catalasas que se han aislado son oligómeros con cuatro subunidades de casi 60,000 Da cada una, lo cual da una proteína de aproximadamente 240,000 Da (Acbi, 1983).

Cada subunidad consiste de una cadena polipeptídica aislada que se asocia con un grupo prostético la protoporfirina IX de Fe III (Reid III et al, 1981). Aparentemente las subunidades funcionan independientemente una de otra.

La disociación de la catalasa causa su desnaturalización irreversible y ocurre bajo condiciones drásticas: por debajo de pH 3.0 y por arriba de pH 10.0 y en presencia de detergentes.

## II MATERIAL Y METODOS

### 2.1 Condiciones experimentales generales.

Se utilizó el método de la inyección para preparar las micelas invertidas del sustrato, de la enzima y del inhibidor (Luisi y Steinmann-Hofmann, 1987). En este método se inyecta una pequeña alícuota de la enzima o del sustrato a una solución hidrocarbonada (tensoactivo disuelto en un disolvente orgánico) y posteriormente se agita, dando como resultado una muestra transparente.

Durante la preparación de las micelas invertidas fué necesario hacerle dos modificaciones al método de la inyección, debido a que la cantidad de enzima sustrato e inhibidor que se utilizó no se incorporaba al medio orgánico. La agitación se hizo por medio de un baño sonicador (2 min), Laboratory Supplies Co., Inc. Mod. 6112SP1T. En el caso de que la muestra resultara en forma de emulsión, se utilizó un flujo de nitrógeno para llevarla a un estado de transparencia, típico de micelas invertidas. La cantidad máxima de agua presente en los ensayos fué de 7%.

Para la preparación de las micelas invertidas en el medio orgánico se utilizó una solución de Na-AOT (SIGMA) 0.2 M en tolueno (J.T. Baker).

2.1.1. Solubilización del sustrato en el medio micelar. A partir de una solución concentrada de perborato de sodio (Mallinckrodt) 0.7-0.8 M se colocó una alícuota de 100  $\mu$ l en un tubo de ensayo de 15.0 X 2.0 cm, a la cual se le agregó 900  $\mu$ l de

la solución de AOT/tolueno y luego se le sonicó durante 2 min en un sonicador de baño. La emulsión resultante se utilizó tal cual en los ensayos.

2.1.2. Preparación de las micelas de catalasa. Se utilizó la catalasa de hígado de bovino, suspensión cristalina en agua y con un contenido de 0.1 % de timol (SIGMA). De la solución "stock" de la enzima, se preparó una solución diluida en un amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.0. De ésta solución se tomaron 50  $\mu$ l en un tubo de ensayo de 15.0 X 2.0 cm; y luego se le agregó 950  $\mu$ l de la solución de AOT. La mezcla se sonicó por 2 min. La emulsión de la enzima se llevó a transparencia mediante el burbujeo de nitrógeno y se ajustó al volúmen inicial. La concentración final de la catalasa fue de  $7.4 \times 10^{-3} \mu$ M.

2.1.3. Ensayos oximétricos. Todos los ensayos para cuantificar la actividad de la catalasa, se midieron por la producción de oxígeno, en un oxímetro Yellow Springs Mod. 53 y en una cámara de vidrio de 4.0 X 1.0 cm sin componentes de plástico, para evitar la reacción con el disolvente orgánico y con una entrada lateral para el electrodo de Clark. Se utilizó una membrana de teflón (tipo estándar).

Después de calibrar el oxímetro con el medio de reacción saturado con oxígeno, se burbujeó con un flujo de nitrógeno para desplazar al oxígeno del medio. Bajo estas condiciones se registró la estabilidad de la señal durante 15 - 30 min. Posteriormente, se agregó el sustrato y se registró hasta tener nuevamente una señal estable (en menos de 10 seg).

En todos los ensayos que se realizaron para medir la actividad de la catalasa, se emplearon 20  $\mu$ l (excepto en el de termoestabilidad) de la solución de la enzima; en el medio acuoso, éste volumen correspondió a una concentración de  $7.4 \times 10^{-3}$   $\mu$ M (se diluyó a la enzima en un amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.0); y en el medio micelar se utilizó una concentración de  $7.4 \times 10^{-3}$   $\mu$ M. En ambos medios la reacción se inició con la adición de la enzima al medio de reacción.

Todos los ensayos se llevaron a cabo a 30 °C, con 2 ml de volumen final en el medio de reacción (amortiguador de fosfato de potasio 100 mM, pH 7.0 para el ensayo acuoso y tolueno para el ensayo micelar) y a una velocidad del registro del papel de 1.0 a 2.0 mm/seg.

## 2.2. Determinación de la solubilidad del oxígeno en un medio de micelas invertidas de AOT 0.2 M en tolueno.

Se usaron dos técnicas experimentales como se indica a continuación:

2.2.1 Por el consumo de oxígeno durante la oxidación de cantidades conocidas de ditionita. Se preparó una solución de ditionita ( 4 % ) bajo condiciones anaeróbicas; se mantuvo así mediante el burbujeo de un flujo de nitrógeno, el cual se pasó previamente por una trampa con una solución de ditionita. A partir de esta solución se hicieron los ensayos siguientes a 30 °C:

2.2.1.1. Medio acuoso. Se determinó la concentración de



ditionita en agua por el cambio en la lectura del electródo que se registraba al adicionar alícuotas sucesivas de 2  $\mu$ l de la solución de ditionita (0.08  $\mu$ mol) al medio de reacción; éste contenía 2 ml de un amortiguador de fosfato de potasio 0.1 M, pH 7.0 (Fig. 4 A).

2.2.1.2 Medio micelar . Se agregaron alícuotas sucesivas de 20  $\mu$ l de la solución acuosa de ditionita (0.8  $\mu$ mol) al medio de reacción que contenía 2 ml de una solución 0.2 M de AOT en tolueno (Fig. 4 B).

Los dos medios se saturaron con aire. Se compararon los cambios registrados en ambos casos (Fig. 4).

2.2.2. Por la producción de oxígeno a partir de la reducción de cantidades conocidas de perborato de sodio por la catalasa.

Los medios que se describen a continuación se mantuvieron en condiciones anaeróbicas mediante el burbujeo de nitrógeno.

2.2.2.1. Medio acuoso. A 2 ml de un amortiguador de fosfato de potasio 0.1 M, pH 7.0 se le agregaron 40  $\mu$ l de una solución de perborato de sodio (0.38  $\mu$ mol) y la enzima. Se registró el cambio en la concentración de oxígeno en el medio (Fig. 4 A).

2.2.2.2. Medio micelar . Se usó el mismo procedimiento que en el ensayo acuoso. Se adicionaron 50  $\mu$ l del sustrato en forma de emulsión (3.3  $\mu$ mol) a la cámara que contenía 1.93 ml de tolueno. Posteriormente se agregaron las micelas invertidas de la enzima y se midió el cambio registrado (Fig. 4B).

## 2.3. Parámetros cinéticos de la actividad de la catalasa.

2.3.1. Medio acuoso. El medio de reacción contenía un amortiguador de fosfato de potasio 100 mM, pH 7.0 y diferentes concentraciones de perborato de sodio (de 16 a 120 mM).

2.3.2. Medio micelar. El medio de reacción contenía diferentes volúmenes de la emulsión del sustrato, para alcanzar las concentraciones de 3.3 a 40 mM.

## 2.4. Ensayo de la actividad de la catalasa en función del pH.

2.4.1. Medio acuoso. Se utilizó un amortiguador con la concentración siguiente: 20 mM de ácido cítrico, 30 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 30 mM de  $\text{H}_2\text{BO}_3$  y 26 mM de ácido dietilbarbitúrico; se le ajustó el pH con NaOH (Dawson *et al.*, 1969). Los pH's que se estudiaron fueron: 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.5 y 12.0. El medio de reacción contenía el amortiguador del pH correspondiente y una solución de perborato de sodio 20 mM.

2.4.2. Medio micelar. La preparación de las micelas de catalasa se hizo como se indicó en el apartado /2.1.2./, sólo que la dilución de la enzima 1:10 se hizo por separado para cada valor de pH, con el mismo amortiguador que se utilizó en el perfil de pH's del ensayo acuoso (pH 4.0 a 12.0). El medio de reacción contenía la emulsión de perborato de sodio (3 mM) o, es decir considerando el volumen total del medio donde se lleva a cabo la catálisis. No se observó descomposición del sustrato a esos pH's.

## 2.5. Inhibición de la actividad de la catalasa con azida de sodio.

2.5.1. Medio acuoso. En este caso el medio de reacción contenía un amortiguador de fosfato de potasio 100 mM, pH 7.0, una solución de perborato de sodio 19 mM y alícuotas variables de una solución, "stock" de azida  $3 \times 10^{-4}$  M (las concentraciones fueron de 0.15 a 6  $\mu$ M).

2.5.2. Medio micelar. La emulsión del inhibidor se preparó al mezclar 100  $\mu$ l de una solución de azida  $3 \times 10^{-4}$  M con 900  $\mu$ l de una solución de AOT en un tubo de ensayo de 15.0 X 2.0 cm. Se sonicó por 2 min y se usó tal cual en los ensayos. El medio de reacción consistió de la emulsión de perborato de sodio (3.4 mM) y alícuotas variables de la emulsión del inhibidor (las concentraciones del inhibidor fueron las mismas que para el ensayo acuoso).

## 2.6. Termoestabilidad de la catalasa.

2.6.1. Medio acuoso. La enzima que se utilizó en los ensayos se diluyó 1:5 en un amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.0. En un tubo de ensayo tapado de 10.0 X 1.3 cm se incubaron 3 ml de la solución en un baño seco (Lab-Line Instruments, Inc. Multi-blok Heater No. 2090) a las temperaturas siguientes: 50, 60, 70 y 80 °C. Se sustrajo una alícuota de 100  $\mu$ l para medir la actividad enzimática a 30 °C, a los diferentes tiempos de incubación de la enzima: 5, 10, 15, 20 y 30 min, a la temperatura del ensayo correspondiente. El medio de reacción

contenia un amortiguador de fosfato de potasio 100 mM, pH 7.0 y una solución de perborato de sodio 19 mM.

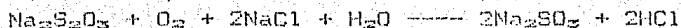
2.6.2. Medio micelar .Las micelas de catalasa se prepararon como se indicó en el apartado 2.1.2. (con 25 y 5  $\mu$ l de agua/ml de tolueno respectivamente), a partir de la cual se hizo una dilución en tolueno 1:5. Se tomaron 3.0 ml de ésta dilución y se colocaron en un tubo de ensayo de 4.0 X 1.0 cm tapado; el tubo se incubó en un baño seco a las temperaturas siguientes: 50, 60, 70, 80 y 90 °C. El medio de reacción contenía la emulsión de perborato de sodio (40 mM)ov. La reacción se inició al agregar una alícuota de 100  $\mu$ l de las micelas invertidas de la enzima, a los 10, 20 y 30 min de la incubación a la temperatura correspondiente. La actividad de la enzima se midió a 30 °C en el medio orgánico.

### III RESULTADOS

3.1. Determinación de la solubilidad del oxígeno en un medio de micelas invertidas de ADT 0.2 M en tolueno. Para poder determinar los parámetros cinéticos de cualquier reacción enzimática que involucre la producción o consumo de oxígeno, en un medio orgánico apolar, es necesario conocer primeramente la solubilidad del oxígeno en este medio. La medición de la concentración del oxígeno en el medio micelar fué posible mediante el uso del electrodo de Clark.

Para obtener la solubilidad del oxígeno en el medio micelar se utilizaron dos métodos de titulación: uno químico y el otro enzimático. Los ensayos se llevaron a cabo a 30 °C en una cámara de vidrio, con una entrada lateral para el electrodo de Clark. Se utilizó una membrana de teflón. A continuación se describen los resultados obtenidos por cada uno de los métodos.

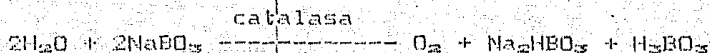
3.1.1. Método químico. El sistema acuoso sirvió como control para la determinación de la solubilidad del oxígeno en el medio micelar, con base en el cambio registrado en el consumo del oxígeno por la oxidación de la ditionita en ambos medios. La reacción química que se llevó a cabo fué la siguiente:



La solubilidad del oxígeno en la solución acuosa es de 0.2 pmoles  $\text{O}_2/\text{ml}$  (Handbook of Chemistry and Physics, 1962) a 30 °C. Se encontró que en el medio micelar la solubilidad fué 7 veces

mayor, respecto al medio acuoso, es decir de 1.4  $\mu$ moles  $O_2$ /ml.

3.1.2. Método enzimático. En este ensayo, se tenía que determinar la producción de oxígeno, entonces fué necesario mantener el medio de reacción bajo condiciones anaeróbicas. La manera como se desplazó al oxígeno de las soluciones fué por el burbujeo de un flujo de nitrógeno. Mediante el electródo de Clark se registró siempre un estado basal, con una concentración mínima de oxígeno en el medio. En este ensayo la producción de oxígeno fué a partir de la reducción de cantidades conocidas de perborato de sodio por la catalasa. La reacción enzimática fué la siguiente:



Se determinó por este método una solubilidad para el oxígeno en el medio micelar de 1.4  $\mu$ moles de  $O_2$ /ml. Este valor fué el mismo que se encontró por el método químico. Los registros se muestran en la figura 4.

Obtenido el valor de la concentración del oxígeno en el medio orgánico, fué factible iniciar el estudio de la cinética enzimática de la catalasa solubilizada en las micelas invertidas de AOT en tolueno. En este estudio se realizaron ensayos para determinar la constante de afinidad, la velocidad máxima, el efecto del pH en la cinética, la sensibilidad a un inhibidor (azida) y la termoestabilidad de la enzima en este medio; además se calculó el valor de  $W_0$  por medio de agua tritiada.

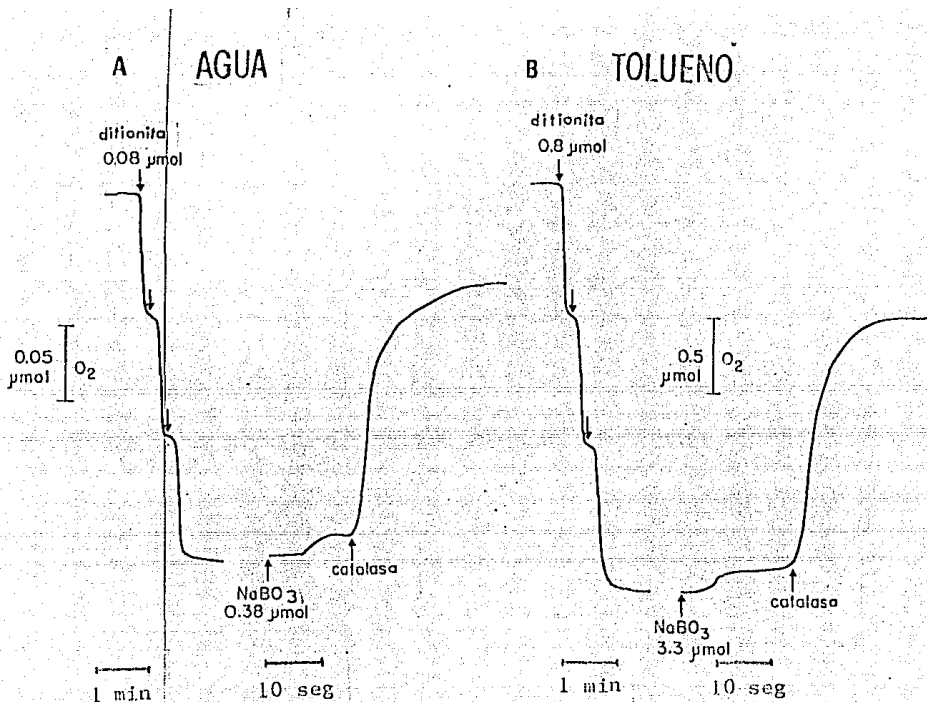


Fig. 4. Determinación de la solubilidad del oxígeno en el tolueno

### 3.2. Parámetros cinéticos de la actividad de la catalasa.

#### 3.2.1. Determinación de $K_m$ .

3.2.1.1. Medio acuoso. En la cinética del ensayo acuoso se determinó un valor de  $K_m = 43$  mM. Este valor es casi la mitad del valor reportado en la literatura (78 mM) cuando se utiliza el perborato de sodio como sustrato (Goldstein, 1968). Las Fig. 5 y 6 muestran la curva de saturación y la representación de Eadie-Hofstee, respectivamente para el medio acuoso.

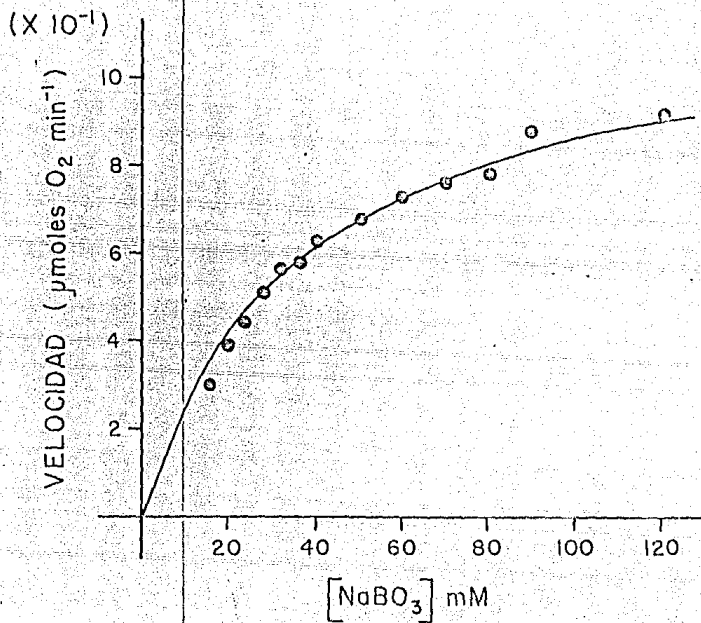


Fig. 5.- Curva de saturación de la actividad de la catalasa en el medio acuoso. Amortiguador de fosfato de potasio 100 mM, pH 7.0; catalasa  $7.4 \times 10^{-5}$   $\mu\text{M}$ . Los ensayos se hicieron a  $30^\circ\text{C}$ .



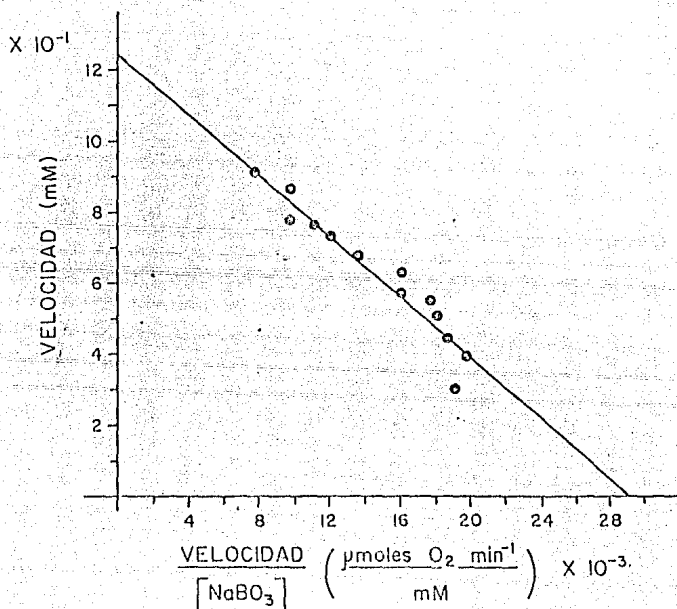


Fig. 6.- Curva de Eadie-Hofstee para la actividad de la catalasa en el medio acuoso. Condiciones de trabajo descritas en la Fig. 5

3.2.1.2. Medio micelar. El valor de  $K_m$  en AOT/tolueno se puede calcular considerando sólo la fase acuosa ( $K_{m_{ap}}$ ) o el volumen total ( $K_{m_{av}}$ ) del medio de reacción (Luisi y Magid 1986).

En la actualidad se utiliza más el valor de  $K_{m_{av}}$  ya que físicamente toma en cuenta todo el volumen donde se lleva a cabo la reacción enzimática. Con base en lo anterior se calculó el valor de  $K_{m_{av}}$  para la catalasa solubilizada en micelas invertidas de AOT/tolueno. El valor de  $K_{m_{av}}$  fué de 15 mM. Este valor es menor al que se determinó para el ensayo acuoso (43 mM). La Fig. 7 y 8 son las gráficas de curva de saturación y representación de Eadie-Hofstee para el medio micelar.

El valor de velocidad máxima (actividad específica) para el medio acuoso y micelar fué 37.14 y 28.60 mMol  $O_2$ /min/mg respectivamente.

3.2.2. Determinación de  $K_p$ . Esta constante se define como el número de moles de sustrato transformados por minuto por mol de subunidad activa o centro catalítico bajo condiciones óptimas.

La catalasa está formada por 4 subunidades, cada una contiene un centro catalítico.

3.2.2.1. Medio acuoso. Para este parámetro se determinó un valor que fué de  $K_p = 3.1 \times 10^6 \text{ min}^{-1}$ . Ver tabla I.

3.2.2.2. Medio micelar. El valor de  $K_p$  para el medio AOT/tolueno fué de  $3.6 \times 10^6 \text{ min}^{-1}$ . Ver tabla I donde se muestran en resumen las constantes de afinidad de la catalasa, los valores de  $K_p$  y actividad específica en el medio acuoso y en el medio de micelas invertidas.

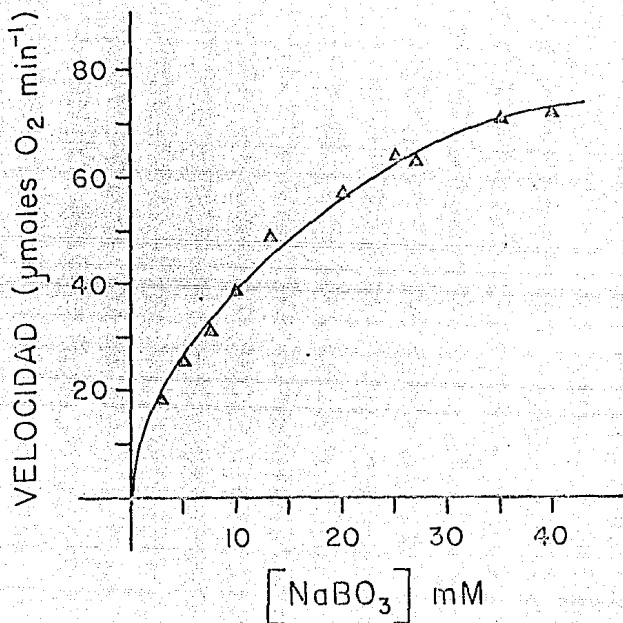


Fig. 7.- Curva de saturación de la actividad de la catalasa en el medio micelar 0.2 M de ADT en tolueno. Tolueno, una alícuota variable de NaBO<sub>3</sub> 40 mM y (catalasa) 7.4 X 10<sup>-2</sup> μM. El sustrato se utilizó en forma de emulsión y la catalasa en forma de micelas invertidas (ver material y métodos). Los ensayos se hicieron a 30 °C.

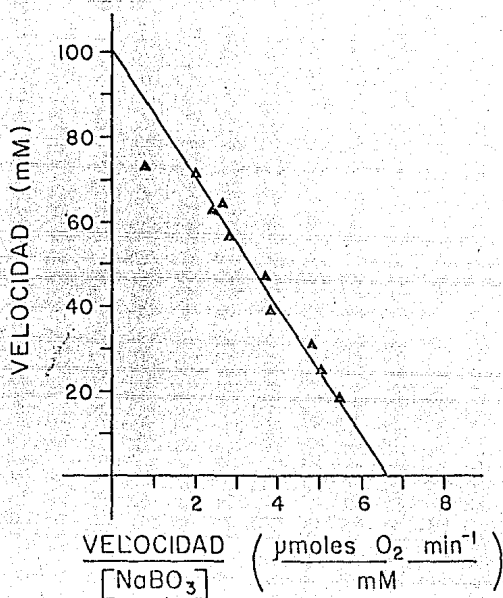


Fig. 8.- Curva de Eadie-Hofstee para la actividad de la catalasa en el medio micelar 0.2 M de AOT en tolueno. Condiciones de trabajo descritas en la Fig. 7

	Medio acuoso	Tolueno
$K_m$ (mM)	43.0	15.0
$K_p$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$3.1 \times 10^6$	$3.6 \times 10^6$
Actividad específica (mMol $O_2$ /min/mg)	37.1	28.6

### 3.3. Ensayo de la actividad de la catalasa en función del pH.

Las reacciones enzimáticas en soluciones acuosas son muy dependientes del valor del pH del medio donde se llevan a cabo.

Todas las enzimas poseen un valor de pH óptimo característico para el cual su actividad es máxima.

En la realización de este trabajo se consideró importante comparar la curva de pH-actividad para la catalasa en el medio de AOT/tolueno con la que presenta en el medio acuoso.

En este ensayo se utilizó un amortiguador que amortiguara en un amplio rango de pH de 2 a 12 (ver material y métodos). Los pH's que se estudiaron fueron de 4.0 a 12.0.

**3.3.1. Medio acuoso.** El valor del pH óptimo para la actividad de la catalasa en medio acuoso se encontró entre el valor de pH 7.0-8.0. Los resultados se muestran en la Fig. 9.

**3.3.2. Medio micelar.** La dilución de la enzima para preparar las micelas invertidas se hizo por separado para cada valor de pH, con el mismo amortiguador que se utilizó en el ensayo acuoso. El pH de la cavidad micelar se consideró igual al valor del pH de

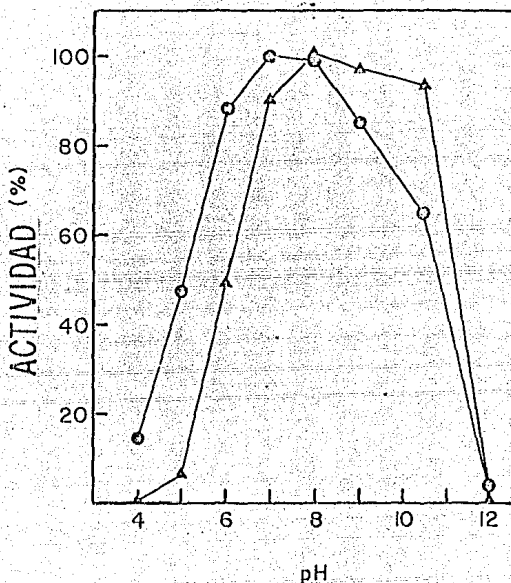


Fig. 9 .- Curva de pH-actividad de la catalasa en el medio acuoso (O-O) y en el medio micelar 0.2 M de AOT en tolueno (A-A). Medio acuoso. Amortiguador: 20 mM de ácido cítrico, 30 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 30 mM de  $\text{H}_2\text{BO}_3$  y 26 mM de ácido dietilbarbitúrico; se ajustó con NaOH. Catalasa  $7.4 \times 10^{-3}$   $\mu\text{M}$  y  $\text{NaBO}_3$  20 mM. El 100 % de actividad de la enzima fué de  $1.032 \mu\text{moles O}_2 \text{ min}^{-1}$  pH 7.0. Medio orgánico: se utilizó el amortiguador antes descrito y (catalasa)  $7.4 \times 10^{-3}$   $\mu\text{M}$  y ( $\text{NaBO}_3$ ) 3 mM. El 100 % de la actividad de la enzima se encuentra a pH 8.0 y fué de  $14.45 \mu\text{moles O}_2 \text{ min}^{-1}$ . El sustrato se utilizó en forma de emulsión y la catalasa en forma de micelas invertidas (ver material y métodos). Los ensayos se hicieron a  $30^\circ \text{C}$  en ambos medios.

la solución de la enzima a partir de la cual se prepararon las micelas. El valor de pH óptimo para el medio orgánico se encontró entre los valores de 8.0- 9.0; por consiguiente, se observó un corrimiento alcalino de una unidad de pH respecto al medio acuoso. Ver Fig. 9

### 3.4. Sensibilidad de la catalasa ante la azida de sodio.

3.4.1. Medio Acuoso. En medio acuoso las enzimas presentan sensibilidad ante ciertos inhibidores, que hacen que estas pierdan parcial o totalmente su actividad.

La catalasa es una enzima muy sensible al KCN y al  $\text{NaN}_3$ , el 50 % de su inhibición se produce por  $5 \times 10^{-6}$  M de KCN y  $2 \times 10^{-5}$  M de  $\text{NaN}_3$  en el medio acuoso, en el caso de la catalasa de plantas (Galston, 1955).

En este medio, 100 % de actividad de la enzima correspondió a  $0.504 \mu\text{moles de O}_2 \text{ min}^{-1}$ . Se registró el % de actividad residual de la enzima cuando se utilizó el inhibidor. El 50 % de la inhibición de la actividad de la catalasa se observó a una concentración de  $\text{NaN}_3$  de  $5 \times 10^{-7}$  M. Ver figura 10.

Se llevó a cabo el ensayo de inhibición de la actividad de la catalasa por la  $\text{NaN}_3$  en el sistema de AOT/tolueno, para determinar si en el medio orgánico la enzima conservaba su sensibilidad ante este inhibidor.

3.4.2. Medio micelar. El 100 % de actividad de la catalasa correspondió a  $4.87 \mu\text{moles O}_2 \text{ min}^{-1}$ . Se obtuvo un 50 % de

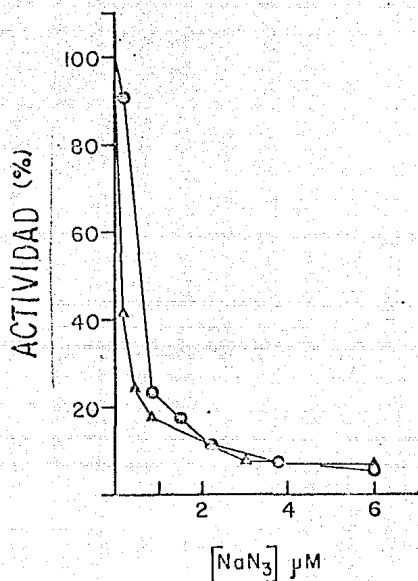


Fig. 10.- Curva de inhibición de la actividad de la catalasa por la azida de sodio en el medio acuoso (o-o) y en el medio micelar 0.2 M de AOT en tolueno (Δ-Δ). Medio acuoso: amortiguador de fosfato de potasio 100 mM, pH 7.0, NaBO<sub>2</sub> 19 mM y alícuotas variables de NaN<sub>3</sub>  $3 \times 10^{-5}$  M, se inició la reacción al agregar la enzima  $7.4 \times 10^{-5}$  μM. El 100 % de actividad de la enzima fué de  $0.504 \mu\text{moles O}_2 \text{ min}^{-1}$ . Medio orgánico: (catalasa)  $7.4 \times 10^{-5}$  μM, (NaBO<sub>2</sub>)  $3.4 \text{ mM}$  y alícuotas variables de una emulsión de NaN<sub>3</sub>  $3 \times 10^{-5}$  M. El 100 % de actividad de la enzima fué de  $4.87 \mu\text{moles O}_2 \text{ min}^{-1}$ . El sustrato y el inhibidor se utilizaron en forma de emulsión y la catalasa en forma de micelas invertidas (ver material y métodos). Los ensayos se hicieron como en el ensayo acuoso y a 30 °C en ambos medios.



actividad residual de la catalasa a una concentración de  $\text{NaN}_3$  ( $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ ) ov.

3.5. Termoestabilidad de la catalasa. Al alterar las condiciones del medio ambiente del estado nativo de una proteína, se produce el fenómeno de desnaturalización de la macromolécula. Esto se logra variando la temperatura, el pH del medio o las propiedades del disolvente acuoso mediante la adición de solutos orgánicos e inorgánicos.

Uno de los pasos fundamentales en la terminación, es el desdoblamiento de la proteína, debido a la pérdida de los enlaces covalentes que mantienen estable su estructura nativa (Tanford, 1968). Otro tipo de interacciones no covalentes que contribuyen a la estabilidad de la proteína son: los puentes de hidrógeno, el efecto hidrofóbico y las interacciones electrostáticas, siendo las dos primeras las que contribuyen en mayor grado.

El disolvente juega un papel muy importante ya que determina la magnitud de las fuerzas no covalentes. De aquí se explica el interés de estudiar la termoestabilidad de una enzima en un ambiente donde la mayor cantidad de agua se sustituye por un disolvente orgánico apolar.

El método que más se ha utilizado para estudiar la termoestabilidad de una enzima es cuando se suspende directamente a la enzima con cierto grado de hidratación en el disolvente orgánico (Zaks y Klibanov, 1984). Entre las enzimas que se han estudiado en estos medios se encuentran las lipasas, las

proteasas, las oxidasas y las deshidrogenasas. Todas estas enzimas presentan la característica particular de adquirir mayor termoestabilidad en el medio orgánico (Zaks y Klibanov, 1984; Wheeler y Croteau, 1986).

Una modificación al método antes descrito es la transferencia de las enzimas al medio orgánico con fosfolípidos (medio de micelas invertidas; Darszon et al, 1970; Ayala et al, 1985). En este medio algunas enzimas de membrana presentan mayor termoestabilidad.

Durante la realización de este trabajo y con base en lo antes descrito, se decidió que resultaría muy interesante determinar la termoestabilidad de la catalasa en el medio de AOT/tolueno. Los resultados de estos ensayos se muestran a continuación:

3.5.1. Medio acuoso. En este medio a la temperatura de incubación de 50 °C la enzima presenta la misma actividad que tiene a 30 °C (control de 100 % de actividad que corresponde a 0.384  $\mu\text{moles O}_2 \text{ min}^{-1}$ ). A la temperatura de incubación donde la enzima empieza a desnaturalizarse es a partir de los 60 °C. A los 70 y 80 °C de incubación, la enzima pierde casi toda su actividad en los primeros minutos (5 y 10 min) respectivamente. Los resultados de este experimento se muestran en la Fig. 11 A.

3.5.2. Medio micelar (25  $\mu\text{l}$  de agua/ml de tolueno,  $w_0 = 7.0$ ).

En este ensayo, la catalasa presenta el 100 % de su actividad a la temperatura de incubación de 50 °C (38.76  $\mu\text{moles O}_2 \text{ min}^{-1}$ ). A 60 °C de incubación la actividad de la enzima empieza a disminuir, a los 30 min de incubación la catalasa presenta el 63

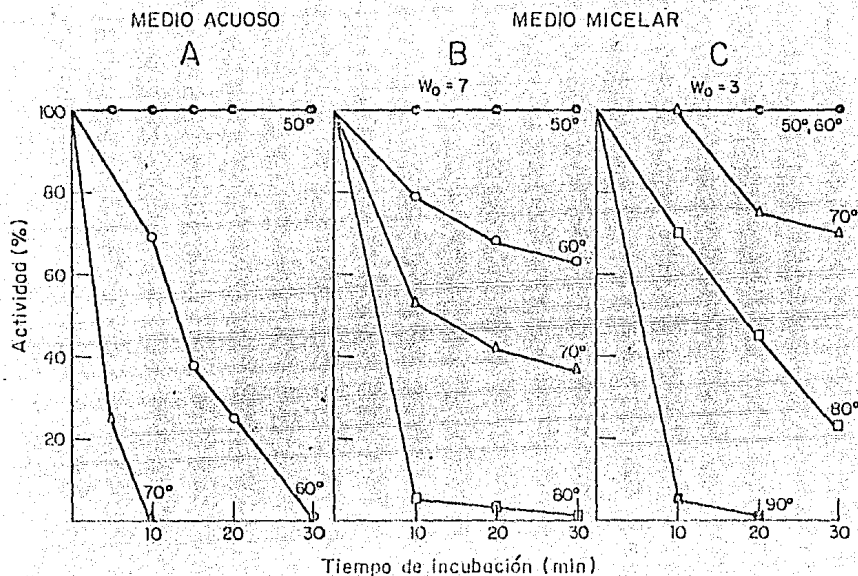


Fig. 11. — Curva de termoestabilidad de la catalasa en el medio acuoso (A), en el medio micelar ADT / tolueno:  $w_0 = 7$  (B) y  $w_0 = 3$  (C), a las temperaturas indicadas. Medio acuoso, amortiguador de fosfato de potasio 100 mM, pH 7.0,  $\text{NaBO}_3$  19 mM y catalasa  $7.4 \times 10^{-5}$   $\mu\text{M}$  incubada a la temperatura correspondiente. El 100 % de actividad de la enzima fué 0.384  $\mu\text{moles O}_2 \text{ min}^{-1}$ . Medio micelar (catalasa)  $7.4 \times 10^{-5}$   $\mu\text{M}$  y ( $\text{NaBO}_3$ )  $40 \text{ mM}$ . El 100 % de actividad de la enzima en este medio fué de 38.76  $\mu\text{moles O}_2 \text{ min}^{-1}$ . Se usó el sustrato en forma de emulsión y la catalasa en forma de micelas invertidas (ver material y métodos). Los ensayos se hicieron a  $30^\circ \text{C}$  en ambos medios.

% de su actividad; mientras que en el medio acuoso en esas condiciones la enzima ya no presenta actividad. A las temperaturas de 70 y 80 °C de incubación la catalasa presenta una caída un poco más drástica en su actividad enzimática (Fig. 11 B).

### 3.5.3. Medio micelar (10 $\mu$ l de agua/ml de tolueno, $w_0 = 3.0$ ).

En algunos trabajos se ha reportado mayor termoestabilidad de una enzima en medios micelares con un bajo contenido de agua (Walde *et al.*, 1988; Garza-Ramos *et al.*, 1989). Tratando de explicar si la mayor termoestabilidad que adquiere la catalasa en el medio micelar se debe al menor contenido de agua en el sistema, se hizo el ensayo de termoestabilidad de la enzima con un contenido de agua menor al ensayo anterior. Los resultados de este ensayo se muestran en la figura 11 C. La catalasa fué más termoestable en este medio, comparado con el ensayo de  $w_0 = 7.0$

A la temperatura de 70 °C y 10 min de incubación, la enzima llegó a alcanzar el mismo valor de actividad que se presentó a  $w_0 = 7.0$  (control a 30 °C, 39.76  $\mu$ moles  $O_2$   $min^{-1}$ ). A esta misma temperatura con 30 min de incubación la enzima conservó un 37 % de su actividad para un  $w_0 = 7.0$  y un 70 % para el caso de  $w_0 = 3.0$  (ver Fig. 11 B,C respectivamente). A la temperatura de 80 °C y 10 min de incubación de la enzima en el ensayo de  $w_0 = 7.0$ , se conservó sólo el 5 % de la actividad; en cambio en el medio de  $w_0 = 3.0$  se presentó el 70 % de la actividad residual. En este medio con menor contenido de agua la enzima presentó aún cierta actividad a la temperatura de 90 °C durante los primeros minutos

de la incubación.

#### IV DISCUSION

Solubilidad del oxígeno en el medio micelar. La solubilidad del oxígeno en un disolvente orgánico es varias veces mayor si se le compara con la que se presenta en agua (Tze-Chia y Kenneth, 1984).

La solubilidad que se determinó para el oxígeno en el tolueno por los dos métodos el químico y el enzimático fué 1.4  $\mu$ moles  $O_2$ /ml. Como se indicó anteriormente esta solubilidad es siete veces mayor si se compara con la que se presenta en agua (0.2  $\mu$ moles  $O_2$ /ml) a 30 °C. El valor que se reporta para la solubilidad del oxígeno en tolueno puro es de 7  $\mu$ moles de  $O_2$ /ml a 18 °C y 1 atm. Es posible explicar esta diferencia entre el valor experimental y el valor que se reporta con base en tres aspectos que contribuyen a la solubilidad menor de un gas en una disolución. El grado de la solubilidad de un gas depende de la presión, la temperatura y la fuerza iónica del medio. La solubilidad de un gas en un líquido disminuye con el aumento de la temperatura. A temperatura constante la solubilidad de un gas en un líquido es directamente proporcional a la presión del gas sobre el líquido; es decir, a mayor presión mayor solubilidad del gas en el líquido (Maron y Prutton, 1984). El uso de sales y moléculas cargadas disminuye la solubilidad de un gas en un líquido.

Por lo anterior, se explica que la solubilidad del oxígeno en

el medio de micelas invertidas, respecto a la del tolueno puro, fuera menor ya que se utilizaron las condiciones experimentales siguientes: se hizo el ensayo a una temperatura mayor (30 °C), a una presión atmosférica menor (582 mm Hg) y se utilizaron moléculas cargadas (ADT), sales (amortiguador) y cierta cantidad de agua.

Parámetros cinéticos de la actividad de la catalasa. En lo que se refiere al valor de  $K_m$  para el medio acuoso y el medio micelar en tolueno fué de 43 y 15 mM respectivamente, a un  $w_o=7-8$ . En el tolueno el valor de  $K_{m_{av}}$  disminuye casi tres veces en comparación con el medio acuoso. Aunque ambos valores se encuentran dentro del mismo orden de magnitud, se puede sugerir que la enzima presenta una mayor afinidad por su sustrato en este medio micelar. Se han reportado resultados similares para otras enzimas en medios de micelas invertidas (Luisi *et al*, 1968).

	Medio acuoso $K_m$ (mM)	Medio micelar $K_{m_{av}}$ (mM)
$\alpha$ -quimotripsina	0.6	0.4
Tripsina	$4.0 \times 10^{-3}$	$3.5 \times 10^{-3}$
Lisozima	$10.0 \times 10^{-3}$	$2.0 \times 10^{-3}$

En general, se ha observado que las enzimas con cierto grado de hidratación puede funcionar en el medio orgánico del mismo modo que como lo hacen en el medio acuoso. De acuerdo a lo

anterior, se han realizado una serie de estudios en los cuales se calculan las monocapas de agua que rodean a la enzima (lisozima). Se ha encontrado que no es necesario que una monocapa de agua rodee a la enzima para que sea activa, con menos de una monocapa ya tiene actividad y a medida que se incrementa la hidratación, la actividad también lo hace hasta alcanzar un valor máximo (Rupley et al. 1983). Todas las enzimas necesitan de un modo u otro cierta cantidad de agua para llevar a cabo su catálisis. Tal es el caso de las hidrolasas que catalizan la ruptura de diversas uniones mediante la introducción de una molécula de agua (hidrólisis) y de esta forma atacan uniones peptídicas, glucosídicas, etc. Otro ejemplo es el de la enzima carboxipeptidasa A, que entre otras cosas, sólo necesita una molécula de agua en su sitio activo para funcionar (Stryer, 1975). También el agua contribuye de forma importante a mantener las estructuras terciaria y cuaternaria de las proteínas; se le encuentra en las uniones peptídicas de los aminoácidos, formando puentes de hidrógeno e hidratando a los grupos R polares que se localizan sobre la superficie de las proteínas, mientras que los residuos hidrofóbicos se encuentran ocultos en el interior (Lehninger, 1970).

El valor de  $K_p$  para el medio acuoso fué de  $3.1 \times 10^6 \text{ min}^{-1}$  y para el medio micelar fué de  $3.6 \times 10^6 \text{ min}^{-1}$ , para un  $n_{0f} = 7-8$ . En el caso de la actividad específica para el medio acuoso y micelar fué 37.14 y 28.60  $\mu\text{mol O}_2/\text{min}/\text{mg}$  respectivamente. Al comparar ambos valores se observó que se alcanzó la misma

eficiencia en el proceso catalítico ya que el número de recambio es prácticamente igual en los dos medios.

Con base en los resultados anteriores, se puede sugerir que todas o la gran mayoría de las moléculas de la enzima que son transferidas al medio micelar, permanecen activas y que además la difusión, encuentro e intercambio entre las micelas invertidas en el sistema orgánico apolar, no es un paso limitante para la velocidad de la catálisis; por lo tanto, se puede considerar al sistema micelar como una pseudofase continua donde se pueden llevar a cabo un gran número de reacciones enzimáticas.

En algunos casos, se ha reportado mayor actividad para una enzima en el medio micelar comparada con el medio acuoso. La enzima peroxidasa, llega a presentar un número de recambio 100 veces más grande en el medio micelar, comparado con el medio acuoso (esta superactividad depende del tensioactivo y del disolvente utilizado; Martinek *et al.*, 1982). La enzima lisozima, presenta un número de recambio igual en el medio micelar y en el medio acuoso (Luisi y Laane, 1986).

Curva de pH para la actividad de la catalasa. El valor de pH óptimo para la actividad de esta enzima, en el medio acuoso se encontró en el valor de pH 7.0; este valor es un poco más bajo al que se reporta en la literatura (7.6, Goldstein, 1968 y Lehninger, 1970). El valor del pH óptimo en el tolueno fué de 8, valor ligeramente más alto que en el medio acuoso. Además de este cambio en el valor del pH óptimo, en el medio orgánico se



observó un corrimiento alcalino de una unidad de pH en comparación con el medio acuoso. Este corrimiento de una unidad de pH es real, ya que en estudios de RMN de  $^{31}\text{P}$  en el medio orgánico sólo se observa un corrimiento de menos de 0.4 unidades de pH con respecto al medio acuoso (en el caso de un amortiguador inorgánico) (Smith y Luisi, 1980). En comparación con otras enzimas integradas a micelas invertidas, también se ha observado este tipo de corrimiento alcalino (Larsson *et al.*, 1987; Sánchez-Ferrer y García-Carmona, 1988; Barbaric y Luisi, 1981; Menger y Yamada, 1979). Como ejemplo de esto se tiene la actividad de catecolasa para la enzima polifenol-oxidasa en micelas invertidas de Brij 96 en ciclohexano; esta enzima presenta un corrimiento alcalino de una unidad de pH respecto al medio acuoso (Sánchez-Ferrer y García-Carmona, 1988). También presenta este comportamiento la  $\alpha$ -quimotripsina solubilizada en micelas invertidas de AOT/isooctano (Barbaric y Luisi, 1981).

Sensibilidad de la catalasa ante la azida de sodio. La actividad de la catalasa en el medio acuoso y en el medio micelar, cuando se utiliza a la azida de sodio como inhibidor es igual de sensible en ambos medios.

Termoestabilidad de la catalasa. En los dos medios acuoso y micelar a la temperatura de 50 °C la catalasa conserva la misma actividad que tiene a los 30 °C (temperatura control). En el ensayo acuoso la catalasa a las temperaturas de 60 y 70 °C se desnaturalizó, ya que la temperatura es un agente

desnaturalizante que rompe las uniones que mantienen la estructura nativa de la enzima (puentes de hidrógeno, enlaces peptídicos, etc.).

Cuando la catalasa se integró a un sistema de micelas invertidas de AOT/tolueno y se realizó el ensayo de termoestabilidad, se observó que en este medio la enzima es un poco más termoestable que en el medio acuoso. Esta mayor termoestabilidad que adquiere una enzima en un sistema ternario agua/tensactivo/disolvente, se ha reportado en otros trabajos. Como ejemplo de esto tenemos a las enzimas de membrana mitocondriales la ATPasa  $H^+$  y la citocromo oxidasa, las cuales llegan a mantener su actividad a temperaturas mayores que en el medio acuoso (con un contenido de agua aproximadamente de 3  $\mu$ l/ml de tolueno; Ayala et al., 1986). También es el caso de la  $F_1$ ATPasa de corazón de res que se mantuvo activa a temperaturas mayores que en agua (con un contenido de agua máximo de 2.5 %; Garza-Ramos et al., 1989). En los dos ejemplos anteriores se observa que la mayor termoestabilidad que adquieren las enzimas en el medio orgánico se debe a que el sistema presenta un bajo contenido de agua.

Los resultados obtenidos para la termoestabilidad de la catalasa en el medio micelar muestran que la enzima es más termoestable en el sistema con más bajo contenido de agua (5  $\mu$ l). Probablemente en estos sistemas micelares con tan sólo agua de interfase en su interior se mantiene a la enzima con una estructura compacta a temperaturas altas, con menos

posibilidades de que se pierda la estructura tridimensional; de esa manera es más difícil que ocurra su desnaturalización.

Se determinaron resultados similares para la enzima  $\alpha$ -quimotripsina, solubilizada en micelas invertidas de AOT/isooctano. A medida que disminuyen los valores de  $w_a$  aumenta la termoestabilidad de la enzima en el medio micelar (Barbaric y Luisi, 1981).

Los resultados obtenidos en el medio micelar, apoyarían el hecho de que la enzima requiere de poca agua para llevar a cabo su catálisis; es decir, la enzima preserva en estos medios una conformación catalíticamente activa, de tal manera que es muy probable que sólo le sea indispensable cierta cantidad de agua para su funcionamiento. Lo anterior sugiere que la mayor termoestabilidad de la enzima en los medios micelares respondería a un menor contenido de agua. No obstante, este hecho requiere de un estudio más detallado para poder concluir con más evidencias respecto del papel del agua en función del  $w_a$ , en la termoestabilidad de una enzima soluble en un disolvente orgánico apolar.

## V CONCLUSIONES

La oximetría resultó ser una técnica confiable en la medición del consumo o producción de oxígeno en un disolvente orgánico apolar.

El ensayo polarográfico que se realizó con la ayuda del electródo de Clark, mostró las siguientes características: gran sensibilidad, ya que detecta una reacción enzimática tan rápida como es el caso de la reacción que cataliza la catalasa y alta estabilidad: en el lapso de una hora sólo se pierde el 5 % del oxígeno total del medio de reacción.

Con la ayuda de esta técnica se pudo concluir lo siguiente:

1.- La solubilidad del oxígeno en el tolueno fué siete veces mayor que en agua.

2.- La catalasa presentó las siguientes características en el medio micelar de AOT/tolueno en comparación con el medio acuoso:

a) Un valor de  $K_m$  menor.

b) Un valor de  $K_p$  similar.

c) Un valor de actividad específica muy parecido.

d) Un cambio en el valor de su pH óptimo y un corrimiento alcalino de una unidad de pH.

e) Igual sensibilidad ante la azida de sodio.

f) Mayor termoestabilidad en el medio micelar con menor contenido de agua: es decir, a valores bajos de  $w_a$ .

Por otra parte, la sencillez de este nuevo método abre la posibilidad de caracterizar la cinética de otras oxidasas u oxigenasas en un medio orgánico apolar.

## BIBLIOGRAFIA

- . Aebi, H. (1983) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., Ed.), Vol. 3, Verlag Chemie, Weinheim, pp. 273-286.
- . Ayala, G., Tuena de Gómez-Puyou, Gómez-Puyou, A. y Darszon, A. (1986). Thermostability of membrane enzymes in organic solvents. *FEBS Lett.* 203, 41-43.
- . Barbaric, S. y Luisi, P.L. (1981). Micellar solubilization of biopolymers in organic solvents. 5. Activity and conformation of  $\alpha$ -chymotrypsin in isoctane-AOT reverse micelles. *J. Am. Chem. Soc.* 103, 4239-4244.
- . Bloomfield, M.M. (1984) *Chemistry and the living organism* John Wiley y Sons, Inc., New York, pp. 244-245.
- . Clegg, J. S. (1984). Intracellular water and the cytomatrix: some methods of study and current views. *Journal of Cell Biology* 92, 167-171.
- . Cooper, T.G. (1977) *The Tools of Biochemistry* John Wiley y Sons, Inc., New York, pp. 22-26.
- . Dawson, R.M.C., Elliott, D.C., Elliott, W.H. y Jones, K.M. Eds. (1969) *Data for Biochemical Research*. 2th ed. Oxford University Press, London, p. 485.
- . Beisseroth, A. y Dounce, A.L. (1970). Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol. Rev.* 50, 317-375.
- . Dixon, M. y Weeb, E.C. (1979) *Enzymes* Academic Press, New York, p. 281.

- . Douzou, P. (1980). Water-in-oil microemulsions. *Advances in Enzymology* 51, 30-55.
- . Drost-Hansen, W. y Clegg, J.S. (eds) (1979) *Cell-associated Water*. Academic Press, New York pp. 1-440.
- . Drost-Hansen, W. (1982) *Biophysics of Water*. Franks, F. y Mathias, S., editors. John Wiley y Sons, Inc., New York, pp. 163-169.
- . Fendler, J.H. (1980). Microemulsions, micelles, and vesicles as media for membrane mimetic photochemistry. *J. Phys. Chem.* 84, 1485-1491.
- . Fendler, J.H. (1982) *Membrane Mimetic Chemistry*. John Wiley y Sons, New York, pp. 223-232.
- . Galston, A.W. (1955). Plant catalase. in *Methods in Enzymology*, Vol. II 140, Academic Press, Inc., New York, pp. 789-791.
- . Garza-Ramos, G., Darszon, A., Tuena de Gómez-Puyou, M. y Gómez-Puyou, A. (1989). Catalysis and thermostability of mitochondrial  $F_1$ -ATPase in toluene-phospholipid-low-water systems. *Biochemistry* 28, 3177-3182.
- . Goldstein, D. (1963). A method for assay of catalase with the oxygen cathode. *Anal Biochem.* 24, 431-437.
- . "Handbook of Chemistry and Physics", 44th ed. Chemical Rubber Publishing Company, Cleveland, 1962.
- . Israelachvili, J.N. y Pashley, R.M. (1982) *Biophysics of Water*. Franks, F. y Mathias, S., editors. John Wiley y Sons, Inc., New York, pp. 183-194.

- Larsson, K.M., Adlercreutz, P. y Mattiasson, B. (1987). Activity and stability of horse-liver alcohol dehydrogenase in sodium dioctylsulfosuccinate/ cyclohexane reverse micelles. *Eur. J. Biochem.* 166, 157-161.
- Lehninger, A.L. (1970) *Biochemistry* Worth Publishers, Inc., New York; p. 176.
- Luisi, P.L. y Laane, C. (1986) *Trends Biotech* 4, 153.
- Luisi, P.L. y Magid, L.J. (1986). Solubilization of enzymes and nucleic acids in hydrocarbon micellar solutions. *CRC Critical Reviews in Biochemistry* 20, 409-473.
- Luisi, P.L. y Steinmann-Hofmann, B. (1987). Activity and conformation of enzymes in reverse micellar solutions. in *Methods Enzymology* Vol 136, Academic Press, Inc., New York, pp. 188-216.
- Luisi, P.L., Giomini, M., Pileni, M.P. y Robinson, B.H. (1988). Reverse micelles as hosts for proteins and small molecules. *Biochimica et Biophysica Acta* 947, 209-246.
- Haron, S.H. y Prutton, C.F. (1984) *Fundamentos de Fisicoquímica* Limusa, México, pp. 303-306.
- Martinek, K., Levashov, A.V., Khmel'nitski, Y.L., Klyachko, N.L. y Berezin, I.V. (1982). Colloidal solution of water in organic solvents: a microheterogeneous medium for enzymatic reactions. *Science (Wash, DC)* 219, 889-891.
- Martinek, K., Levashov, A.V., Klyachko, N., Khmel'nitski, Y.L. y Berezin, I.V. (1986). Micellar enzymology. *Eur. J. Biochem.* 155, 453-460.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- . Menger, F.M. y Yamada, K. (1979). Enzyme catalysis in water pools. *J. Am. Chem. Soc.* 101, 6731-6734.
- . Reid III T.J., Murthy, H.R.N., Sicignano, A., Tanaka, N., Musick, W.D.L. y Rossmann, G. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 4767-4771.
- . Rorth, M. y Jensen, P.K. (1967). Determination of catalase activity by means of the Clark oxygen electrode. *Biochim. Biophys. Acta* 139, 171-173
- . Rupley, J.H., Gratton, E. y Careri, G. (1983). Water and globular proteins. *Trends Biochem. Sci.* 8, 18-22.
- . Sánchez-Ferrer, A., Bru, R. y García-Carmona, F. (1988). Kinetic properties of polyphenoloxidase in organic solvents. A study in Brij 96- cyclohexane reverse micelles. *FEBS Lett.* 233, 363-366.
- . Schonbaum, G.R. y Chance, B. (1976) in *The Enzymes*, ed. Boyer, P.D. (Academic, New York), 3rd Ed., Vol. 13, pp 363-408.
- . Smith, R.E. y Luisi, P.L. (1980). Micellar solubilization of biopolymers in hydrocarbon solvents. Empirical definition of an acidity scale in reverse micelles. *Helvetica Chimica Acta* 63, 2302-2311.
- . Stryer, L. (1975) *Biochemistry* W.H. Freeman and Company, New York, pp. 201-219.
- . Tanford, C. (1968). Physico-chemical aspects of protein denaturation. *Adv. Protein Chem.* 23, 121.
- . Tanner, J.E. (1983). Intracellular diffusion of water. *Arch.*



- Biochem. Biophys. 224, 416-428.
- Tze-Chia, J. y Kenneth, L.K. (1984). Solubility of oxygen in inverted micelles of calcium alkylbenzene sulfonates. J. Colloid Interface Sci. 102, 308-310.
  - Malde, P., Peng, Q., Fadnavis, N.W., Battistel, E. y Luisi, P. L. (1988). Structure and activity of trypsin in reverse micelles. Eur. J. Biochem. 173, 401-409.
  - Wheeler, .C. J. y Croteau, R. (1986). Terpene cyclase catalysis in organic solvent/minimal water media: demonstration and optimization of (+)- $\alpha$ -pinene cyclase activity Arch. Biochem. Biophys. 248, 429-434.
  - Wolf, R. y Luisi, P.L. (1979). Micellar solubilization of enzymes in hydrocarbon solvents. Enzymatic activity and spectroscopic properties of ribonuclease in N-octane. Biochemical and Biophysical Research Communications 89, 209-217.
  - Wong, M., Thomas, J.K. y Gratzel, M. (1976). Fluorescence probing of inverted micelles. The state of solubilized water clusters in alkane/diisooctyl sulfosuccinate (Aerosol OT) solution. J. Am. Chem. Soc. 98, 2391-2397.
  - Zaks, A. y Klibanov, A.M. (1984). Enzymatic catalysis in organic media at 100 °C. Science 224, 1249-1251.