

00551

17



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**MODIFICACIÓN HIDROFÓBICA DE  
CONJUGADOS BIOCATALÍTICOS BASADOS EN  
QUITOSANO**

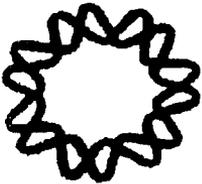
**TESIS**

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

**PRESENTA:**

**I.BQ. GABRIELA MARÍA MORTERA DOMÍNGUEZ**

**TUTOR: DR. RAFAEL VÁZQUEZ DUHALT**



**CUERNAVACA, MORELOS**

**2003**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**A**



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Cabrera Irujo Patricia  
De: Irujo

FECHA: 12 de septiembre de 2012

FIRMA: [Firma manuscrita]

A mis padres: mamá por demostrarme el significado del valor, el esfuerzo y el amor, papá por ser la estrella brillante en el cielo que nunca se apagará.

A mis hermanas: por todos los momentos compartidos y por ser mis cómplices en este camino.

A mis 3 piratas: por ser un regalo de Dios y llenar de alegría mi vida.

A tí: por descubrir lo mejor que hay en mí.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rafael Vázquez Duhalt, por contribuir en mi formación y por la oportunidad que me brindaste de pertenecer a tu grupo de investigación.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Agustín López-Munguía Canales y al Dr. Enrique Galindo Fentanes, por su participación oportuna en el desarrollo del proyecto.

Al jurado revisor de la tesis: Dra. Guadalupe Espín Ocampo, Dra. Keiko Shirai Matsumoto, Dr. Edmundo Castillo Rosales y Dr. Jaime Ortega López, por sus críticas, comentarios y sugerencias.

A la Biol. Rosa Román Miranda y al M. en C. Raunel Tinoco Valencia, por su apoyo técnico en mi estancia en el laboratorio.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgado para la realización de este proyecto.

A los recalcitrantes por el convivir diario y lo aprendido juntos.

A mis amigos...Gracias

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Índice	I
Índice de tablas y figuras	IV
Resumen	VI
Introducción	VII

## 1. Antecedentes

---

1.1 Biocatálisis en la nueva industria	1
1.2 Lacasa como enzima modelo	2
1.2.1 Mecanismo catalítico	5
1.2.2 Aplicaciones de la lacasa del hongo ligninolítico <i>Coriolopsis gallica</i>	7
1.3 Modificación de biocatalizadores	9
1.3.1 Inmovilización de enzimas	9
1.3.1.1 Retención física	10
1.3.1.2 Unión covalente	10
1.3.2 Entrecruzamiento	12
1.3.3 Modificación con polietilén glicol	13
1.4 Biopolímeros para la producción de conjugados biocatalíticos	17
1.4.1 Quitina como polímero precursor	18
1.4.2 Quitosano	20
1.4.2.1 Ejemplos de los conjugados enzimáticos y otros usos	21

## 2. Hipótesis y objetivos

---

2.1 Hipótesis	24
2.2 Objetivo general	24
2.2.1 Objetivos específicos	24

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 3. Materiales y métodos

3.1 Reactivos y solventes	25
3.2 Producción y purificación de la enzima lacasa	25
3.3 Determinación de actividad lacasa	26
3.4 Caracterización reológica de quitosano	27
3.5 Condiciones óptimas de la producción de conjugados biocatalíticos: quitosano-lacasa	28
3.6 Modificación hidrofóbica del conjugado biocatalítico	29
3.6.1 Síntesis de polietilén glicol activado con aldehído	29
3.6.2 Modificación del conjugado biocatalítico con polietilén glicol activado con aldehído	30
3.6.3 Modificación del conjugado biocatalítico con polietilén glicol activado con cloruro cianúrico	30
3.7 Determinación del grado de modificación del polietilén glicol aldehído	30
3.8 Determinación del grado de modificación hidrofóbica del conjugado biocatalítico	31
3.9 Determinación de los perfiles de actividad en función de: pH, temperatura y solvente orgánico	32
3.10 Estabilidad de los conjugados biocatalíticos modificado hidrofóticamente a: pH extremos, temperaturas y solvente orgánico	33
3.11 Ensayo de solubilidad de los conjugados modificados hidrofóticamente en solventes orgánicos	34
3.12 Determinación de actividad residual en solvente orgánico a diferentes $a_w$	36
3.13 Determinación de los parámetros cinéticos con diferentes sustratos	36

---

**4. Resultados y discusión**

---

4.1 Caracterización reológica de quitosano	37
4.2 Conjugados biocatalíticos	40
4.3 Modificación hidrofóbica del conjugado biocatalítico	41
4.4 Perfiles de actividad de los conjugados a pH, temperatura y solvente orgánico	42
4.5 Estabilidad de los conjugados a pH, temperatura y solvente orgánico	48
4.6 Solubilidad de los conjugados modificados hidrofóbicamente en solvente orgánico	54
4.7 Actividad en solventes orgánicos con baja concentración de agua	57
4.8 Determinación de los parámetros cinéticos	59

---

**5. Conclusiones**

---

61

---

**6. Bibliografía**

---

63

Índice de tablas

---

Tabla 1 Características de lacasa de <i>C. gallica</i> UAMH 8260	4
Tabla 2 Clasificación de soportes	11
Tabla 3 Detección espectrofotométrica de actividad lacasa	26
Tabla 4 Actividad de agua de soluciones de sales saturadas	36
Tabla 8 Valores de índice de consistencia de quitosano y quitosano modificado	38
Tabla 9 Porcentaje de enzima inmovilizada con diferentes radios de glucosamina/proteína y excesos de carbodimida/proteína	41
Tabla 10 Grado de modificación del conjugado biocatalítico	42
Tabla 11 Constantes cinéticas de la enzima libre y el conjugado QL en etanol, para la oxidación de ABTS, siringaldazina y 2,6-DMPO	59

Índice de figuras

---

Figura 1 Reacción de oxidación de difenol	5
Figura 2 Estructura tridimensional de lacasa de <i>Trametes versicolor</i>	6
Figura 3 Mecanismo catalítico de la lacasa	7
Figura 4 Estructura general de polietilén glicol	15
Figura 5 Tipos de activación del metoxipolietilén glicol	16
Figura 6 Estructura de quitosano	20
Figura 7 Comportamiento de fluidos en función de la viscosidad	27
Figura 8 Estructura de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimida	28
Figura 9 Reograma de quitosano y quitosano modificado con polietilén glicol aldehído	37
Figura 10 Perfil de viscosidad de quitosano a diferentes pH	39
Figura 11 Mecanismo de acción de la carbodimida	40
Figura 12 Perfil de actividad contra pH de la enzima lacasa en diferentes sustratos	43

	Página
Figura 13 Perfil de pH de la enzima libre y conjugados con ABTS como sustrato	44
Figura 14 Perfil de temperatura de la enzima libre y conjugados	45
Figura 15 Perfil de actividad de la enzima libre y conjugados en etanol	46
Figura 16 Perfil de actividad de la enzima libre y conjugados en isopropanol	47
Figura 17 Perfil de actividad de la enzima libre y conjugados en acetonitrilo	47
Figura 18 Perfil de actividad de la enzima libre y conjugados en tetrahidrofurano	48
Figura 19 Estabilidad de la enzima libre y conjugados a pH 1	49
Figura 20 Estabilidad de la enzima libre y conjugados a pH 12	50
Figura 21 Actividad de la enzima libre y conjugado después de 1 hr de incubación a diferentes temperaturas	51
Figura 22 Actividad de la enzima libre en acetonitrilo después de 1 hr de incubación	52
Figura 23 Actividad de la enzima libre en tetrahidrofurano después de 1 hr de incubación	52
Figura 24 Estabilidad de la enzima libre y conjugados en tetrahidrofurano	53
Figura 25 Solubilidad de quitosano y conjugados en metanol	55
Figura 26 Solubilidad de quitosano y conjugados en acetonitrilo	56
Figura 27 Solubilidad de quitosano y conjugados en tetrahidrofurano	56
Figura 28 Velocidad de oxidación de siringaldazina en solvente orgánico con $a_w=0.73$	58

## RESUMEN

En los últimos años, se ha observado un incremento en la utilización de enzimas inmovilizadas para catálisis en diferentes procesos de la industria (Palmieri y col, 1994; D'Annibale y col, 2000). Las enzimas pueden ser atrapadas o incorporadas covalentemente en polímeros, y así formar materiales biológicamente activos que sean estables y capaces de actuar en ambientes extremos. Con esto en mente, este trabajo consistió en obtener un conjugado biocatalítico mediante la unión del polímero quitosano con la enzima lacasa, seguido de una modificación química para mejorar la catálisis en solvente orgánico.

Se prepararon conjugados biocatalíticos al inmovilizar la enzima lacasa del hongo ligninolítico *Coriolopsis gallica* mediante reacción química de la carbodimida sobre el polímero quitosano. Estos conjugados enzimáticos se sometieron a una modificación hidrofóbica, mediante la adición de una molécula de metoxi-polietilén glicol activada PM 5000.

Se logró producir un conjugado quitosano-lacasa inmovilizando un 57 % de enzima con las condiciones establecidas de temperatura y concentración de carbodimida. El grado de modificación del quitosano, se determinó mediante la titulación de los grupos aminos con fluorescamina. La inmovilización de la enzima en el quitosano le provee estabilidad operacional a pH extremos (1 y 12) y el modificar hidrofóbicamente el conjugado Quitosano-Lacasa, incrementa su estabilidad al doble. El perfil de actividad contra pH y temperatura no se ve afectado al inmovilizar la enzima ni al modificar el conjugado Quitosano-Lacasa. En cuanto a la estabilidad a temperatura no hubo una diferencia significativa de la enzima libre con el conjugado Quitosano-Lacasa ni con el conjugado Quitosano-Lacasa-PEG. A pesar de que la modificación hidrofóbica no le confirió una mayor solubilidad al conjugado Quitosano-Lacasa en solvente orgánico, éste sí presentó una mayor actividad en solvente orgánico con  $a_w$  de 0.73 en comparación con la enzima libre.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## INTRODUCCION

En la actualidad, la industria se ha esforzado por tener procesos energéticamente económicos y ambientalmente amigables. Una opción para esta problemática es el uso de la biocatálisis. Las enzimas son biocatalizadores muy eficientes, selectivos y son ambientalmente inocuos. Un aspecto importante de la biocatálisis es explorar aplicaciones novedosas y estrategias para el uso de las enzimas (Valderrama y col, 2003). Una estrategia emergente es, que al combinar la actividad catalítica de ciertas enzimas, con las propiedades fisicoquímicas de polímeros da como resultado conjugados biocatalíticos con características de interés para la industria como lo son estabilidad y fácil recuperación del catalizador.

Un aspecto importante para la formación de los conjugados biocatalíticos, es el uso de biopolímeros naturales en lugar de polímeros sintéticos debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad. Diversos estudios se han enfocado en utilizar polímeros naturales como soportes para llevar a cabo algún tipo de inmovilización (Hirano y Zhang, 2000; Kurita y col, 1997; Wu y col, 2002). Dentro de los polímeros naturales, el quitosano ha sido ampliamente utilizado en alimentación, medicina y biocatálisis debido a su alta disponibilidad, bajo costo y biocompatibilidad (Majeti y Kumar, 2000). El quitosano es un polímero de interés para llevar a cabo reacciones químicas controladas debido a la reactividad de sus grupos funcionales (Vazquez-Duhalt y col, 2001; D'Annibale y col, 2000; Wu y col, 2002).

Dentro de las enzimas de interés biotecnológico se encuentra la lacasa, la cual es utilizada en su forma nativa o como biocatalizador inmovilizado (Luterek y col, 1998). La lacasa tiene aplicaciones potenciales en la descontaminación de sistemas que contienen fenoles (Yaropolov y col, 1994), en el tratamiento de efluentes de la industria textil (Karum y Nicell, 1997) y para oxidar hidrocarburos aromáticos (Pickard y col, 1999).

Diferentes métodos se han descrito para conjugar polímeros con enzimas, involucrando de forma general el acoplamiento de grupos reactivos del polímero con la cadena polipeptídica de la enzima, con el objetivo de incrementar la solubilidad y estabilidad de la enzima en condiciones extremas. Considerando lo anterior, la lacasa puede ser conjugada covalentemente con el quitosano, debido a que la lacasa en su superficie tiene un gran número de grupos carboxilos y es posible que existan interacciones electrostáticas con los grupos amino del quitosano en más de un punto. Debido a que algunos sustratos de esta enzima son solubles en solvente orgánico, se propone una modificación hidrofóbica del sistema para que la reacción se lleve a cabo en una sola fase y se mejore la catálisis. Estudios previos muestran que la modificación química con polietilén glicol contribuye en gran medida a la solubilidad, termoestabilidad y estabilidad de enzimas en solventes orgánicos (Longo y Combes, 1999; García-Arellano y col, 2002). Por lo tanto, con la modificación hidrofóbica del conjugado biocatalítico, se podrían tener características de interés para la industria como lo son estabilidad a condiciones extremas de pH, temperatura, solvente orgánico y una fácil recuperación del biocatalizador.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Biocatálisis en la nueva industria

Mientras que una amplia variedad de productos químicos resultado de tecnologías innovadoras, han aportado comodidad a nuestras vidas en el siglo pasado, también han sido responsables de un impacto negativo en el medio ambiente (Kitajima y Yamamoto, 2002). Es inevitable que la industria, en un esfuerzo por minimizar los problemas de contaminación ambiental, desarrolle tecnologías que sean económicamente viables, energéticamente favorables y ambientalmente amigables. Las presiones energéticas vendrán de la menor disponibilidad de recursos no renovables, mientras que las presiones ambientales vendrán de una legislación cada vez más estricta, lo cual es producto de la creciente demanda de la sociedad por un ambiente limpio (Valderrama y col, 2003). En las últimas dos décadas, se ha observado un creciente interés en utilizar fuentes renovables y explotar reacciones biológicas con el objetivo de tener procesos con beneficios energéticos y ambientales (Eggersdorfer y col, 1992; Wu y col, 2002).

Una estrategia interesante para cumplir estas expectativas es la biotecnología de enzimas. Las enzimas son proteínas que funcionan como catalizadores acelerando la velocidad de una reacción química. El uso de enzimas no solo se refiere a la industria de procesos, sino que abarca otros sectores como la medicina, al análisis, la protección ambiental, la energía y medios de comunicación. Actualmente las enzimas pueden ser empleadas como catalizadores en procesos industriales. También son usadas como reactivos analíticos y encuentran diversas aplicaciones en el campo de la medicina. El uso regular en terapia clínica, la aplicación en sensores enzimáticos para controlar procesos y el desarrollo de tecnologías para el uso de enzimas en el tratamiento de efluentes, celdas electroquímicas

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# PAGINACION DISCONTINUA

y síntesis orgánica, produce cambios significativos en la magnitud y la estructura del mercado de enzimas. En los últimos años la biotecnología y sus aplicaciones industriales en la obtención de productos químicos, en la industria alimentaria y farmacéutica han experimentado grandes avances. Los procesos catalizados por enzimas en la industria son cada día más numerosos, debido a que presentan una serie de ventajas sobre los catalizadores convencionales no biológicos (Arroyo, 1998). Esto se debe a que las enzimas tienen características muy particulares: alta actividad catalítica, funcionan a temperatura ambiente y presión atmosférica, son biodegradables y muestran una gran especificidad de sustrato (incluso estereo y regio selectiva). A pesar de el innegable potencial de las enzimas, éstas no siempre son estables bajo las condiciones de operación que requieren determinados procesos industriales. Sin embargo, las enzimas pueden ser manipulables mediante modificaciones químicas o con ingeniería de proteínas, con el objetivo de hacerlas más estables a ambientes extremos, más solubles o más selectivas, para que sean capaces de transformar materias primas en productos de valor agregado (Illanes, 1994). Este paso representa un importante desafío tecnológico que está siendo resuelto paulatinamente mediante la integración de diversos conocimientos, lo que permite presentar un panorama interesante para la biotecnología y perspectivas de desarrollo a corto y mediano plazo.

## 1.2 Lacasa como enzima modelo

La lacasa (E.C. 1.10.3.2) es una polifenol oxidasa que cataliza la oxidación de una variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos. La lacasa es miembro de una familia de oxidasas, la cual incluye a la ascorbato oxidasa, la ceruloplasmina y al citocromo c oxidasa. La enzima lacasa fue descubierta hace más de un siglo en el árbol japonés *Rhus vernicifera* (Yoshida, 1883). Las lacasas se encuentran principalmente en hongos, pero también en

bacterias y plantas, son enzimas que contienen cobre y que catalizan la oxidación de diferentes compuestos aromáticos, mediante la reducción de oxígeno molecular a agua (Yaropolov y col, 1994).

Diferentes lacasas se han aislado, caracterizado e incluso clonado en los últimos años (Johannes y Majcherczyk, 2000). Sin embargo, dentro de las lacasas que se han estudiado, pocas son provenientes de bacterias y se ha propuesto que su función está relacionada principalmente en la formación de pigmentos. En cuanto a las lacasas de plantas se sabe que participan en la síntesis de lignina, mediante el acoplamiento de monolignoles a oligolignoles, durante procesos de regeneración por daños mecánicos. Las lacasas fungales constituyen el grupo mejor estudiado y caracterizado, un notable número de hongos las producen y puede ser de forma intra-celular, pero sobre todo de forma extra-celular. Los mecanismos catalíticos, actividades y posibles aplicaciones de las lacasas fungales han sido investigados en diferentes especies: *Trametes versicolor* (Collins y col, 1996; Majcherczyk y col, 1998; Piontek y col, 2002), *Pleurotus ostreatus* (Hublik y Schinner, 2000; Tinoco y col, 2001), *Coriolopsis gallica* (Calvo y col, 1998; Pickard y col, 1999), *Trametes hirsuta* (Abadulla y col, 2000) y *Ganoderma lucidum* (Ko y col, 2001). La función de las lacasas fungales está relacionada con la producción de melanina y pigmentos, en la degradación de lignina, y en la detoxificación de sistemas que contienen compuestos fenólicos tóxicos (Li y col, 1999). Entre las lacasas de diferentes especies de hongos se encuentran variaciones significantes en sus constantes cinéticas, potencial redox y especificidad por sustratos. Sin embargo, la estructura del sitio activo es bastante conservado en las lacasas fúngicas, existiendo una gran diversidad en el resto de la proteína principalmente en la parte glicosídica de la enzima (Mayer y Staples, 2002).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La actividad de lacasa *in vitro* es determinada principalmente por ensayos espectrofotométricos, mediante el monitoreo de productos de oxidación que son coloridos. Los sustratos más utilizados son: guayacol, 2,6-dimetoxifenol, siringaldazina y sustratos no fenólicos ricos en electrones como el ABTS (Johannes y Majcherczyk, 2000). Debido a su capacidad de catalizar la oxidación de compuestos aromáticos, las lacasas reciben una mayor atención como enzimas potenciales para la industria en diferentes aplicaciones: deslignificación de la pulpa de papel, degradación de insecticidas o pesticidas, tratamientos de residuos de la industria textil, y degradación de hidrocarburos polinucleoarómicos (Xu y col, 2000).

El hongo *Corioloopsis gallica* degrada lignina y produce enzimas ligninolíticas, principalmente lacasa y manganeso peroxidasa. Con el objetivo de estudiar la modificación enzimática de hidrocarburos polinucleoarómicos mediante la lacasa de *Corioloopsis gallica* UAMH 8260, Vandertol-Vanier y col, (2002) purificaron y caracterizaron esta enzima (Tabla 1).

Tabla 1. Características de la lacasa de *C. gallica* UAMH 8260 (Vandertol-Vanier y col, 2002)

pl de isoenzima	3.4
Peso molecular por SDS-PAGE	66 000
Peso molecular por MALDI-TOF	56 668
Contenido de carbohidratos	21%
Contenido de átomos de cobre/molécula de lacasa	3.3
Índice de pureza ( $A_{280} : A_{606}$ )	5

Encontrando que es una glicoproteína azul con un contenido de 4 átomos de cobre por molécula. El peso molecular promedio es de 66 kDa, con un contenido de carbohidratos de 21%, valores que están dentro del intervalo reportado por Thurston (1994), donde las lacasas típicas muestran un peso molecular entre 60-80 kDa, con un 15-20% de carbohidrato.

### 1.2.1 Mecanismo catalítico

Las lacasas fúngicas son oxidasas multicobre, que catalizan la oxidación de la lignina, *orto* y *para* difenoles y poliaminas, usando oxígeno molecular como oxidante reduciéndolo directamente a agua. La oxidación de un sustrato fenólico (Fig 1), involucra típicamente la formación de un radical libre después de la transferencia de un electrón a la lacasa, el radical puede sufrir otra oxidación con la formación de una quinona, la cual puede ser sustrato de reacciones polimerización.

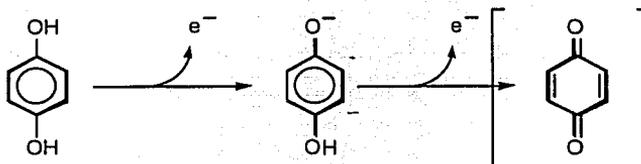


Figura 1. Reacción de oxidación de difenol (Thurston, 1994)

La molécula de lacasa contiene 4 átomos de cobre, los cuales juegan un papel importante en el mecanismo catalítico de la enzima (Gianfreda y col, 1999). Esfuerzos importantes se han realizado para obtener las estructuras tridimensionales de lacasas fúngicas. Ducros y col, (1998) reportaron la estructura cristalográfica de la lacasa del hongo

*Coprinus cinereus* con un cobre depletado. Recientemente Piontek y col, (2002) reportaron la estructura cristalográfica de la lacasa de *Trametes versicolor* en su estado completamente oxidado (Fig 2).



Figura 2. Estructura tridimensional de lacasa de *Trametes versicolor*. En rojo se muestran los 4 átomos de cobre que forman parte de los tres sitios redox (T1, T2 y T3) (Piontek y col, 2002)

Los autores sugieren que esta estructura, proporciona una idea de la coordinación de los cuatro cobres en la lacasa, estos han sido clasificados de acuerdo a su resonancia paramagnética electrónica en tres centros de cobre: tipo 1 (T1), tipo 2 (T2) y tipo 3 (T3; donde se encuentran dos átomos de cobre unidos antiferromagnéticamente). Estudios de dicroísmo circular y espectroscopía de absorción de rayos X muestran que los centros de cobre tipo 2 y 3 forman un cluster trinuclear (T2/T3). La catálisis involucra la unión de un sustrato al centro de cobre T1 (Fig 3), con la subsecuente reducción de Cu(II) a Cu(I) en el sitio T1, (el cuál es el responsable del color azul en las proteínas que lo contienen, con un

máximo de absorción aproximadamente en 600 nm). Después hay una transferencia interna de electrones del centro T1 al cluster T2/T3. Finalmente la unión y subsecuente reducción de oxígeno a agua en el cluster T2/T3 (Solomon y col, 1996).

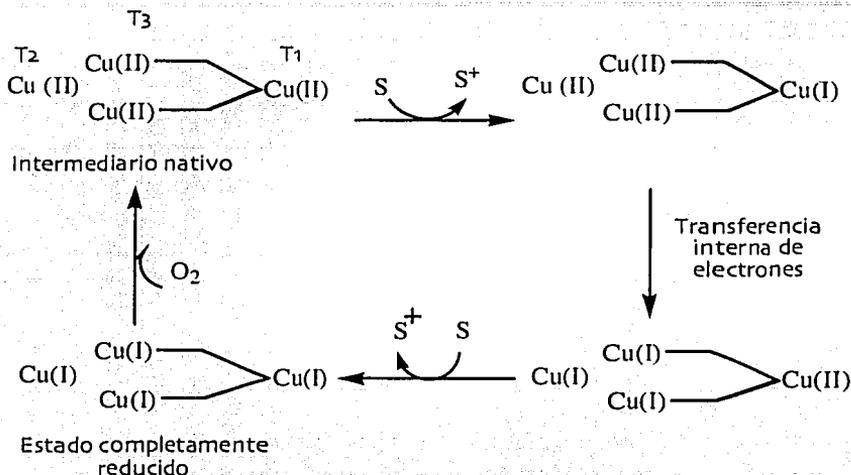


Figura 3.- Mecanismo catalítico de la lacasa (Solomon y col, 1996)

### 1.2.2 Aplicaciones de la lacasa del hongo ligninolítico *Coriolopsis gallica*

La lacasa purificada del hongo ligninolítico *C. gallica* es capaz de metabolizar hidrocarburos polinucleoaromáticos (HPA), estos son de importancia fundamental debido a que son contaminantes generados por la combustión incompleta del material orgánico contenido en el petróleo crudo. Los HPA son moléculas que contienen 2 o más anillos aromáticos de 6 carbonos fusionados y son compuestos con alto potencial redox. Debido a

sus efectos tóxicos, los HPA representan un serio riesgo a la salud humana, debido a que presentan actividad carcinogénica (Collins y col, 1996; Sack y col, 1997). Los HPA que son metabolizados por los hongos, son susceptibles de ser atacados por dos vías, ya sea por el sistema monooxigenasa P-450 (Bezalet y col, 1997), por enzimas ligninolíticas como la manganosa y lignina peroxidasa (Vazquez-Duhalt y col, 1994; Field y col, 1996; Torres y col, 1997; Wang y col, 2002) o por la lacasa (Collins y col, 1996; Majcherczyk y col, 1998; Pickard y col, 1999; Vandertol-Vanier y col, 2002). En la mayoría de los casos, los HPA son sustratos poco solubles en agua, lo cual limita su metabolismo in vitro, de aquí la necesidad de estudiar el comportamiento de la lacasa en medios con restricción de agua (Rodakiewicz-Nowak y col, 2000; Vandertol-Vanier y col, 2002).

Pickard y col, (1999) reportan la transformación enzimática de 10 hidrocarburos polinucleoaromáticos mediante la lacasa. De los 10 HPA utilizados, 7 fueron transformados por la lacasa. Y se estudiaron los efectos de la adición de sustratos mediadores para incrementar la velocidad de oxidación de los sustratos.

La enzima lacasa del hongo ligninolítico *Coriopsis gallica*, además de ser utilizada para oxidar hidrocarburos polinucleoaromáticos (Pickard y col, 1999; Vandertol-Vanier et al., 2002), también es utilizada para descontaminar sistemas que contienen fenoles (Karum y Nicell, 1997), y para tratar efluentes de la industria textil (Calvo y col, 1998). De esta forma se siguen aportando conocimientos importantes en los últimos años para elucidar la función, estructura y mecanismos de reacción de las lacasas, como enzimas con aplicaciones prácticas en la biotecnología.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 1.3 Modificación de biocatalizadores

El uso de enzimas en síntesis química para la resolución de mezclas racémicas al igual que su utilización en biosensores, catalizadores en la industria alimentaria y en detergentes, necesitan el desarrollo de técnicas para alterar sus propiedades catalíticas. La modificación química es el método que originalmente se utilizó para alterar y mejorar funciones en las proteínas y poder utilizarlas con nuevas propiedades (DeSantis y Jones, 1999). Se han propuesto diversas estrategias para llevar esto a cabo mediante inmovilización, entrecruzamiento, y adición de polímeros.

#### 1.3.1 Inmovilización de enzimas

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se localiza a la enzima en una región definida del espacio, con la característica general de retener su actividad catalítica y que se pueda reutilizar (Katchalski-Katzir, 1993). Las aplicaciones más importantes de las enzimas inmovilizadas se pueden clasificar en: analíticas (biosensores), médicas (aplicación terapéutica) y en aplicaciones industriales (en la industria química, alimentaria, farmacéutica y tratamiento de residuos), donde en todas las aplicaciones se traduce en una mejora significativa en su solubilidad y estabilidad (Arroyo, 1998). Hay enzimas que muestran un amplio rango de solubilidad en determinado proceso especialmente cuando son inmovilizadas. Aspartasas, lipasas, amidasas, son ejemplos de enzimas inmovilizadas que adquieren vidas medias de semanas o meses. La inmovilización de enzimas se utiliza con la finalidad de proteger a la enzima contra cambios de pH, temperatura o fuerza iónica, y se refleja generalmente en un incremento en la solubilidad y estabilidad (Palmieri y col, 1994). Aunado a esto, la inmovilización de enzimas presenta la ventaja de que la enzima puede ser separada del sustrato y producto de reacción y utilizarse repetidamente. Aunque se han desarrollado y

aplicado diversas técnicas de inmovilización, se reconoce que no hay un método universal válido aplicable para todas las enzimas. No obstante, gracias a toda la información disponible en la actualidad, se pueden hacer generalizaciones sobre cada método de inmovilización, seleccionando el más adecuado para cada aplicación específica.

#### 1.3.1.1. Retención física

El atrapamiento consiste en la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa, constituida generalmente por prepolímeros entrecruzables o polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato o resinas de poliuretano. El atrapamiento puede ser en geles o en fibras, este método es de gran sencillez desde el punto de vista experimental, ya que requiere de poca cantidad de enzima para obtener derivados activos (Arroyo, 1998). Sin embargo, se requiere de un control riguroso de las condiciones de polimerización, y asegurar que la naturaleza química del proceso no altere los grupos reactivos de la proteína. Palmieri y col, (1994) ensayaron la inmovilización de una fenol oxidasa, mediante atrapamiento en geles de alginato de cobre, encontrando que la enzima fue activa en un amplio rango de pH y se incrementó la velocidad de oxidación de sustratos.

#### 1.3.1.2. Unión covalente

La unión química de las enzimas a un soporte, es el método de inmovilización más utilizado. Las enzimas son inmovilizadas a través de algún tipo de interacción entre los residuos de aminoácidos de la proteína y grupos reactivos del soporte. Las propiedades de la enzima inmovilizada van a estar regidas en gran parte por las características particulares tanto de la enzima como del soporte. La interacción entre los dos resulta en una enzima

inmovilizada con características químicas, bioquímicas, mecánicas o cinéticas específicas (Tischer y Kasche, 1999).

Los soportes empleados en la inmovilización de enzimas deben tener características deseables, como una elevada resistencia mecánica, química y biológica, insolubilidad, regenerabilidad y bajo costo. Algunas de estas características se encuentran en compromiso, por lo cual no existe un soporte ideal para determinado proceso. Los soportes difieren en tamaño, densidad, porosidad y forma. Los soportes se pueden clasificar de la siguiente manera (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de soportes (Arroyo, 1998)

Tipo de soporte		Ejemplos
Inorgánicos	Naturales	Arcillas, sílice, piedra pómez
	Sintéticos	Oxidos de metales, vidrio de tamaño de poro controlado, vidrio no poroso, alúmina, cerámicas
Orgánicos	Naturales	Celulosa, almidón, dextranos, agar, agarosa, quitina, quitosano, colágeno, queratina
	Sintéticos	Poliiolefinas, poliacrilatos, poliacrilamidas, alcohol polivinílico, poliamidas

Las enzimas se pueden unir a los soportes mediante adsorción y mediante unión covalente. En la adsorción, la enzima se une a un soporte mediante interacciones iónicas, fuerza de van der Waals y por puentes de hidrógeno. Los principales factores que influyen a la adsorción son: el pH del medio, la fuerza iónica, el diámetro del poro y la presencia de iones. La unión covalente de una enzima a un soporte es quizá el método de inmovilización más interesante desde el punto de vista industrial, por ser altamente manipulable. La metodología de la unión covalente se basa en la funcionalidad de grupos químicos del soporte

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

para que reaccionen con residuos de aminoácidos de la enzima (grupos OH, SH, NH<sub>2</sub>, COOH, etc). Existen diversos tipos de reacciones químicas que se han utilizado en la unión covalente de enzimas a soportes activados, como la acilación, alquilación, formación de bases de Schiff. Dentro de las ventajas que presenta este sistema de inmovilización es, que la carga de la enzima permanece constante después de la inmovilización y por lo general presentan una mayor resistencia a la desnaturalización por el efecto de la temperatura, solvente orgánico, y pH al tener estabilizada su estructura terciaria. La enzima polifenol oxidasa utilizada ampliamente en la oxidación de *o*-difenoles, se inmovilizó covalentemente usando como soporte al polímero carboximetilcelulosa. La inmovilización covalente le confirió a la enzima propiedades interesantes para ser utilizada a gran escala. La vida media a 50°C para la enzima libre fue de 73 min y para la enzima inmovilizada fue de 210 min (Arica, 2000). Estos resultados sugieren que la termoestabilidad de la polifenol oxidasa, se incrementó como resultado de la inmovilización covalente sobre carboximetilcelulosa.

### 1.3.2 Entrecruzamiento

Una de las estrategias de modificación química para que la enzima no pierda su conformación es el entrecruzamiento, el cual puede tener un efecto estabilizador (mecánico y químico), mediante la prevención del desplegamiento de la proteína. Los agentes bifuncionales que se utilizan para entrecruzar enzimas pueden ser: glutaraldehído, cloruro de adipilo, carbodimida y diaminas. El tiempo total de reacción, al igual que la concentración del agente, pueden controlar el grado de entrecruzamiento de la enzima (Govardhan, 1999).

En años recientes se ha investigado los efectos de gelificación en sistemas de microesferas de quitosano entrecruzado con glutaraldehído para la liberación controlada de

fármacos (Fwu-Long y col, 1999). La penicilina G acilasa, utilizada comercialmente en la hidrólisis de penicilina G y cefalosporina G, se estabilizó mediante el entrecruzamiento con dialdehídos de dextrana. La enzima entrecruzada, mostró un incremento de nueve veces en su vida media a 55°C sin afectar su valor de  $V_{max}$  (Kazan y col, 1997). El incremento en la estabilidad térmica, se atribuyó tanto al entrecruzamiento (interacciones no covalentes), como a las interacciones favorables entre los grupos hidroxil con las moléculas hidrofílicas de la enzima.

Tomando en cuenta que el entrecruzamiento confería propiedades interesantes a las enzimas, hubo un interés en estudiar los cristales de enzima entrecruzados (CLEC's). Qiucho y Richards (1964) fueron los primeros en reportar el uso de glutaraldehído como agente entrecruzante, logrando estabilizar mecánicamente el cristal de la carboxipeptidasa-A, para obtener un mejor patrón de difracción. En los cristales, las moléculas de proteína están simétricamente arregladas con una orientación definida y su conformación nativa es estabilizada, otorgándole en la mayoría de los casos una estabilidad térmica a las proteínas. La cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* en forma soluble e inmovilizada es inactiva por arriba de una temperatura de 50°C, sin embargo cuando el cristal de cloroperoxidasa se entrecruza, se incrementa su termoestabilidad comparada con la enzima soluble (Ayala y col, 2002).

### 1.3.3 Modificación con Polietilén glicol

La modificación de la superficie de una proteína mediante la unión química de polímeros, es una buena estrategia para desarrollar biocatalizadores con propiedades interesantes. No obstante se ha estudiado la adición de pequeñas moléculas, al igual que carbohidratos sobre la superficie de las proteínas con el objetivo de mejorar su estabilidad. El

acoplamiento del carbohidrato quitosano sobre la enzima celulasa de *Trichoderma viride* incrementó su termoestabilidad al igual que su estabilidad a pH entre 1 y 3.2 (Darias y Villalonga, 2001). Un factor importante que contribuye a la estabilización a pH, es la interacción entre los grupos carboxil del ácido glutámico y aspártico de la enzima con los grupos aminos del quitosano.

Los polímeros como el polietilén glicol han sido muy estudiados, debido a que es una molécula anfifílica y de alto peso molecular, que contribuye en gran medida a la solubilidad y estabilidad de enzimas en solventes orgánicos (Longo y Combes, 1999). De gran importancia es su utilización en el diseño de enzimas terapéuticas, reduciendo su antigenicidad e incrementando su estabilidad *in vivo* (Lundbland y Bradshaw, 1997).

El polietilén glicol (PEG) es una molécula lineal o ramificada, es un poliéter neutral y hay una amplia variedad de pesos moleculares. El PEG se forma a partir de la polimerización aniónica de óxido de etileno, iniciado por un ataque nucleofílico de un grupo hidroxilo sobre un anillo epóxido. A pesar de su aparente simplicidad, esta molécula se ha convertido en un punto de interés en el campo de la biotecnología y biomedicina, debido a que el PEG tiene un amplio rango de solubilidad, ya sea en agua o en diferentes solventes orgánicos incluyendo: tolueno, cloruro de metileno, etanol y acetona (Harris, 1992). El PEG se puede utilizar comúnmente como monometoxi-PEG (mPEG), en el cual uno de los extremos terminales de la molécula está constituido por un grupo metoxilo, mientras que el otro extremo es un grupo hidroxilo (Fig 4). Una de las ventajas de utilizar mPEG en la modificación de proteínas es su monofuncionalidad ya que no produce un entrecruzamiento entre la proteína (Veronese, 2001; Roberts y col, 2002).

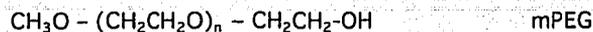
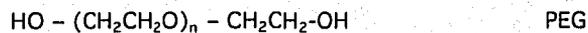


Figura 4. Estructura general de polietilén glicol

El grupo hidroxil de la molécula del PEG es susceptible de ser activado con grupos funcionales (pequeñas moléculas orgánicas, polímeros o polisacáridos), los cuales proporcionan un sitio de unión covalente con grupos reactivos específicos de proteínas (Abuchowski y col, 1977; Harris y col, 1984). Dentro de los tipos de activación del polietilén glicol se encuentra el PEG activado con cloruro cianúrico (Fig 5), el cual puede reaccionar con grupos funcionales nucleofílicos como lisina, serina o tirosina, produciendo un conjugado con un enlace amino secundario y el desplazamiento de un átomo de Cl. Conociendo la estructura de determinadas proteínas, se pueden modificar de forma específica mediante la oxidación de moléculas de carbohidratos de las glicoproteínas, produciendo grupos aldehídos que puedan reaccionar con el PEG-amino (PEG-NH<sub>2</sub>). Derivados del PEG se utilizan en una variedad de aplicaciones en campos de la biotecnología tales como: modificación de proteínas, síntesis de péptidos, purificación de células, etc. Usualmente las proteínas a las cuales se les pega el PEG, permanecen activas demostrando que el PEG no desnatura a las proteínas y les provee en ciertas ocasiones características de interés como lo son estabilidad, solubilidad y termoestabilidad. Como es el caso del citocromo c modificado químicamente con PEG<sub>5000</sub> activado con cloruro cianúrico, el cual incrementó dramáticamente la termoestabilidad de la proteína. El citocromo modificado retiene un 45 % de actividad a 80°C después de 7 hrs de incubación, mientras que la enzima sin modificar pierde toda su actividad después de 3 hrs de incubación a la misma temperatura. La modificación con PEG activado, produjo un conjugado capaz de oxidar compuestos polinucleoaromáticos y azufrados a 80°C en presencia de

peróxido de hidrógeno y con una alta actividad en medios conteniendo 97.5% de solvente orgánico (García-Arellano y col, 2002).

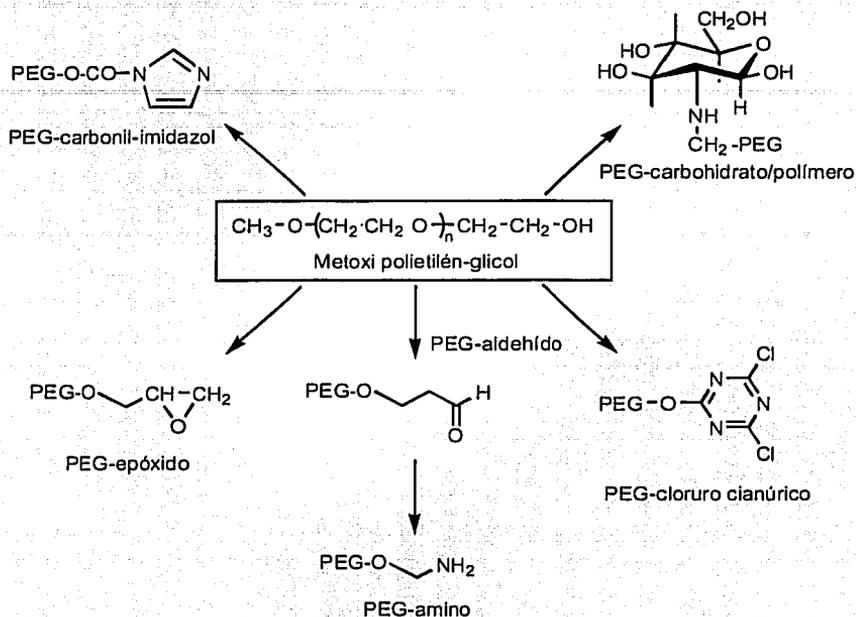


Figura 5. Tipos de activación del metoxipoliétilén glicol

Otras razones por las cuales la unión covalente del PEG a péptidos y proteínas es de gran interés, es su utilización en medicina. Las modificaciones químicas de proteínas con PEG o sus derivados, se utilizan con el propósito de incrementar la vida media y reducir la inmunoreactividad de enzimas en fármacos para diversas enfermedades. Algunos productos basados en modificación química con PEG, que se encuentran en el mercado son: Adagen® Oncospar® y PEG-Intrón® (Roberts y col, 2002).

Debido a la naturaleza hidrofílica del PEG, es posible modificar enzimas en solución acuosa. Dado que es una molécula anfifílica, también permite la modificación de la enzima en función de un ambiente hidrofóbico. Tal es el caso de la modificación con PEG activado de diferentes enzimas: lipasa, catalasa, quimotripsina y peroxidasa que fueron solubles y activas en solventes orgánicos como tolueno, benceno, cloroformo y 1,1,1 tricloroetano (Inada y col, 1986). Las enzimas hidrolíticas catalizaron la reacción inversa de hidrólisis en solvente orgánico. La catalasa acoplada a PEG fue insoluble en benceno, pero al aumentar los grupos aminos modificados, la enzima incrementa su solubilidad. La peroxidasa de rábano tuvo una modificación del 60% sobre los grupos aminos con una catálisis eficiente de la oxidación de sustratos con peróxido de hidrógeno en benceno.

La modificación química de enzimas con PEG ha sido utilizada ampliamente en biotecnología aplicada, con el objetivo de tener enzimas activas, estables y solubles en solvente orgánico (Vandertol-Vanier y col, 2002; Veronese, 2001). Estas propiedades proveen de nuevas tecnologías para la biocatálisis. El tener un sistema soluble y activo en un ambiente no polar, podría permitir el estudio de reacciones que funcionen en ambientes hidrofóbicos. Al igual que su utilización en la industria farmacéutica, donde muchas medicinas son solubles debido a la adición de PEG, facilitando su administración (Veronese, 2001).

#### 1.4 Biopolímeros para la producción de conjugados biocatalíticos

Como hemos visto, en los últimos años se ha observado un incremento en la utilización de enzimas inmovilizadas para catálisis en diferentes procesos de la industria. Mediante la combinación de las propiedades fisicoquímicas de los polímeros con la actividad catalítica de la enzima, se pueden formar conjugados polímero-enzima, generando materiales

biológicamente activos. Y si estos conjugados se someten a modificaciones químicas con el objetivo de mejorar su catálisis en medios no convencionales, se podrían tener características de interés para la industria como lo son estabilidad a condiciones extremas de pH, temperatura, solvente orgánico y una fácil recuperación del biocatalizador.

Los biopolímeros naturales son de gran interés para la industria, debido a que la mayoría de los polímeros presentes hoy en día son materiales sintéticos, su biocompatibilidad y biodegradabilidad está mucho más limitada comparada con los polímeros naturales (Majeti y Kumar, 2000). Diversos estudios se han centrado en utilizar polímeros naturales como soportes para llevar a cabo algún tipo de inmovilización: celulosa (Hirano y Zhang, 2000; Arica y col, 2000), quitina (Kurita y col, 1997; Kurakake y col, 1997), quitosano (Carrara y Rubiolo., 1997; Kumar y col, 1998; Magnin y col, 2001; Darias y Villalonga., 2001; Wu y col, 2002). El explotar las características o grupos funcionales de los polímeros al igual que las enzimas, se ha visto reflejado en la formación de conjugados biocatalíticos con diversas aplicaciones.

#### 1.4.1 Quitina como polímero precursor

La quitina es un polímero que se encuentra naturalmente en los exoesqueletos de los crustáceos, en la cutícula de insectos y en la pared celular de hongos. Es considerada como el segundo polímero mas abundante después de la celulosa (Majeti y Kumar, 2000). Es un mucopolisacárido que consiste en residuos de acetil glucosamina unidos a través de enlaces  $\beta$  (1-4). La quitina tiene aplicaciones potenciales en alimentos, medicina, tratamiento de aguas residuales, al igual que la industria textil y cosmética (Khor y Lim, 2003).

Comercialmente la quitina se obtiene a partir de los caparazones de crustáceos, principalmente de cangrejos y camarones. El proceso para obtener quitina consiste en la remoción de proteína de los caparazones con un tratamiento álcali 3-5% de NaOH y la disolución del carbonato de calcio que se encuentra presente en altas concentraciones con una solución de HCl al 3-5% a temperatura ambiente. El producto resultante es la quitina en forma de un precipitado blanco. La quitina se deacetila con una solución de 40-50% NaOH a 120°C aproximadamente 1-3 hrs. El precipitado se lava con agua y se disuelve en 2% de ácido acético. El material insoluble es removido y la solución resultante es neutralizada con NaOH. Este tratamiento produce aproximadamente quitosano con un 70% de deacetilación (Majeti y Kumar, 2000). El uso de ácidos y álcalis en los procesos tradicionales de obtención de quitina afectan el grado de deacetilación y polimerización, mientras que los métodos biológicos como la fermentación ácido-láctica, permite eliminar proteínas y minerales de forma más específica (Cira y col, 2002). Por otro lado, la producción de quitosano a partir de caparazones de crustáceos que se obtienen como residuos de la industria alimentaria puede ser económicamente muy atractiva, especialmente si se recuperan los carotenoides. Los caparazones contienen cantidades importantes de astaxantina, el cual es un carotenoide que se utiliza como aditivo en los alimentos marinos en la acuicultura. También se ha evaluado la producción de quitosano a partir de diferentes hongos zigomicetos, incluyendo *Absidia*, *Gongronella*, *Mucor* y *Rhizopus*. Tan y col, (1996) encuentran que la mayor producción de quitosano es a partir de *G. butleri*. Con este hongo, Nwe y Stevens, (2002) describen la producción de quitosano de buena calidad para su posterior uso en consumo humano.

### 1.4.2 Quitosano

Estructuralmente el quitosano es un polímero natural que está constituido por residuos de glucosamina con enlaces  $\beta$  (1-4), y un grupo amino en el carbono 2 (Fig 6). El quitosano es un material heterogéneo cuyo grado de deacetilación varía desde un 60 hasta un 90%, y los pesos moleculares se reportan de 50 hasta 2000 kDa, atribuyéndose esta heterogeneidad a la falta de control en el procesamiento de la quitina.

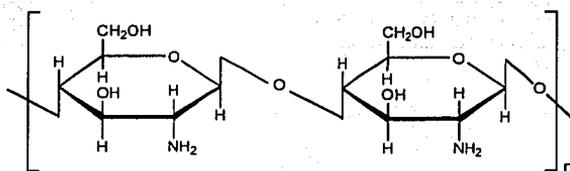


Figura 6. Estructura de quitosano

El quitosano es un polímero semi-cristalino y el grado de cristalinidad está en función del grado de acetilación (Majeti y Kumar, 2000). El quitosano es un polímero interesante debido a su carácter iónico en soluciones ácidas, lo cual está relacionado con la protonación de sus grupos aminos. Esta protonación es responsable de la solubilidad del quitosano (Dambies y col, 2001). El polímero normalmente es insoluble por encima de un pH 7, sin embargo por abajo de un pH 5, los grupos aminos están protonados y la molécula es soluble. A valores de pH mayores que el pKa del quitosano (6.3), predomina la forma neutra del grupo amino ( $\text{RNH}_2$ ), mientras que a valores de pH inferiores predominan los grupos aminos protonados ( $\text{RNH}_3^+$ ). Las propiedades fisicoquímicas del quitosano están gobernadas por factores como la temperatura, pH, fuerza iónica, grado de deacetilación, y de gran interés ha sido la caracterización y modificación del polímero. Brungerotto y col, (2001) caracterizaron

el quitosano de diferentes fuentes y relacionaron el grado de deacetilación con la pureza y solubilidad mediante IR. Un reporte complementario es el de Ravindra y col, (1998) donde proponen un método para estimar la solubilidad de quitosano con diferentes grados de deacetilación. Mediante parámetros como tensión superficial, viscosidad intrínseca, constante dieléctrica e interacción Flory-Huggins.

Debido a la amplia reactividad de los grupos aminos del quitosano, una gran variedad de agentes químicos han sido utilizados para modificar el quitosano. Específicamente aldehídos, ácidos clorhídricos, anhídridos y epóxidos, llevando a cabo reacciones típicas de aminas, principalmente N-acilación y bases de Schiff. La variedad de moléculas que pueden reaccionar con el quitosano es muy grande. Estas moléculas le proveen funcionalidad específica, alterando sus propiedades biológicas o modificando propiedades físicas.

#### 1.4.2.1 Ejemplos de los conjugados enzimáticos y otros usos

El aprovechar las propiedades del biopolímero, en combinación con la actividad biológica de algunas macromoléculas, abre un nuevo horizonte en la biotecnología, mediante la formación de conjugados enzimáticos con características de interés para la industria como son una fácil recuperación del biocatalizador y estabilidad en ambientes extremos.

La inmovilización covalente de ureasa sobre membranas de quitosano, se realizó con fines terapéuticos con el objetivo de remover urea de la sangre en un riñón artificial, se utilizó glutaraldehído como agente inmovilizante y se estudiaron diferentes propiedades (Krajewska y col, 1989). Vazquez-Duhalt y col, (2001) conjugaron la enzima lacasa del hongo *Corioloopsis gallica* con quitosano, encontrando que el conjugado quitosano-lacasa

muestra un comportamiento de respuesta al pH, siendo soluble y activo en condiciones ácidas y exploraron la capacidad que tiene el conjugado de formar hidrogeles biocatalíticos mediante un entrecruzamiento. El conjugado hidrogel enzima puede ser utilizado para la detoxificación de aguas contaminadas con compuestos fenólicos de origen industrial (Arica, 2000). Este sistema está reportado con una lacasa inmovilizada de *Lentinula edodes* en quitosano entrecruzada con glutaraldehído, donde se observó una disminución de la toxicidad de los efluentes contaminados (D'Annibale y col, 2000). Una de las propiedades más interesantes de los polisacáridos en general es su capacidad de formar hidrogeles y películas. La formación de hidrogeles puede ocurrir por un diverso número de mecanismos y está fuertemente influenciado por los tipos de monosacáridos involucrados, al igual que la naturaleza de los grupos sustituyentes. La formación de hidrogeles a partir de polímeros usando fuerzas no covalentes, es un método utilizado en la industria por su uso potencial en el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos. El quitosano es un buen ejemplo de estos materiales con excelentes características de biocompatibilidad, biodegradabilidad y baja toxicidad, requerimientos para que pueda ser utilizado como un biomaterial. Adicionalmente, los grupos amino del quitosano al ser nucleofílicos y reactivos a pH altos, le permiten al quitosano ser entrecruzado para crear geles con diferentes propiedades (Roberts y Taylor, 1989). Diversos estudios se han centrado en investigar el efecto de agentes entrecruzantes para la formación de geles. Específicamente se ha estudiado el efecto de la variación de la hidrofobicidad del gel, la hidratación, la bioadhesión y la liberación de macromoléculas (Martin y col, 2002). Geles de quitosano con la enzima tirosinasa pueden convertir fenoles en quinonas electrofílicas que pueden reaccionar con la matriz (Payne y col, 1992; Sun y Payne, 1996). Debido a que la especificidad de sustrato de la tirosinasa confiere selectividad para la conversión y que la reacción de quitosano-tirosinasa

resulta en una interacción fuerte, este sistema puede ser utilizado eficientemente para remover contaminantes fenólicos.

Las propiedades del quitosano para formar películas, mediante un entrecruzamiento, se ve seriamente influenciada por las interacciones electrostáticas entre los aniones y el quitosano utilizando fosfatos multivalentes. Se compararon las características de hinchamiento del quitosano, para utilizarlo exitosamente en la liberación de fármacos (Shu y Zhu, 2002). Las enzimas pueden ser atrapadas o incorporadas covalentemente en geles poliméricos, para usarlos en catálisis selectivas para biotransformaciones, componentes funcionales de biosensores y en bioreactores terapéuticos (Novick y Dordick, 1998).

Tomando en cuenta las bondades que presenta el quitosano de ser un soporte ideal para diferentes aplicaciones, resulta interesante poder estudiar el comportamiento de conjugar a la enzima lacasa del hongo *Corioloopsis gallica* y la modificación hidrofóbica del sistema para mejorar la catálisis.

## **2 HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1 Hipótesis**

La modificación con carácter hidrofóbico de los conjugados biocatalíticos del polímero quitosano y la enzima lacasa mejora la catálisis en sistemas conteniendo solventes orgánicos.

### **2.2 Objetivo General**

Caracterizar el comportamiento fisicoquímico y cinético de los conjugados biocatalíticos de quitosano modificado hidrofóbicamente

#### **2.2.1 Objetivos Específicos**

- Estudiar la conjugación de la enzima lacasa en quitosano, mediante la activación de los grupos carboxilos de la enzima.
- Modificar hidrofóbicamente el conjugado quitosano-lacasa, con la adición covalente del polímero polietilén glicol.
- Caracterizar física y cinéticamente a los conjugados biocatalíticos.
- Estudiar el efecto de la actividad de agua en la catálisis de la enzima y los conjugados biocatalíticos, en un sistema conteniendo solventes orgánicos.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Reactivos y solventes

La cepa utilizada para la producción de enzima lacasa (*Corioloopsis gallica* UAMH 8260) fue donada por el profesor Michael A. Pickard de la Universidad de Alberta en Canadá. Los solventes utilizados etanol, metanol, isopropanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano, *tert*-butanol, butanol, diclorometano y éter etílico, fueron obtenidos de Fischer Scientific y J.T. Baker. Los reactivos quitosano (85% deacetilación), metoxipoliéterilén glicol PM 5000 (mPEG<sub>5000</sub>), polietilén glicol activado con cloruro cianúrico, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimida (ECD), ácido trinitrobenzen-sulfónico (TNBS), fluorescamina, 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS), siringaldazina, 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMPO), catecol y guayacol fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. Los reactivos acetato de sodio, fosfato de sodio (monobásico y dibásico) y carbonato de sodio fueron obtenidos de J.T. Baker.

#### 3.2 Producción y purificación de la enzima lacasa

El inóculo para la producción de la enzima lacasa del hongo *Corioloopsis gallica*, se preparó mediante la homogenización de 1 cm<sup>2</sup> de micelio con 50 ml de medio GMY (glucosa, extracto de malta y levadura). Después de 5 días de crecimiento a 29°C y 200 rpm, los cultivos fueron homogenizados nuevamente y aproximadamente 5 % del inóculo se utilizó para inocular el medio de producción, el cual consiste en 800 g de avena y 400 ml de buffer fosfatos 10 mM pH 6. Después de dos semanas a 28°C el medio sólido se extrajo con buffer fosfatos 10 mM pH 6 y se filtró con gasa fina para separar los restos de grano.

El extracto líquido conteniendo la enzima, se centrifugó por 15 minutos a 10,000 g y el sobrenadante se filtró en membranas Whatman GF/C 1.2  $\mu\text{m}$ , la solución se precipitó con sulfato de amonio, se concentró y dializó mediante ultrafiltración (Amicon PM-30). El extracto enzimático se pasó por una columna de intercambio aniónico (DE-52 celulosa) y la enzima se eluyó con un gradiente de NaCl, las fracciones que mostraron actividad lacasa se concentraron y se pasaron por una columna de filtración en gel (Sephadex G-100) y finalmente por una columna de intercambio aniónico (Columna High Q). Se obtuvo una preparación final de lacasa de 120 U/mg.

### 3.3 Determinación de actividad lacasa

La actividad lacasa se determinó colorimétricamente utilizando principalmente como sustrato ABTS 0.5 mM en buffer acetatos 60 mM pH 4.5 a 25°C, con una  $\lambda=436$  nm y  $\epsilon=29,300$  M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Una unidad enzimática de lacasa se define como 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato oxidado/minuto a 25°C. Las velocidades de las reacciones catalizadas por la lacasa, se midieron con la aparición de producto en un espectrofotómetro BECKAM DU®650. Los sustratos utilizados, la longitud de onda ( $\lambda$ ) y el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ), se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Detección espectrofotométrica de actividad lacasa

Sustrato	$\lambda$ (nm)	$\epsilon$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )
ABTS	436	29 300
Siringaldazina	530	64 000
2,6-DMPO	468	14 800
Guayacol	470	26 600
Catecol	388	1 300

### 3.4 Caracterización reológica de quitosano

La caracterización reológica del quitosano se llevo a cabo en un reómetro Contraves-Rheomat 120 con un dispositivo cilíndrico (DIN 1-15). Debido a que en estos experimentos se requiere de un volumen mínimo de 15 ml, solo se caracterizó al quitosano y quitosano modificado con polietilén glicol aldehído, con el objetivo de conocer que tipo de fluido es el quitosano y si la modificación química la confiere nuevas características. El reómetro es un torquímetro con la capacidad de medir viscosidad ( $\eta$ ). La viscosidad es la resistencia que un material opone cuando se intenta deformarlo. Físicamente es el cociente entre el esfuerzo de corte ( $\tau$ ) aplicado sobre un fluido y el gradiente de deformación ( $\dot{\gamma}$ ) generado. De forma general, los fluidos se pueden clasificar en dos grandes grupos de acuerdo con el comportamiento de la viscosidad: newtonianos y no-newtonianos. Los fluidos newtonianos son aquellos que presentan una viscosidad constante como función del gradiente de deformación. Los fluidos en los que la viscosidad varía con el gradiente de deformación son denominados no-newtonianos (Fig 7).

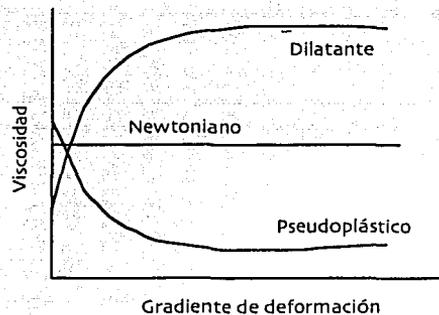


Figura 7. Comportamiento de los fluidos en función de la viscosidad

De forma paralela se prepararon diferentes soluciones de quitosano a diferentes pH (3-6) y se midió la viscosidad en 500  $\mu$ l del fluido en un viscosímetro de cono y plato a 60 rpm. Para obtener la viscosidad en centipoises (Cp), se multiplicó la lectura obtenida de la medición en % por 1.55, el cual es un factor que depende de la geometría del viscosímetro y es proporcionado por el fabricante.

### 3.5 Condiciones óptimas de la producción de conjugados biocatalíticos: quitosano-lacasa

Para realizar el conjugado biocatalítico, se llevó a cabo una unión covalente. Considerando que la enzima lacasa presenta una abundancia de grupos carboxilos en su exterior, se propone su activación para que puedan reaccionar con los grupos aminos del quitosano. Un método muy utilizado para la activación de los grupos carboxilos de proteínas se lleva a cabo con carbodimida (Fig.8).

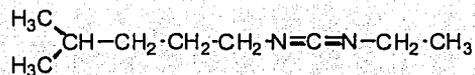


Fig 8. Estructura de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimida

El conjugado quitosano-lacasa (conjugado QL) se realizó mediante la unión covalente de lacasa purificada del hongo *C. gallica* (11 U) a quitosano 2 % (1 ml) con un radio molar de monómero de glucosamina/proteína de 60,000 y un exceso molar de carbodimida (ECD) de 400 sobre los carboxilos de la proteína. Se dejó reaccionar por 2 hrs a 4°C a pH 5. Posteriormente el pH se incrementó a 8 adicionando 10 volúmenes de buffer fosfatos 60 mM pH 8, formándose un precipitado (conjugado QL) el cual se separó mediante centrifugación 5000 rpm por 5min. El conjugado QL se lavó tres veces en secuencias de solubilización-

precipitación (con el objetivo de separar la enzima que no se unió covalentemente) y finalmente el conjugado QL se disolvió en buffer fosfatos 60 mM pH 4.5.

### 3.6 Modificación hidrofóbica del conjugado biocatalítico

La modificación hidrofóbica del conjugado biocatalítico, se basa en explotar la funcionalidad amino del quitosano. El principio de la modificación es, que el grupo funcional (aldehído o cloruro cianúrico) del PEG activado, reaccione con el grupo amino del quitosano.

Para llevar a cabo la modificación hidrofóbica del conjugado QL, fue necesario realizar primero la síntesis del PEG activado con aldehído, el cual se sintetizó de acuerdo a dos procedimientos distintos. Paralelamente se realizó una modificación del conjugado QL con PEG activado con cloruro cianúrico (conjugado QLP).

#### 3.6.1 Síntesis de polietilén glicol activado con aldehído.

a) El primer procedimiento se basó en la adición de mPEG<sub>5000</sub> (1.0 mmol) a 0.41 g de anhídrido acético en dimetilsulfóxido (20 ml) y una agitación por 30 hrs, a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se precipitó adicionándola a éter etílico frío (100 ml) y dejando reposar un día. El precipitado se resuspendió en diclorometano (25 ml) y el proceso de precipitación-resuspensión se repitió 2 veces. Finalmente se dejó secar hasta obtener un polvo (Harris y col, 1984).

b) El segundo procedimiento consistió en adicionar gota a gota una solución de dimetilsulfóxido (48 mmol en 5 ml de cloruro de metileno) a una solución de cloruro de oxalil (22 mmol en 25 ml de cloruro de metileno), esta reacción se llevó a cabo a -78°C. Después de 10 minutos se adiciona mPEG<sub>5000</sub> (10 mmol en 20 ml de cloruro de metileno), la reacción se mantiene a -20°C por 1 hr. Posteriormente se adiciona 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (50

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

mmol) y el medio de reacción se calentó a temperatura ambiente. A la mezcla de reacción se le adicionó 50 ml de agua y se realizó una extracción con cloruro de metileno, seguida de una precipitación con éter etílico. El precipitado fue filtrado y secado al vacío por 24 hrs (Wirth y col, 1991).

### **3.6.2 Modificación del conjugado biocatalítico con polietilén glicol activado con aldehído**

La modificación hidrofóbica se llevó a cabo mediante la adición de PEG-CHO (8.5  $\mu$ moles) al conjugado QL (15 ml), se incrementó el pH a 6 con buffer fosfatos 60 mM pH 6 y se adicionó  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  (67  $\mu$ moles). La mezcla se dejó reaccionando 12 hrs a 4°C. El conjugado QLP se lavó con buffer acetatos 60 mM pH 4.5 y se concentró mediante ultrafiltración (Amicon PM-30).

### **3.6.3 Modificación del conjugado biocatalítico con polietilén glicol activado con cloruro cianúrico**

Se realizó una modificación al conjugado QL con PEG activado con cloruro cianúrico comercial. La modificación hidrofóbica se llevó a cabo mediante la adición de PEG activado con cloruro cianúrico (8.5  $\mu$ moles) al conjugado QL. Se incrementó el pH a 8 con buffer carbonatos 100 mM pH 8 y se dejó reaccionar 1 hr a 4°C. El conjugado QLP se lavó con buffer acetatos 60 mM pH 4.5 y se concentró mediante ultrafiltración (Amicon PM-30).

### **3.7 Determinación del grado de modificación del polietilén glicol aldehído**

Con el objetivo de conocer el grado de modificación que sufrió el PEG con la activación, se determinó la presencia de los grupos aldehídos presentes en el PEG activado de manera cualitativa y cuantitativa mediante diferentes métodos.

a) Con la formación de una base de Schiff, la reacción produce una coloración rosa en presencia de aldehído. La absorbancia se mide a 560 nm. La reacción a temperatura ambiente desarrolla un color máximo aproximadamente en 15 minutos. El reactivo de Schiff contiene metabisulfito de sodio, *p*-rosanilina y HCl (Furniss y col, 1989).

b) Mediante la reacción del aldehído (0.05–0.1 g PEG-CHO) con 2,4-dinitrofenilhidrazina (3 ml), la cual se oxida a nitrofenilhidrazona. Se observa una precipitación cristalina característica, que indica la presencia de aldehídos en un tiempo máximo de 10 min (Furniss y col, 1989).

c) La titulación con tiosulfato de sodio, el cual es un método indirecto en base a  $\text{NaBH}_4$ , que reacciona con los grupos aldehídos.

d) Un método espectrofotométrico muy utilizado para obtener información de la naturaleza química de determinado compuesto, es el infrarrojo (IR). Una banda característica para aldehídos se muestra aproximadamente a  $1750 \text{ cm}^{-1}$ . Se utilizó 2 mg de PEG sin activar como control y PEG-CHO.

### 3.8 Determinación del grado de modificación hidrofóbica del conjugado biocatalítico

Debido a la presencia característica de grupos aminos en el quitosano, es posible determinar el grado de modificación del conjugado biocatalítico. Esto se debe a que los grupos funcionales activos en el PEG (aldehído y cloruro cianúrico), reaccionan con los grupos aminos del quitosano como se explicó en la sección 3.6, por lo que se pueden determinar los grupos aminos que quedan libres sin reaccionar. Dos métodos muy usados para la determinación de aminos libres fueron utilizados, el primero fue con el reactivo ácido trinitro bencen-sulfónico (Habeeb, 1966) y el segundo con fluorescamina (Stein y col, 1972).

a) El ácido trinitro bencen-sulfónico (TNBS), reacciona con los grupos aminos del quitosano y se mide la absorción de este sistema a 420 nm (Habeeb, 1966). La mezcla de reacción contiene 150  $\mu\text{l}$  de quitosano o quitosano modificado con PEG, 150  $\mu\text{l}$  de  $\text{NaHCO}_3$  al 4% y 150  $\mu\text{l}$  de TNBS al 0.1%. Después de 2 hrs de reacción a 40°C, la reacción se terminó con la adición de 150  $\mu\text{l}$  de SDS y 75  $\mu\text{l}$  de HCl 1.0 N. Se midió la absorbancia a 420 nm y el porcentaje de aminos modificados se calculó de la siguiente forma:

$$\% \text{ modificación} = \left( 1 - \frac{\text{Abs quitosano modificado}}{\text{Abs quitosano no modificado}} \right) \quad (1)$$

b) Se realizaron soluciones de quitosano sin modificar y modificado con PEG activado a diferentes concentraciones (0-0.1 mg/ml) a las cuales se les adicionó 500  $\mu\text{l}$  de fluorescamina (0.3 mg/ml en acetona) y se dejó reaccionar por 10 minutos. La fluorescencia se mide en un espectrofluorómetro con una  $\lambda_{em}=475$  nm y una  $\lambda_{ex}=390$  nm. La fluorescamina, reacciona con aminos primarios para formar fluoróforos. La fluorescencia resultante es proporcional a la concentración de aminos primarios (Stein y col, 1972).

### 3.9 Determinación de los perfiles de actividad en función de: pH, temperatura y solvente orgánico

Se realizó el perfil de actividad en función de pH en un rango de (1-12). La enzima libre al igual que los conjugados QL y QLP se disolvieron en buffer acetatos, fosfatos ó carbonatos 200 mM, según el caso. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 1ml con ABTS 50 mM.

El perfil de actividad de la enzima libre y los conjugados QL y QLP en función de la temperatura, se realizó en un intervalo de 20 a 80°C. Se comparó la actividad residual de la

enzima libre y los conjugados QL y QLP. La temperatura requerida para realizar el perfil de actividad, se logró con un control peltier de temperatura que está adaptado al espectrofotómetro.

Se determinó el perfil de actividad en función de la concentración de solvente orgánico de la enzima libre y conjugados QL y QLP, utilizando metanol, etanol, isopropanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano. El intervalo de solvente orgánico es de 0-80%, en un volumen final de reacción de 1 ml con ABTS 50 mM.

### **3.10 Estabilidad de los conjugados biocatalíticos modificado hidrofóticamente a: pH extremos, temperaturas y solvente orgánico**

La estabilidad de la enzima libre y de los conjugados QL y QLP se realizó en un intervalo de pH de (1-12). La enzima libre al igual que los conjugados QL y QLP se incubaron en buffer acetatos, fosfatos ó carbonatos 200 mM según el caso, a diferentes tiempos (0-60 min). La actividad lacasa se midió a pH 4.5 y 25°C.

Se comparó la estabilidad a temperatura de la enzima libre con los conjugados QL y QLP en un intervalo de 30 a 70°C. Tanto la enzima libre como los conjugados se incubaron en ausencia de sustrato a diferentes temperaturas por 1 hr. La estabilidad térmica de la enzima libre y los conjugados QL y QLP se determinó midiendo la actividad residual a pH 4.5 y 25°C.

La estabilidad a solvente orgánico de la enzima y de los conjugados QL y QLP se determinó con acetonitrilo, etanol y tetrahidrofurano en un intervalo de 0-90%. La incubación fue por 1hr y se midió la actividad residual a pH 4.5 y 25°C.

### 3.11 Ensayo de solubilidad de los conjugados modificados hidrofóbicamente en solventes orgánicos

Los solventes orgánicos propuestos para comparar la solubilidad del quitosano sin modificar y el quitosano modificado con PEG activado fueron: etanol, metanol, isopropanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano. Al modificar el quitosano con el PEG activado se espera una mayor solubilidad del conjugado debido a las propiedades características del PEG de proveer al sistema solubilidad y termoestabilidad. Se probaron diferentes métodos para poder medir la solubilidad del conjugado QLP.

a) Se pensó en la viscosidad como parámetro para medir de forma indirecta la solubilidad del quitosano y quitosano modificado. Esto se llevó a cabo en un viscosímetro Wells-Brookfield de cono y plato. Tanto el quitosano como el quitosano modificado se mezclaron con diferentes proporciones de solvente orgánico (0-80%). Los cálculos se realizaron como se describe en la sección 3.4.

Los siguientes métodos, se basaron en precipitar el quitosano y quitosano modificado a diferentes proporciones de solvente orgánico. Como se espera, una determinada cantidad de quitosano precipita conforme aumenta el porcentaje de solvente orgánico, así pues la parte soluble de este sistema contendrá el quitosano que no precipitó. La cantidad de quitosano soluble disminuirá conforme se aumenta el porcentaje de solvente orgánico. En la parte soluble del sistema es donde se llevó a cabo las determinaciones de azúcares reductores, carbono orgánico total y fluorescamina.

b) Otra forma indirecta de medir la solubilidad del quitosano y del quitosano modificado es mediante la cuantificación de azúcares reductores. Muestras de quitosano y quitosano modificado (0.1 mg/ml) se les adicionó diferentes concentraciones de solvente

orgánico (0–80%), esta mezcla se centrifugó a 10 000 g por 10 min. Del sobrenadante se tomó una alícuota y se secó en una microcentrífuga al vacío a 45°C (SAVANT) por 4 hrs aproximadamente. Posteriormente esta película seca se disolvió en agua y se llevó a cabo una depolimerización con 100 µl de NaNO<sub>2</sub> (20 mg/ml) y 100 µl de HCl 500 mM en un volumen final de 1 ml. La muestra ya depolimerizada reaccionó con 500 µl de ácido dinitrosalicílico (DNS) en ebullición por 5 min y se detuvo la reacción mediante una incubación en hielo por 5 min. Se midió la absorbancia a 540 nm, sobre una curva estándar de glucosamina. De esta forma se determinó cuantos residuos de glucosamina se tenían en el control (cuando no hay solvente orgánico) y se determinó la disminución de residuos de glucosamina conforme va aumentando el % de solvente orgánico.

c) Otra forma de poder comparar la solubilidad del quitosano y el quitosano modificado consiste en la cuantificación de carbono orgánico total en la muestra (mg/L). Esto se realizó en el Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA), mediante la metodología IMTA CAPT6-1.1-2001.

d) El último método estudiado para determinar la solubilidad fue con la fluorescamina. Se siguió el mismo procedimiento con la técnica de azúcares reductores, hasta el punto de tomar la alícuota de la parte soluble del sistema. Posteriormente se siguió el mismo procedimiento que el descrito en 3.8 b. Con la determinación de aminos libres se puede relacionar cuantas unidades de glucosamina hay en el sistema sin modificar y modificado, y cual es su comportamiento al aumentar la proporción de solvente orgánico.

### 3.12 Determinación de actividad residual en solvente orgánico a diferentes $a_w$

La actividad de agua ( $a_w$ ) del sistema se equilibró en recipientes de vidrio sellados herméticamente a 25°C. El sistema contenía soluciones control de sales saturadas con determinada  $a_w$  (Tabla 4), la cual fue medida en el equipo AW SPRINT NOVASINA. Los solventes utilizados fueron etanol, isopropanol, butanol y *tert*-butanol. La  $a_w$  se equilibró después de 3 días de incubación. La actividad residual se midió mediante la aparición de producto con siringaldazina (Tabla 3).

Tabla 4. Actividad de agua de soluciones de sales saturadas (Svensson y col, 1994)

Sal saturada	$a_w$
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.92
NaCl	0.73
MgCl <sub>2</sub>	0.32
LiCl	0.11

### 3.13 Determinación de los parámetros cinéticos con diferentes sustratos

Se determinaron las constantes cinéticas de la enzima y de los conjugados biocatalíticos a 25°C. Los sustratos utilizados fueron ABTS, siringaldazina y 2,6-DMPO con una  $a_w = 0.73$ , en etanol. Las velocidades iniciales se midieron con la aparición de producto a 25°C. El sistema utilizado para equilibrar la actividad de agua es el descrito en la sección 3.12. El ajuste de los datos se realizó mediante el programa Enz-Fitter.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Caracterización reológica de quitosano

Las propiedades reológicas del quitosano se evaluaron, midiendo la viscosidad y el esfuerzo de corte de soluciones de quitosano sin modificar y soluciones de quitosano modificado con PEG-CHO a diferentes gradientes de deformación. Como se observa en la Figura 9, el quitosano presenta una disminución en la viscosidad conforme aumenta el gradiente de deformación, lo cual es un comportamiento característico de los fluidos pseudoplásticos (Nuñez y col, 2001). El polímero modificado hidrofóbicamente presenta el mismo comportamiento que el polímero no modificado. Incluso las diferentes modificaciones de quitosano con PEG (relación en peso 1:1, 1:2), mostraron un comportamiento idéntico al quitosano modificado con una Rel 1:0.5 (datos no presentados).

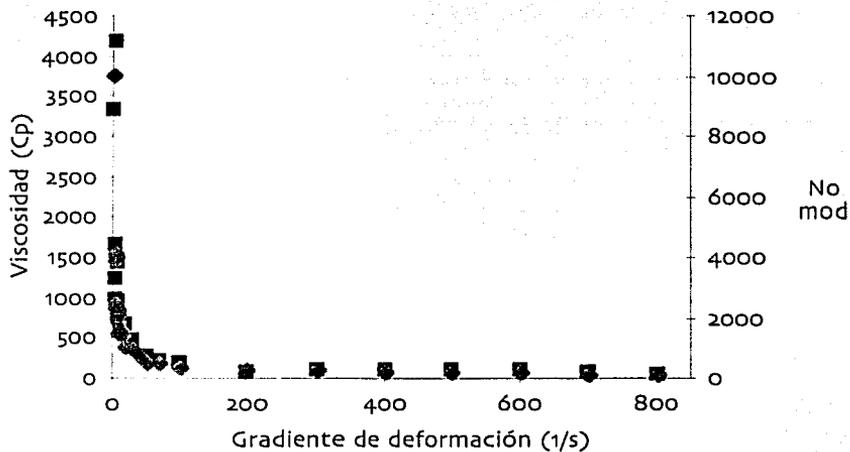


Figura 9. Reograma de quitosano y quitosano modificado con polietilén glicol aldehído. Quitosano no modificado (◆), quitosano modificado Rel 1:0.5 (■).

El comportamiento reológico de ciertos fluidos no-newtonianos se puede representar con una ecuación general denominada ley de la potencia:

$$\tau = \kappa \dot{\gamma}^n \quad (2)$$

Donde  $\kappa$  y  $n$  son constantes;  $\kappa$  se ha denominado índice de consistencia y  $n$  índice de comportamiento de flujo. Este último constituye una medida del grado de desviación del comportamiento newtoniano. Si  $n=1$  el fluido es newtoniano, si  $n<1$  el fluido es pseudoplástico y si  $n>1$  es dilatante. La función logarítmica de esta ecuación (3), parece ajustar la curva característica de los fluidos pseudoplásticos, donde la ordenada en el origen es el  $\log \kappa$  y la pendiente es igual a  $n-1$  (Nuñez y col, 2001).

$$\log \eta = \log \kappa + (n-1) \log \dot{\gamma} \quad (3)$$

Aplicando la ley de la potencia a nuestro sistema, se graficó el log del gradiente de deformación contra el log de la viscosidad, y se calcularon las pendientes ( $n-1$ ). Se determinó que tanto el quitosano no modificado como el quitosano modificado con PEG-CHO son fluidos pseudoplásticos, debido a que el índice de consistencia  $n<1$  (Tabla 8).

Tabla 8. Valores del índice de consistencia de quitosano y quitosano modificado

Quitosano	Indice de consistencia (n)
No modificado	0.65
Modificado/PEG-CHO Rel 1:0.5	0.61
Modificado/PEG-CHO Rel 1:1	0.61
Modificado/PEG-CHO Rel1:2	0.62

Las propiedades fisicoquímicas del quitosano están gobernadas por diferentes factores como son: pH, temperatura, fuerza iónica, grado de acetilación y concentración del polímero (Nyström y col, 1999). La variación del pH sobre el quitosano es de fundamental importancia en la solubilidad del polímero, esto es debido a su naturaleza policatiónica. El polímero se encuentra cargado positivamente a  $\text{pH} < 6$ , y es soluble en ácidos como el acético y fórmico (Majeti y Kumar, 2000). Sin embargo a pH neutro el polímero pierde su carga, reflejándose en la pérdida de solubilidad, mediante una precipitación. Con el objetivo de determinar la viscosidad del quitosano a diferentes pH, se utilizó una solución de quitosano con una concentración de 3.6% (p/v). Se puede observar en la Figura 10, que al incrementar el pH de la solución de quitosano, la viscosidad aumenta hasta que el polímero presenta una precipitación. Estos resultados corroboran que el pH tiene un efecto importante e interesante sobre la solubilidad del polímero, siendo un parámetro altamente manipulable cuando el polímero se utilice como un soporte para formar conjugados biocatalíticos.

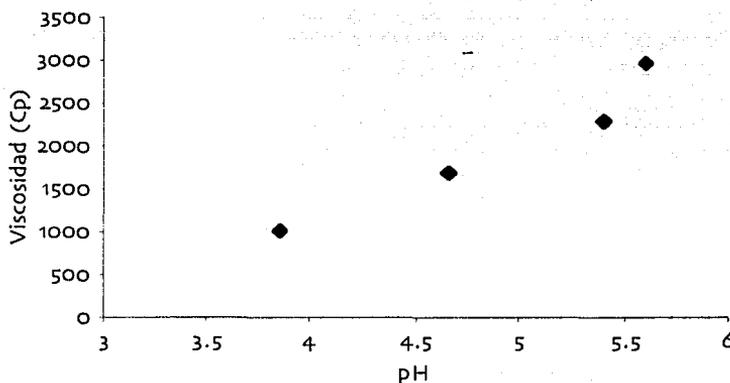


Figura 10. Perfil de viscosidad de quitosano a diferentes pH



Tabla 9. Porcentaje de enzima inmovilizada con diferentes radios de glucosamina/proteína y excesos de carbodimida/proteína

Glucosamina/proteína	Carbodimida/proteína	% enzima inmovilizada
<i>Temperatura: 25°C</i>		
30 000	5 000	0.5
	20 000	3.3
	50 000	2.8
60 000	20 000	11.3
90 000	20 000	6.9
<i>Temperatura: 4°C</i>		
60 000	20 000	56.7

#### 4.3 Modificación hidrofóbica del conjugado biocatalítico

El conjugado biocatalítico se modificó químicamente con PEG<sub>5000</sub>, (conjugado QLP), mediante el método descrito en materiales y métodos. Como hemos mencionado, la modificación hidrofóbica del conjugado biocatalítico, se basa en explotar la funcionalidad amino del quitosano. Considerando lo anterior, el principio de la modificación se basa en que el grupo funcional del PEG activado (aldehído o cloruro cianúrico), reaccione con el grupo amino del quitosano. El grado de modificación del conjugado biocatalítico se estimó mediante la titulación de los grupos aminos libres del quitosano, con la técnica de ácido trinitrobencensulfónico (TNBS) y fluorescamina. A pesar de que el TNBS es el ensayo más utilizado para la determinación de aminos primarios, la fluorescamina presenta ventajas importantes sobre el TNBS. Requiere pequeñas cantidades de proteínas en el orden de  $\mu\text{g}$ , es altamente reproducible y no requiere de la eliminación del PEG que no reaccionó (Stocks y col, 1986). Debido a que el quitosano está 85% deacetilado, consideramos que hay un 85% de aminos libres en la molécula que son susceptibles de ser modificados. La formación del conjugado QL involucra, que el 19% de los aminos libres del quitosano estén ocupados por la enzima. Por lo tanto, se encuentran disponibles un 66% de aminos para que sean modificados por el PEG

activado. De esta forma, se estimó que la modificación hidrofóbica fue responsable que el 31% de aminos del quitosano estuvieran ocupados. Los resultados indicaron que el 50% de los grupos amino libres del polímero fueron modificados por la enzima y el PEG (Tabla 10).

Tabla 10. Grado de modificación del conjugado biocatalítico

Conjugado	% aminos modificados
Quitosano Lacasa	19
Quitosano Lacasa PEG	50

#### 4.4 Perfiles de actividad de los conjugados a pH, temperatura y solvente orgánico

Con el objetivo de conocer si la inmovilización de la enzima y la modificación hidrofóbica del conjugado mostraba mejores cualidades que la enzima libre, se caracterizaron a los conjugados QL y QLP mediante perfiles de actividad a diferentes pH, temperatura y concentración de solvente orgánico.

Se sabe que la especificidad del sustrato y la afinidad de la lacasa varía con cambios en el pH. Para sustratos donde la oxidación no involucra un intercambio de protones (como la ferrocianina), la actividad lacasa disminuye al aumentar el pH y para sustratos donde la oxidación involucra un intercambio de protones (2,6-DMPO), el perfil de actividad de pH exhibe un valor óptimo de pH que depende más de la lacasa que del sustrato (Fig 12). La diferencia del perfil de actividad de pH se debe en principio a dos efectos opuestos: el primero es generado por la diferencia del potencial redox entre un sustrato y el Cu tipo T1 de la lacasa (lo cual se correlaciona con la velocidad de transferencia de electrones y es favorecida para sustratos fenólicos a pH altos). El segundo efecto es el enlace de un grupo hidroxil al Cu tipo T2/T3 de la lacasa (el cual inhibe la actividad a pH altos). El balance de estos dos efectos opuestos, puede jugar un papel importante en el perfil de pH de las lacasas

(Xu y col, 1997). Adicionalmente, las lacasas pueden ser inhibidas por diferentes agentes: azidas, cianuros y enlaces de grupos hidroxil al cluster trinuclear. Se han estudiado diversos inhibidores de las lacasas, principalmente compuestos capaces de formar complejos de cobre estables como: ditiotreitól (DDT), ácido tioglicólico (TGA), cisteína, ácido dietilditiocarbámico (DDC), EDTA, fluoruro de sodio y azida de sodio (Johannes y Majcherczyk, 2000). Otra forma de inhibición, es la pérdida de los cobres interrumpiendo la transferencia interna de electrones.

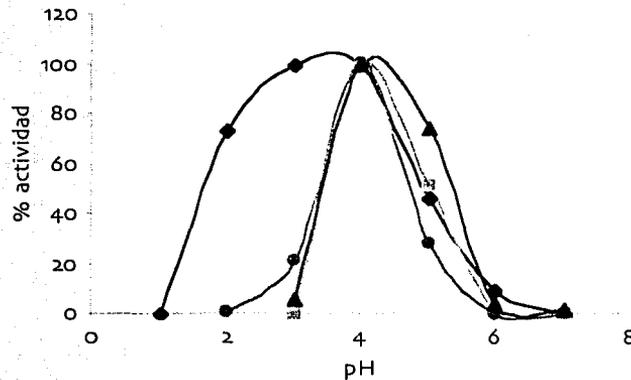


Figura 12. Perfil de actividad contra pH de la enzima lacasa en diferentes sustratos. ABTS (◆), siringaldazina (■), 2,6-DMPO (●), catecol (▲).

El perfil de actividad contra pH de la enzima libre y de los conjugados QL y QLP se ensayaron con ABTS como sustrato. Tanto el conjugado QL como el conjugado QLP, tienen un comportamiento muy parecido al de la enzima libre (Fig 13). Donde el pH óptimo de la enzima es aproximadamente 4. Estos resultados indican que el conjugar la enzima con el quitosano, no afecta en el perfil de actividad contra pH. De la misma forma, la modificación hidrofóbica presenta un perfil muy parecido al de la enzima libre. Resultados similares han

sido reportados por D'Annibale y col, (2000) y Vazquez-Duhalt y col, (2001) quienes utilizaron quitosano como soporte para inmovilizar lacasas y no observan un cambio en el perfil de actividad contra pH de la enzima libre y cuando es inmovilizada en el soporte.

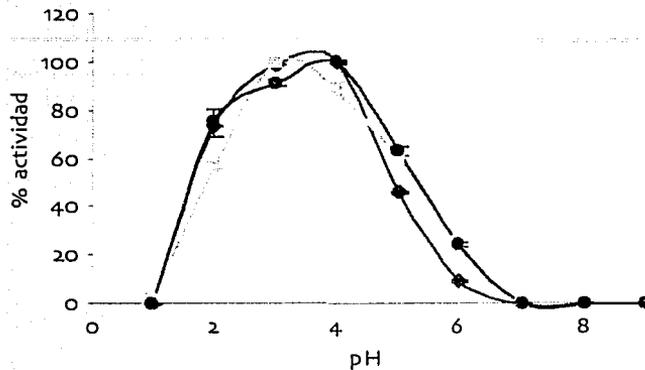


Figura 13. Perfil de pH de la enzima libre y conjugados con ABTS como sustrato. Enzima (◆), conjugado QL (⊞), conjugado QLP (●).

En cuanto al perfil de actividad contra temperatura, este se realizó en un rango de 25 a 85°C. Como se puede observar en la Figura 14, el perfil de temperatura de los conjugados no cambia significativamente en comparación a la enzima libre. Esto significa que la inmovilización al igual que la modificación hidrofóbica no altera el perfil de actividad característico de la enzima. Se encontró que la enzima libre tiene una temperatura óptima entre 60 y 70°C. Resultados similares son reportados por Tinoco y col, (2001) y Vandertol-Vanier y col, (2002). Es importante hacer notar que a una temperatura de 85°C hay una actividad entre un 40 y 50% de la actividad máxima de la enzima libre y de los conjugados QL y QLP.

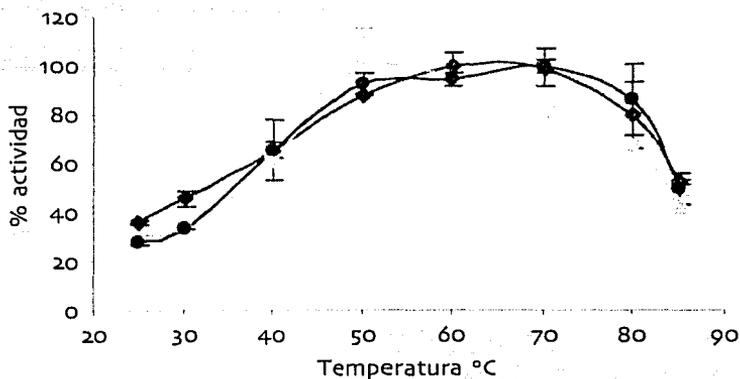


Figura 14. Perfil de temperatura de la enzima libre y conjugados. Enzima (◆), conjugado QL (■), conjugado QLP (●).

Las enzimas han sido utilizadas en medios no convencionales tales como solventes orgánicos (Dordick, 1989). Una de las principales razones de utilizar solventes orgánicos en el medio de reacción, es con el objetivo de mejorar la solubilidad de sustratos hidrofóbicos. En el caso de las lacasas la presencia de ciertas cantidades de solvente orgánico se requieren para la oxidación de sustratos, como los hidrocarburos polinucleoaromáticos (Pickard y col, 1999). Se determinó el efecto de la concentración de solvente orgánico (metanol, etanol, isopropanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano), sobre la actividad de la enzima libre, el conjugado QL y el conjugado QLP. No hay un cambio significativo en el perfil de la enzima libre y de los conjugados QL y QLP en metanol, hay una disminución en la actividad y a 80% de metanol no se detecta actividad en ninguna preparación. En presencia de etanol, el perfil de actividad de la enzima libre es similar al del conjugado QLP (Fig 15). Mientras que la enzima libre y el conjugado QLP muestran un 90% de actividad a 10% de etanol, el conjugado QL presenta una disminución de la actividad en un 50%. Al igual que con metanol, a un 80% de etanol no hay presencia de actividad en la enzima y los conjugados.

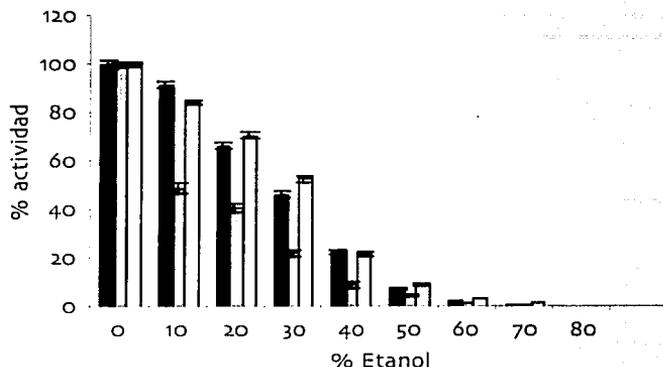


Figura 15. Perfil de actividad de la enzima libre y conjugados en etanol.  
Enzima (■), conjugado QL (▣), conjugado QLP (□).

Un comportamiento similar al del etanol se presentó en el perfil de actividad con isopropanol (Fig 16). A pesar de que a 10% de isopropanol el conjugado QL, presenta casi la misma actividad que la enzima libre y el conjugado QLP, a 20% de isopropanol el conjugado QL presenta una disminución del 20% en relación a la enzima libre y el conjugado QLP. Tanto la enzima libre como el conjugado QLP mantienen la misma actividad a diferentes concentraciones de isopropanol. En la Figura 17 se observa que a un 10% de acetonitrilo hay un incremento en la actividad de la enzima libre y los conjugados QL y QLP, en comparación con el control sin acetonitrilo. Se observa un incremento en la actividad del conjugado QLP de aproximadamente 80% en relación a la enzima libre a 10% de acetonitrilo. Se presenta un patrón similar del conjugado QLP en relación a la enzima libre y el conjugado QL, incluso a un 60% de acetonitrilo. Este comportamiento solo se presentó con el acetonitrilo, y hay que considerar que a bajas concentraciones de solvente orgánico, la solubilidad del sustrato puede aumentar reduciendo limitaciones de transferencia de masa. Pickard y col, (1999)

reportan que la transformación de antraceno por la enzima lacasa de *C. gallica* se lleva a cabo en 6 horas en un medio de reacción con 15% de acetonitrilo.

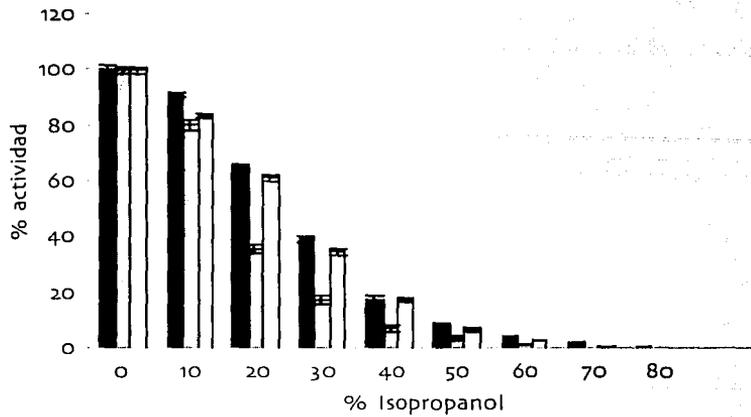


Figura 16. Perfil de actividad de la enzima libre y conjugados en isopropanol. Enzima (■), conjugado QL(▨), conjugado QLP (□).

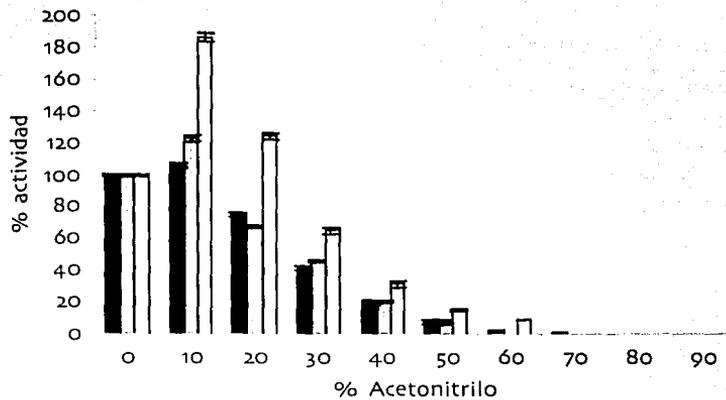


Figura 17. Perfil de actividad de la enzima libre y conjugados en acetonitrilo. Enzima (■), conjugado QL(▨), conjugado QLP (□).

LENS CON  
FALLA DE ORIGEN

Cuando se utiliza tetrahidrofurano se presenta una disminución en la actividad de la enzima y los conjugados (Fig 18). En general, la lacasa libre o inmovilizada, disminuye su actividad conforme aumenta la concentración de solvente orgánico ya que la flexibilidad de las proteínas se ve reducida, mientras que el agua actúa como lubricante, las moléculas de solvente orgánico no interactúan de la misma manera con la proteína ya que no tienen la misma capacidad que el agua de formar puentes de hidrógeno,

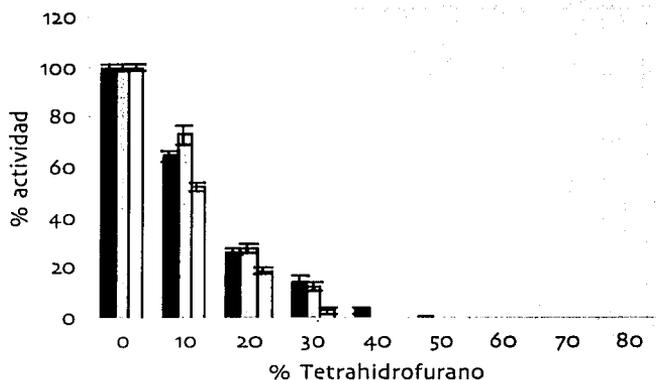


Figura 18. Perfil de actividad de la enzima libre y conjugados en tetrahidrofurano. Enzima (■), conjugado QL(▣), conjugado QLP (□).

#### 4.5 Estabilidad de los conjugados a pH, temperatura y solvente orgánico

El efecto de la inmovilización y la modificación sobre la estabilidad de la enzima se comparó mediante la exposición de la enzima libre y los conjugados a pH extremos. Se midió la actividad lacasa variando tiempos de incubación a diferentes pH. Se tenía referencia que la inmovilización de la lacasa sobre el quitosano mejora su estabilidad bajo condiciones extremas de pH (Vazquez-Duhalt y col, 2001).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Considerando lo anterior, se comparó si la modificación hidrofóbica sobre el conjugado QL aumentaba la estabilidad a pH extremos, la cual es conferida por la inmovilización covalente de la enzima en el quitosano. Como se muestra en la Figura 19, la enzima libre a pH 1 se desactiva completamente a los 40 min, mientras que el conjugado QL retiene un 30% de actividad y cuando se modifica hidrofóbicamente se duplica su estabilidad aproximadamente a un 60% de la actividad inicial.

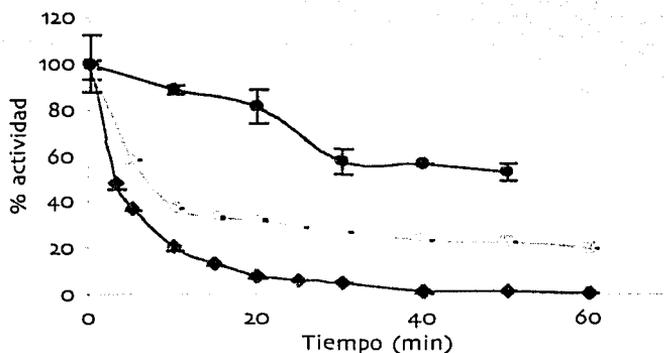


Figura 19. Estabilidad del conjugado biocatalítico a pH 1.  
Enzima (◆), conjugado QL (▣), conjugado QLP (●).

En la Figura 20, se observa que a pH 12, el conjugado QLP presenta una mayor estabilidad en comparación al conjugado QL y a la enzima libre (como también fue el caso a pH 1). Posiblemente esto puede ser debido a que la enzima al ser inmovilizada sobre el quitosano le confiera cierta protección sobre los grupos susceptibles de ser ionizados, y que el conjugado QLP al contar con las moléculas de PEG, le provean de una mayor protección, reflejándose en un ligero aumento de estabilidad en comparación con la enzima libre.

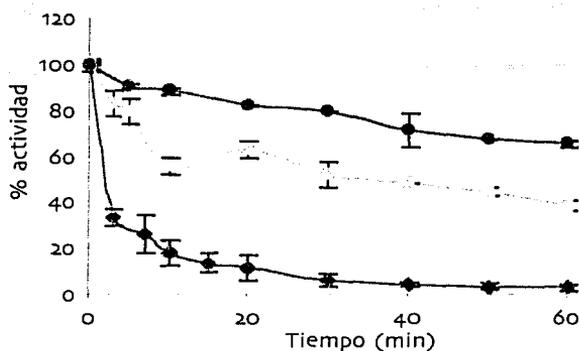


Figura 20. Estabilidad del conjugado biocatalítico a pH 12.  
Enzima (◆), conjugado QL (⊠), conjugado QLP (●).

Debido a que el quitosano se encuentra cargado positivamente a valores bajos de pH, el polisacárido es capaz de formar puentes salinos intramoleculares con grupos aniónicos de la proteína. Estas interacciones electrostáticas podrían proveer estabilidad a la enzima debido a que los puentes salinos intramoleculares son de hecho uno de los principales factores para mantener la conformación activa de las enzimas (Perutz, 1978). Vandertol-Vanier y colaboradores, (2002) reportan que la enzima lacasa del hongo *Corioloopsis gallica*, es estable por 5 días en un intervalo de pH de 5.5 a 9. De esta manera, encontramos que la enzima después de 60 min a pH 3 retiene un 80% de la actividad, mientras que el conjugado QL y el conjugado QLP son notablemente estables, manteniendo una actividad de 110 y 100% respectivamente. Un comportamiento similar se presenta cuando la enzima y los conjugados se incubaron por 60 min a pH 10. Estos resultados sugieren que la conjugación de la enzima y la modificación química del conjugado tiene un efecto favorable sobre la estabilidad de la enzima, en el intervalo de pH de 3 a 10.

En cuanto a la estabilidad a temperatura, la enzima libre al igual que los conjugados se incubaron a diferentes temperaturas (30-70°C), por 1 hr y se midió actividad lacasa a 25°C (Fig 21). Al parecer ni la inmovilización de la enzima, ni la modificación hidrofóbica del conjugado presenta una mayor estabilidad en comparación con la enzima libre. Estos resultados sugieren que la modificación hidrofóbica y la conjugación no tienen un efecto sobre la estabilidad de la enzima a temperatura. Vandertol-Vanier y colaboradores, (2002) reportan que la enzima es estable a 40°C por 1 día. Nosotros encontramos que la enzima libre es estable a 40°C, al igual que los conjugados QL y QLP.

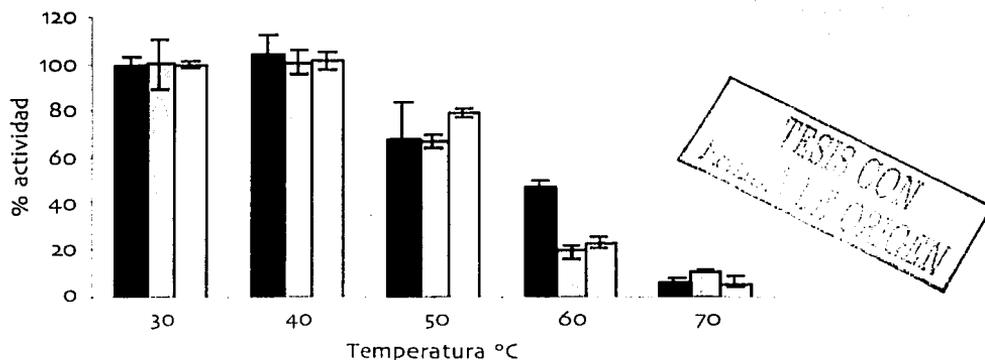


Figura 21. Actividad de la enzima libre y conjugado después de 1 hr de incubación a diferentes temperaturas. Enzima (■), conjugado QL(▨), conjugado QLP (□).

La estabilidad de la enzima en solvente orgánico se determinó a 1hr de incubación con diferentes concentraciones de solvente orgánico. La enzima libre presentó una marcada estabilidad en acetonitrilo por 1 hr, incluso a un 80% de acetonitrilo la enzima presenta un 100% de actividad (Fig 22). De la misma manera se realizaron ensayos para determinar la estabilidad en etanol, al igual que en acetonitrilo, la enzima muestra una buena estabilidad

después de 1 hr de incubación. A un 80% de etanol la enzima conserva un 70% de la actividad inicial. Comportamientos similares, se presentan cuando la enzima se incuba con metanol e isopropanol.

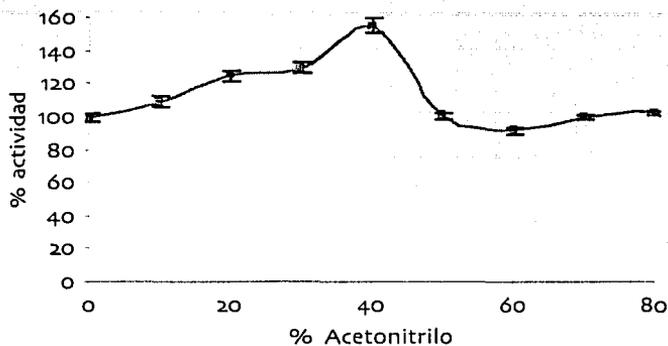


Fig 22. Actividad de la enzima libre en acetonitrilo después de 1 hr de incubación

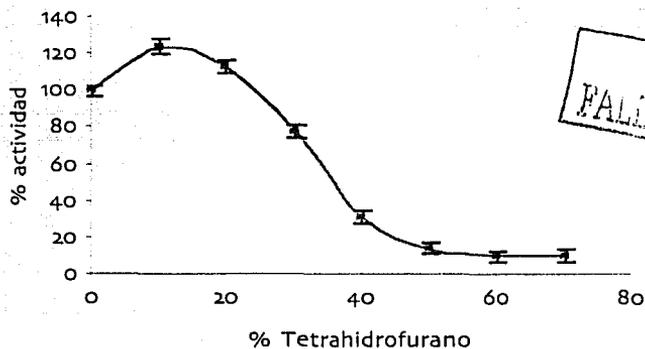


Fig 23. Actividad de la enzima libre en tetrahidrofurano después de 1 hr de incubación

Un efecto de pérdida de actividad de la enzima libre, se presenta cuando se incuba con tetrahidrofurano (Fig 23). Aproximadamente con un 40% de tetrahidrofurano, la enzima pierde el 70% de la actividad inicial. Finalmente la enzima pierde un 90% de su actividad, cuando se incuba por 1 hr en 70% de tetrahidrofurano. El tetrahidrofurano puede afectar la estabilidad de la enzima, rompiendo la estructura de la proteína interfiriendo con las interacciones hidrofóbicas por puentes de hidrógeno que son cruciales para mantener una estructura terciaria activa o removiendo la capa esencial de hidratación para la catálisis y el propio plegamiento. Considerando lo anterior, estudiamos el efecto de la inmovilización de la enzima y la modificación hidrofóbica del conjugado sobre la estabilidad en tetrahidrofurano (Fig 24). Estos resultados muestran que la enzima inmovilizada, al igual que el conjugado modificado hidrofóbicamente, presentan la misma estabilidad que la enzima libre a 1 hr de incubación. Incluso hasta un 70% de tetrahidrofurano, cuando se presenta aproximadamente un 20% de la actividad inicial.

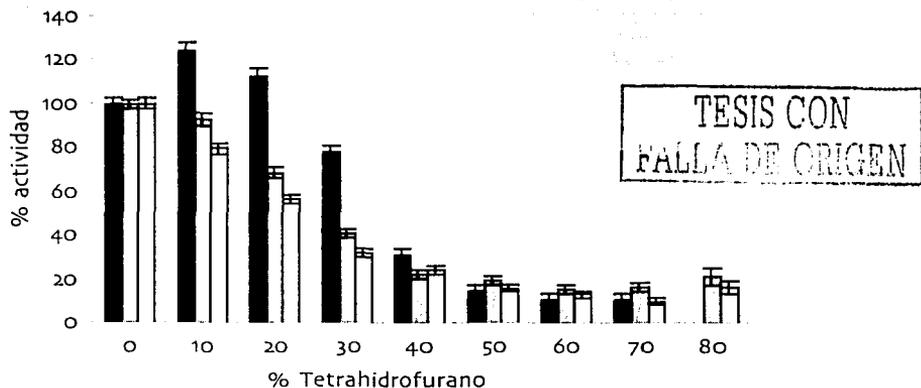


Fig 24. Estabilidad de la enzima libre y conjugados en tetrahidrofurano  
Enzima (■), conjugado QL(▨), conjugado QLP (□).

#### 4.6 Solubilidad del conjugado modificado hidrofóbicamente en solvente orgánico

Se probaron diferentes métodos para poder medir la solubilidad del quitosano y los conjugados. Finalmente el método que utilizamos fue la fluoescamina. Con la determinación de aminos libres, se puede relacionar cuantas unidades de glucosamina hay en el sistema (Quitosano, conjugado QL y conjugado QLP), y cual es su concentración en solución al aumentar el porcentaje de solvente orgánico. Se espera que una determinada cantidad de quitosano precipite conforme se aumente la concentración de solvente orgánico (0-80%). El quitosano que no precipitó, permanece en la parte soluble del sistema y es en esa fracción donde se lleva a cabo la determinación de unidades de glucosamina. Los resultados de solubilidad se presentan en términos de porciento de glucosamina. De esta manera el quitosano y los conjugados QL y QLP completamente solubles (sin la adición de solvente orgánico), contienen un 100% de unidades de glucosamina. Al aumentar la concentración de solvente orgánico, el sistema se hace menos soluble y la cantidad de residuos de glucosamina disminuye.

El quitosano mantiene su solubilidad en metanol hasta un 60%, al igual que en acetonitrilo (Figura 25 y 26). Sin embargo, cuando está en presencia de tetrahidrofurano hay una precipitación del quitosano, lo cual se ve reflejado en una disminución de unidades de glucosamina. A pesar que el quitosano es menos soluble en tetrahidrofurano, se observa que a un 80% de metanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano el quitosano presenta la misma tendencia, siendo prácticamente insoluble.

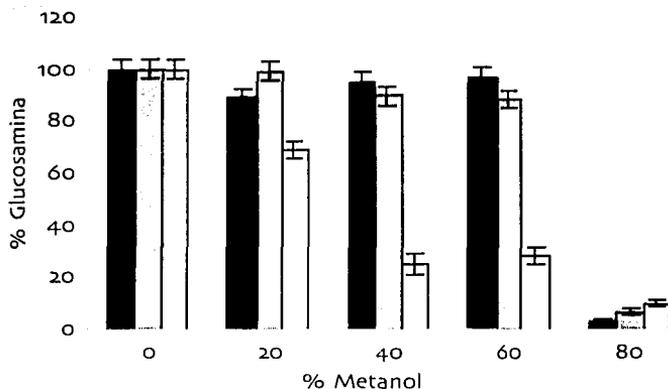


Figura 25. Solubilidad del quitosano y conjugados en metanol  
 Quitosano (■), conjugado QL(▨), conjugado QLP (□).

La modificación química con PEG se reporta frecuentemente como una buena estrategia para incrementar la solubilidad de enzimas y por lo tanto la actividad enzimática en solventes no polares (Inada y col, 1986). Sin embargo, los resultados muestran que bajo nuestras condiciones de modificación hidrofóbica con PEG no le confiere una mayor solubilidad al conjugado QLP en metanol (Fig 25), acetonitrilo (Fig 26) y tetrahydrofurano (Fig 27). Incluso hay una disminución de la solubilidad del conjugado QLP comparada con el quitosano.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

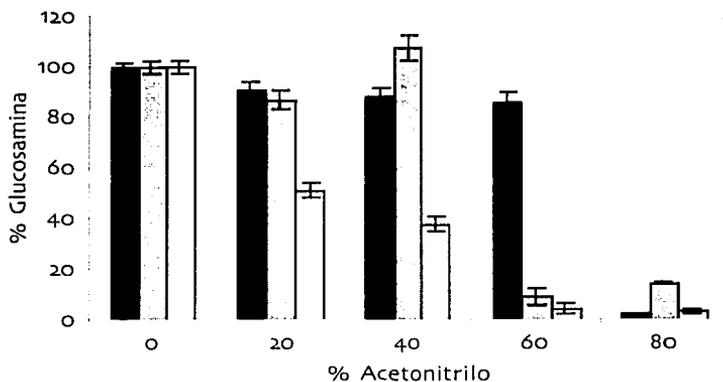


Figura 26. Solubilidad del quitosano y conjugados en acetonitrilo  
 Quitosano (■), conjugado QL(▨), conjugado QLP (□).

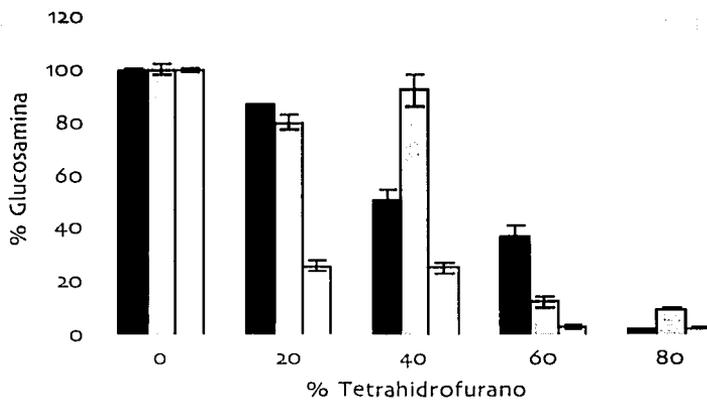


Figura 27. Solubilidad del quitosano y conjugados en tetrahidrofurano  
 Quitosano (■), conjugado QL(▨), conjugado QLP (□).

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

#### 4.7 Actividad en solventes orgánicos con baja actividad de agua

Como sabemos, el contenido de agua juega un papel esencial en la biocatálisis. Desde un punto de vista biotecnológico, hay numerosas razones para utilizar enzimas en sistemas que contienen solventes orgánicos (Gupta, 1992). Dentro de las razones principales, se encuentra que determinados sustratos son solubles en solventes orgánicos y además las enzimas pueden incrementar su termoestabilidad en estos sistemas. Muchas enzimas o complejos multienzimáticos incluyendo lipasas, esterases y deshidrogenasas usualmente inmovilizadas, funcionan en ambientes hidrofóbicos (Dordick, 1989). Las enzimas que se utilizan predominantemente en un medio orgánico, requieren una determinada cantidad de agua para tener actividad catalítica. Las enzimas tienden a conservar moléculas de agua necesarias para mantener su estructura funcional, con la ayuda de interacciones fuertes en sitios específicos con las moléculas de agua.

Para cuantificar la cantidad de agua presente en la mezcla de reacción, se utiliza el término de actividad de agua ( $a_w$ ), en lugar de concentración de agua. La  $a_w$  es de gran importancia para la velocidad de reacción y el equilibrio de la misma. Diversos autores tienen preferencias para la terminología de un sistema con bajo contenido de agua. Sin embargo Halling, (1994) argumenta que estrictamente hablando los sistemas con bajo contenido de agua se deben referir cuando la  $a_w$  es significativamente menor a 1. Reacciones enzimáticas con  $a_w$  controladas se desarrollaron inicialmente por Goderis y colaboradores, (1987). Existen diversas técnicas para controlar la  $a_w$  de una reacción. Una posibilidad es tener un sistema sellado herméticamente con una solución saturada de sal, y dentro la mezcla de reacción (enzima y sustrato) a una temperatura establecida. La sal absorbe o libera vapor de agua para mantener la actividad de agua constante.

El sistema utilizado para regular la  $a_w$  del sistema, se describe en la sección de materiales y métodos. La actividad de la enzima y los conjugados se determinó mediante la aparición de producto con siringaldazina. Se utilizaron cuatro soluciones salinas sobresaturadas para regular la actividad de agua. De las sales utilizadas: NaCl,  $MgCl_2$ , LiCl ( $a_w=0.73$ , 0.32 y 0.11 respectivamente), solo se detectó actividad catalítica con NaCl ( $a_w=0.73$ ). A pesar de que la estabilización de la  $a_w$  es lenta (aproximadamente 3 o 4 días), no pudimos estabilizar la actividad de agua con  $K_2SO_4$  ( $a_w=0.92$ ). Por lo que decidimos medir la capacidad de oxidar siringaldazina de la enzima y los conjugados, en un sistema con  $a_w=0.73$ , en solventes orgánicos (etanol, isopropanol, butanol y *tert*-butanol).

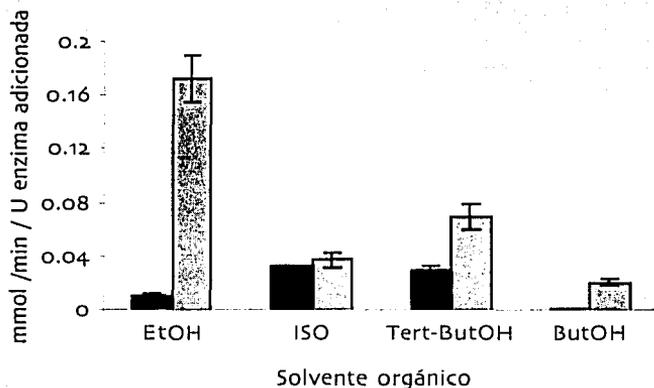


Figura 28. Velocidad de oxidación de siringaldazina en solvente orgánico con  $a_w=0.73$ . Enzima (■), conjugado QL(▨).

La Fig 33, muestra que el conjugado QL es más activo que la enzima libre en etanol, isopropanol, *tert*-butanol y butanol, cuando la actividad de agua se mantiene en 0.73. De los solventes orgánicos utilizados, el etanol presenta una diferencia significativa de actividad entre la enzima libre y el conjugado QL, comparada con isopropanol, butanol y *tert*-butanol.

Estudios previos muestran que la naturaleza anfifílica del PEG, puede participar en una mejora de la actividad enzimática en solvente orgánico (Inada y col, 1986 y García-Arellano y col, 2002). Sin embargo al ensayar esta reacción de oxidación con el conjugado modificado hidrofólicamente (conjugado QLP), se encontró que no presenta actividad en ninguno de los solventes orgánicos utilizados. Estos resultados demuestran que la modificación hidrofóbica con PEG no le confiere una mejora en la actividad en solventes orgánicos. Por lo que la determinación de los parámetros cinéticos solo se realizaron en la enzima y el conjugado QL.

#### 4.9 Determinación de los parámetros cinéticos

Las constantes cinéticas de la enzima libre y el conjugado QL, se determinaron para la oxidación de 3 sustratos diferentes: ABTS, siringaldazina y 2,6-DMPO. Utilizando como solvente al etanol y un sistema con una  $a_w=0.73$ . Se midieron las velocidades iniciales de oxidación con la enzima libre y el conjugado QL a diferentes concentraciones de los tres sustratos.

Tabla 11. Constantes cinéticas de la enzima libre y el conjugado QL en etanol, para la oxidación de ABTS, siringaldazina y 2,6-DMPO.

	ENZIMA			CONJ QL		
	kcat s <sup>-1</sup>	Km mM	kcat/Km mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	kcat s <sup>-1</sup>	Km mM	kcat/Km mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>
ABTS	0.06	0.62	10.36	0.014	1.32	0.011
2,6-DMPO	1.6	0.051	31.37	0.36	0.056	6.43
Siringaldazina	1.17	0.02	58.5	9.364	0.0064	1504.7

La Tabla 11, contiene las constantes cinéticas de la lacasa libre y del conjugado biocatalítico. Como se puede observar, la enzima libre tiene una mayor afinidad por siringaldazina, seguida de 2,6-DMPO y finalmente por el ABTS. Este comportamiento se repite en el caso del conjugado QL. Sin embargo para el caso del ABTS y 2,6-DMPO hay una reducción en la eficiencia catalítica del conjugado QL, comparado con la enzima libre. Un resultado interesante se presenta cuando se utiliza siringaldazina como sustrato, hay un aumento en la eficiencia catalítica en dos ordenes de magnitud del conjugado QL, con respecto a la enzima libre. La reducción de la  $K_m$  tiene como consecuencia un incremento notable en la eficiencia catalítica en el caso de la siringaldazina. Uno de los principales problemas que afectan la biocatálisis en medio orgánico es la partición favorable del sustrato hacia el solvente. Un aumento en la hidrofobicidad del biocatalizador, puede promover una mayor interacción del sustrato hidrofóbico con el sitio activo aumentando la eficiencia catalítica del mismo.

## 5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este proyecto se planteo el objetivo de estudiar las características que le confiere a la enzima lacasa, el inmovilizarla sobre el polímero natural quitosano, seguida de una modificación hidrofóbica. Dentro de los resultados obtenidos, se logró producir un conjugado QL, inmovilizando 118 U de enzima/g de quitosano, la temperatura y la presencia de carbodimida fueron factores determinantes en la formación del conjugado biocatalítico. Se pudo determinar mediante la formación de fluoróforos, que aproximadamente el quitosano sufrió una modificación de un 50% en sus grupos aminos, debido a la inmovilización de la enzima y la adición del polietilén glicol. La inmovilización covalente le confirió a la enzima propiedades interesantes, debido a que resultó en un incremento en la estabilidad de la enzima a pH extremos, como fue el caso de pH 1 y 12. Esto puede atribuirse en gran medida, a la modificación de los grupos carboxilos responsables de la inactivación a pH, confiriéndole insensibilidad a la enzima. Aunado a este efecto, se suma la presencia del polietilén glicol, el cual muestra un efecto favorable de aumento en la estabilidad de la enzima y del conjugado QL a pH extremos, probablemente debido a la modificación de más grupos susceptibles, o creando un microambiente amortiguador.

El perfil de actividad contra pH, temperatura y solvente orgánico de la enzima, no se vió afectado por la inmovilización covalente, ni por la modificación hidrofóbica del sistema. La enzima, al igual que los conjugados QL y QLP, son bastante estables en un intervalo de pH=3-10. Sin embargo a pesar de todas las cualidades que puede proveer la adición de la molécula de polietilén glicol, en este caso, la modificación química no aumentó la termoestabilidad de la enzima y no presentó una mayor tolerancia del sistema a solventes orgánicos.

La biocatálisis en solvente orgánico, expande las posibilidades del uso industrial de las enzimas. Lo anterior, supone vencer una serie de obstáculos, puesto que la mayoría de las enzimas evolucionan para realizar su función en medio acuoso y su estructura en presencia de solvente orgánico no siempre es la deseada. El tener un sistema soluble y activo en un ambiente no polar, podría permitir el estudio de reacciones que funcionen en ambientes hidrofóbicos, como es el caso de algunos sustratos de la lacasa. Esto es logrado generalmente, mediante la modificación química del sistema con polietilén glicol, debido a que conduce a una mayor solubilidad de la enzima y a una estabilidad en solvente orgánico. Sin embargo, en este proyecto, la adición de polietilén glicol al conjugado QL, no favoreció la catálisis en solvente orgánico, de tal forma que no se pudieron determinar las constantes cinéticas del conjugado QLP. Sin embargo, como consecuencia de la inmovilización de la enzima en el polímero, el conjugado QL sí fue capaz de oxidar específicamente siringaldazina, con una mayor velocidad que la enzima libre en EtOH, con una actividad de agua establecida de 0.73. Esto se comprobó con las constantes cinéticas del sistema, la eficiencia catalítica del conjugado QL fue de  $1\,504.7\text{ mM}^{-1}\text{ s}^{-1}$ , comparado con la enzima libre que fue  $58.5\text{ mM}^{-1}\text{ s}^{-1}$ . Este fenómeno fue atribuido a que la enzima incrementó su hidrofobicidad, solubilizándose en ambientes no polares y disminuyendo las limitaciones de transferencia de masa.

Los resultados de este trabajo sugieren que la inmovilización de la enzima lacasa sobre el polímero quitosano, permite en gran medida ser un biocatalizador de interés en condiciones de pH extremos. Además, las preparaciones tienen propiedades de solubilidad que las hacen fácilmente recuperables del sistema de reacción. Esto es, a pH de catálisis la enzima conjugada es totalmente soluble, y con un incremento de pH, esta se insolubiliza permitiendo una fácil separación de los productos. Su estabilidad en medios con diferentes pH, hace que los conjugados puedan ser utilizados en un gran número de ciclos catalíticos. Considerando lo anterior sería interesante, poder estudiar a profundidad los mecanismos que le confieren esta estabilidad a los conjugados e incluso, explorar diferentes agentes para la modificación química, al igual que diferentes enzimas con interés biotecnológico.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K-H., Cavaco-Paulo, A., and Gubitz, G. 2000. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. Appl. Environ Microbiol. 66, 3357-3362.
- Abuchowski, A., Van Es, T., Palczuk, N.C. and Davis, F. 1977. Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. J. Biol. Chem. 252, 3578-3581.
- Arica, M.Y. 2000. Immobilization of polyphenol oxidase on carboxymethylcellulose hydrogel beads: preparation and characterization. Polym. Int. 49, 775-781.
- Ayala, M., Horjales, E., Pickard, M.A., and Vazquez-Duhalt, R. 2002. Cross-linked crystals of chloroperoxidase. Biochem. Biophys. Res. Comm. 295, 828-831.
- Arroyo, M. 1998. Immobilized enzymes: theory, methods of study and applications. Ars. Pharma. 39, 23-39.
- Bezalel, L., Hadar, Y., and Cerniglia, C.E. 1997. Enzymatic mechanisms involved in phenanthrene degradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Appl. Environ. Microbiol. 63, 2495-2501.
- Brungerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F.M., Argüelles-Monal, W., Desbrières, J., and Rinaudo, M. 2001. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. Polymer. 42, 3569-3580.
- Calvo, A.M., Copa-Patiño, J.L., Alonso, O., and Gonzalez, A.E. 1998. Studies of the production and characterization of laccase activity in the basidiomycete *Coriolopsis gallica* an efficient decolorizer of alkaline effluents. Arch. Microbiol. 171, 31-36.
- Carrara, C.R., and Rubiolo, A.C. 1997. A method for evaluating lactose hydrolysis in a fixed bed reactor with  $\beta$ -galactosidase immobilized on chitosan. Chem. Eng J. 65, 93-98.
- Cira, L.A., Huerta, S., Hall, G.M., and Shirai, K. 2002. Pilot scale acid fermentation of shrimp wastes for chitin. Process Biochem. 37, 1359-1366.
- Collins, P., Kotterman J., Field, J., and Dobson, A.D. 1996. Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccase from *Trametes versicolor*. Appl. Environ. Microbiol. 62, 4563-4567.
- Dambies, L., Vincent, T., Domard, A., and Guibal, E. 2001. Preparation of chitosan gel beads by ionotropic molybdate gelation. Biomacromol. 2, 1198-1205.
- Darias, R., and Villalonga, R. 2001. Functional stabilization of cellulase by covalent modification with chitosan. J. Chem. Technol. Biotechnol. 76, 489-493.
- Dordick, J.S. 1989. Enzyme catalysis in monophasic organic solvents. Enzyme Microbiol. Technol. 11, 194-211.
- Ducros, V., Brzozowski, A.M., Wilson, K.S., Brown, S.H., Ostergaard, P., Schneider, P., Yaver, D.S., Pedersen, A.H., and Davies, G.J. 1998. Crystal structure of the type-2 depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2Å resolution. Nat. Struc. Biol. 5, 310-316.

D'Annibale, A., Stazi, S.R., Vinciguerra, V., Di Mattia, E. and Sermanni, G. 2000. Characterization of immobilized laccase from *Lentinula edodes* and its use in olive-mill wastewater treatment. *Process Biochem.* 34, 697-706.

DeSantis, G., and Jones, J.B. 1999. Chemical modification of enzymes for enhanced functionality. *Curr. Opin. Biotech.* 10, 324-330.

Eggersdorfer, M., Meyer, J., and Eckes, P. 1992. Use of renewable resources for non-food materials. *FEMS Microbiol. Rev.* 103, 355-364.

Field, J.A., Vledder, R.H., Van-Zeist, J.G., and Rulkens, W.H. 1996. The tolerance of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase to miscible solvents and the *in vitro* oxidation of anthracene in solvent: water mixtures. *Enzyme Microbiol. Technol.* 18, 300-308.

Furniss, B.S., Hannaford, A.J., Smith, P.W.G., and Tatchell, A.R. 1989. Vogel's textbook of practical organic chemistry. Ed Longman Scientific & Technical. 1514pp.

Fwu-Long, M., Chih-Yang, K., Shin-Shin, S., Sung-Tao, L., and Shon-Foun, C. 1999. The study of gelation kinetics and chain-relaxation properties of glutaraldehyde-cross-linked chitosan gel and their effects on microspheres preparation and drug release. *Carbohydr. Polymer.* 41, 389-396.

García-Arellano, H., Valderrama, B., Saab-Rincón, G., and Vazquez-Duhalt, R. 2002. High temperature biocatalysis by chemically modified cytochrome c. *Bioconjugate Chem.* 13, 1336-1344.

Gianfreda, L., Xu, F., and Bollag, J.M. 1999. Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal.* 3, 1-25.

Goderis, H., Ampe, G., Feyten, M., Fouwé, B., Guffens, W., Cauwenbergh, S., and Tobback, P. 1987. Lipase catalyzed ester exchange reactions in organic media with controlled humidity. *Biotechnol. Bioeng.* 30, 258-266.

Govardhan, C.P. 1999. Crosslinking of enzymes for improved stability and performance. *Curr. Opin. Biotech.* 10, 331-335.

Gupta, M.N. 1992. Enzyme function in organic solvents. *Eur J. Biochem.* 203, 25-32.

Habeeb, A.S.F.A. 1966. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. *Anal. Biochem.* 14, 328-336.

Halling, P.J. 1994. Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, test, and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme Microbiol. Technol.* 16, 178-205.

Harris, J.M. 1992. Poly(ethylene glycol) chemistry. Biotechnical and biomedical applications. Plenum Press. 385pp.

Harris, J.M., Struck, E.C., and Case, M.G. 1984. Synthesis and characterization of poly(ethylene glycol) derivatives. *J. Polymer. Sci.* 22, 341-352.

Hirano, S., and Zhang, M. 2000. Cellulose-acidic glycosaminoglycan blend fibers releasing a portion of the glycosaminoglycans in water. *Carbohydr. Polymer.* 43, 281-284.

- Hublik, G., and Schinner, F. 2000. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. *Enzyme Microbiol. Tech.* 27, 330-336.
- Illanes, A. 1994. *Biología de enzimas*. Ediciones universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso. 254 pp.
- Inada, Y., Takahashi, K., and Yoshimoto, T. 1986. Application of polyethylene glycol-modified enzymes in biotechnological processes: organic solvent-soluble enzymes. *TIBTECH.* 4, 190-194.
- Johannes, C., and Majcherczyk, A. 2000. Laccase activity test and laccase inhibitors. *J. Biotech.* 78, 193-199.
- Karum J., and Nicell, J.A. 1997. Potential applications of enzymes in waste treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 69, 141-153.
- Katchalski-Katzir, E. 1993. Immobilized enzymes-learning from past successes and failures. *TIBTECH.* 11, 471-478.
- Kazan, E., Ertan, H., and Erarslan, A. 1997. Stabilization of *Escherichia coli* penicillin G acylase against thermal inactivation by cross-linking with dextran dialdehyde polymers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 191-197.
- Khor, E., and Lim L.Y. 2003. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials.* 24, 2339-2349.
- Kitajima, M., and Yamamoto, Y. 2002. Green and sustainable chemistry (GSC) in Japan. *Green Chem.* 4, G59-G61.
- Ko, E.M., Leem, Y.E., and Choi, H.T. 2001. Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 98-102.
- Krajewska, B., Leszko, M., and Zaborska, W. 1989. Urease immobilized on chitosan membrane: preparation and properties. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 48, 337-350.
- Kumar, G., Smith, P.J., and Payne, G.F. 1998. Enzymatic grafting of natural product onto chitosan to confer water solubility under basic conditions. *Biotech. Bioeng.* 63, 154-164.
- Kurakake, M., Ueki, M., Hashimoto, S., and Komaki, T. 1997. Adsorption of  $\alpha$ -amylase on dextrin immobilized on kieselguhr or chitin. *Carbohydr. Polymer.* 34, 55-59.
- Kurita, K., Yoshino, H., Nishimura, S-I., Ishii, S., Mori, T., and Nishiyama, Y. 1997. Mercapto-chitins: a new type of supports for effective immobilization of acid phosphatase. *Carbohydr. Polymer.* 32, 171-175.
- Li, K., Xu, F., and Eriksson, K-E. 1999. Comparison of fungal laccase and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2654-2660.
- Longo, M.A., and Combes, D. 1999. Thermostability of modified enzymes: a detailed study. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 74, 25-32.

Lundbland, R.L., and Bradshaw, R.A. 1997. Applications of site-specific chemical modification in the manufacture of biopharmaceuticals: 1. An overview. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 26, 143-151.

Luterek, J., Gianfreda, L., Wojtas-Wasilewska, M., Cho, N.S., Rogalski, J., Jaszek, M., Malarczyk, E., Staszczak, M., Fink-Boots, M., and Leonowicz, A. 1998. Activity of free and immobilized extracellular *Cerrena unicolor* laccase in water miscible organic solvents. *Holzforschung.* 52, 589-595.

Magnin, D., Dumitriu, S., Magny, P., and Chornet, E. 2001. Lipase immobilization into porous chitosan beads: activities in aqueous and organic media and lipase localization. *Biotechnol. Prog.* 17, 734-737.

Majcherczyk, A., Johannes, C., and Huttermann, A. 1998. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 22, 335-341.

Majeti, N., and Kumar, R. 2000. A review of chitin and chitosan applications. *React & Fun. Polymers.* 46, 1-27.

Martin, L., Wilson, C.G., Koosha, F., Tetley, L., Gray, A.I., Senel, S., and Uchegbu, I.F. 2002. The release of model macromolecules may be controlled by the hydrophobicity of palmitoyl glycol chitosan hydrogels. *J. Control Release.* 80, 87-100.

Mayer, A.M., and Staples, R.C. 2002. Lacasse: new functions for an old enzyme. *Phytochem.* 60, 551-565.

Nwe, N., and Stevens, W.F. 2002. Production of fungal chitosan by solid substrate fermentation followed by enzymatic extraction. *Biotechnol. Lett.* 24, 131-134.

Novick, S.C., and Dordick, J.S. 1998. Preparation of active and stable biocatalytic hydrogels for use in selective transformations. *Chem. Matter.* 10, 995-998.

Núñez, M.C., Mendez, M.G., and Solorza, J. 2001. Introducción a la reología. IPN. pp 9-47.

Nyström, B., Kjøniksen, A.L., and Iversen, C. 1999. Characterization of association phenomena in aqueous systems of chitosan of different hydrophobicity. *Adv. Colloid. Interface Sci.* 79, 81-103.

Palmieri, G., Giardana, P., Desiderio, B., Marzullo, L., Giamberini, M., and Sanna, G. 1994. A new enzyme immobilization procedure using cooper alginate gel: Application to a fungal phenol oxidase. *Enzyme Microbiol. Technol.* 16, 151-158.

Payne, G.F., Sun, W.Q., and Sohrabi, A. 1992. Tyrosinase reaction/chitosan adsorption for selectively removing phenols from aqueous mixtures. *Biotechnol. Bioeng.* 40, 1011-1018.

Perutz, M. L. 1978. Electrostatic effects in proteins. *Science.* 201, 1187-1191.

Pickard, M.A., Roman, R., Tinoco, R., and Vazquez-Duhalt, R. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3805-3809.

Piontek, K., Antorini, M., and Choinowski, T. 2002. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.9-Å resolution containing a full complement of coppers. *J Biol. Chem.* 277, 37663-37669.

Quiocho, F.A., and Richards, F.M. 1964. Intermolecular cross-linking of a protein in the crystalline state: carboxypeptidase-A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 52, 833-839.

Ravindra, R., Kameswara, R., Krovvidi, A., and Khan, A. 1998. Solubility of chitin and chitosan. *Carbohydr. Polymer.* 36, 121-127.

Roberts, M.J., Bentley, M.D., and Harris, J.M. 2002. Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Adv. Drug Deliver Rev.* 54, 459-476.

Roberts, G.A.F., and Taylor, K.E. 1989. Chitosan gels 3<sup>a</sup>) the formation of gels by reaction of chitosan with glutaraldehyde. *Die Makromol. Chem.* 190, 98-103.

Sack, U., Heinze, T.M., Deck, J., Cerniglia, C.E., Martens, R., Zadrazil, F., and Fritsche, W. 1997. Comparison of phenanthrene and pyrene degradation by different wood-decaying fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3919-3925.

Shu, X.Z., and Zhu, K.J. 2002. The influence of multivalent phosphate structure on the properties of ionically cross-linked chitosan films for controlled drug release. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 54, 235-243.

Solomon, E.I., Sundaram, U.M., and Machonkin, T.E. 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* 96, 2563-2605.

Stein, S., Bohlen, P., Dairman, W., Leimgruber, W., and Weigele, M. 1972. Fluorescamine: A reagent for assay of amino acids, peptides, proteins, and primary amines in the picomole range. *Science.* 178, 871-872.

Stocks, S.J., Jones, A.J.M., Ramey, C.W., and Brooks, D.E. 1986. A fluorometric assay of the degree of modification of protein primary amines with polyethylene glycol. *Anal. Biochem.* 154, 232-234.

Sun, W.Q., and Payne, G.F. 1996. Tyrosinase-containing chitosan gels: a combined catalyst and sorbent for selective phenol removal. *Biotechnol. Bioeng.* 51, 79-86.

Svensson, I., Wehtje, E., Adlercreutz, P., and Mattlasson, B. 1994. Effects of water activity on reactions rates and equilibrium positions in enzymatic esterifications. *Biotechnol. Bioeng.* 44, 549-556.

Tan, S.C., Tan, T.K., Wong, S.M., and Khor, E. 1996. The chitosan yield of *Zigomycetes* at their optimum harvesting time. *Carbohydr. Polymer.* 30, 239-242.

Thurston, C.F. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiol.* 140, 19-26.

Tinoco, R., Pickard, M.A., and Vazquez-Duhalt, R. 2001. Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 32, 331-335.

Tischer, W., and Kasche, V. 1999. Immobilized enzymes: crystal or carriers?. *TIBTECH.* 17, 326-334.

Torres, E., Tinoco, R., and Vazquez-Duhalt, R. 1997. Biocatalytic oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons in media containing organic solvents. *Water Sci. Tech.* 36, 37-44.

Valderrama, B., Ayala, M., y Vazquez-Duhalt, R. 2003. "Ambiente, energía y la nueva industria" ; en: *Fronteras de la biología en los inicios del siglo XXI, Módulo 7, Ingeniería celular, biodiversidad e industria.* Bolívar, F.G., y López-Munguía, A. El Colegio Nacional. 67-91.

Vandertol-Vanier, HA., Vazquez-Duhalt, R., Tinoco, R., and Pickard, M.A. 2002. Enhanced activity by poly(ethylene glycol) modification of *Coriolopsis gallica* laccase. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 29, 214-220.

Vazquez-Duhalt, R., Westlake, D.W., and Fedorak, P.M. 1994. Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing aromatic solvents. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 459-466.

Vazquez-Duhalt, R., Tinoco, R., D'Antonio, P., Topoleski, T.D., and Payne, G.F. 2001. Enzyme conjugation to the polysaccharide chitosan: Smart biocatalysts and biocatalytic hydrogels. *Bioconjugate Chem.* 12, 301-306.

Veronese, F.M. 2001. Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. *Biomaterials.* 22, 405-417.

Wang, Y., Vazquez-Duhalt, R., and Pickard, M.A. 2002. Purification, characterization, and chemical modification of manganese peroxidase from *Bjerkandera adusta* UAMH 8258. *Curr. Microbiol.* 45, 77-87.

Wirth, P., Soupe, J., Tritsch, D., and Biellmann, J.F. 1991. Chemical modification of horseradish peroxidase with ethanal-metoxipolyethylene glycol: Solubility in organics solvents, activity, and properties. *Bioorganic Chem.* 19, 133-142.

Wu, Q., Embree, H.D., Balgley, B.M., Smith, P.J., and Payne, G.F. 2002. Utilizing renewable resources to create functional polymers: chitosan based associative thickener. *Environ. Sci. Technol.* 36, 3446-3454.

Xu, F., Kulys, J.J., Duke, K., Li, K., Krikstopaitis, K., Deussen, W., Abbate, E., Galinyte, V., and Schneider, P. 2000. Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N-hydroxy compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2052-2056.

Xu, F. 1997. Effects of redox potencial and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. *J. Biol. Chem.* 272, 924-928.

Yaropolov, A.I., Skorobogatko, O.V., Vartanov, S.S., and Varfolomeyev, S.D. 1994. Laccase properties, catalytic mechanism, and applicability. *Appl. Biochem. Biotech.* 49, 257-280.

Yoshida, H. 1883. Chemistry of lacquer (Urushi). *J. Chem. Soc.* 43, 472-486.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN