

00550



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA
TIROSINASA EN DISOLVENTES ORGÁNICOS
EN UN SISTEMA DE FLUJO CONTINUO**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. MINERVA CARRASCO FUENTES



TUTOR: DRA. MA. DEL PILAR CAÑIZARES MACÍAS

2005

0350081



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Dra. Ma. del Pilar Cañizares, por su apoyo, comprensión y dedicación. Por sus comentarios y su tiempo.

Al H. Jurado por sus valiosas aportaciones para la realización de este trabajo.

A mi familia y amigos por su apoyo incondicional.

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

NOMBRE: Minervo Carrasco Fuentes

FECHA: 09/11/05

FIRMA: [Firma manuscrita]

La investigación de este trabajo se llevo a cabo en el laboratorio 105 de Postgrado de la Facultad de Química de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Ma. del Pilar Cañizares Macías.

ÍNDICE

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES.....	1
1.1 Biocatálisis enzimática en disolventes orgánicos.....	1
1.1.2 Importancia del Agua.....	4
1.1.3 Efecto del disolvente orgánico.....	6
1.2 Catálisis Enzimática.....	11
1.2.1 Tirosinasa.....	15
1.2.2 Mecanismos de reacción de la tirosinasa.....	18
1.2.3 Aplicaciones.....	21
1.3 Biosensores.....	23
1.3.1 Métodos de Inmovilización de Enzimas.....	23
1.3.2 Sistemas en Flujo – Continuo.....	27
OBJETIVOS.....	31

CAPÍTULO II

DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	32
2.1 Reactivos y Disoluciones.....	32
2.2 Instrumentación.....	33
2.3 Metodología.....	33
2.3.1 Determinación de la actividad de la enzima tirosinasa en disolución.....	33
2.3.2 Inmovilización por enlace covalente.....	34
2.3.3 Determinación de la actividad aparente de la enzima tirosinasa inmovilizada CPG (controlled pore glass) por Batch.....	36
2.3.4 Determinación de la actividad aparente de la enzima tirosinasa inmovilizada en CPG por FIA (Flow Injection Análisis).....	36
2.3.5 Determinación de la Constante Aparente (K_m) de Michaelis – Menten por FIA.....	38
2.3.6 Inmovilización por Atropamiento.....	39
2.3.7 Determinación de la actividad aparente de la enzima tirosinasa inmovilizada en alginato por Batch.....	39
2.3.8 Determinación de la actividad aparente de la enzima tirosinasa inmovilizada en alginato por FIA.....	40

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
3.1 Determinación de la actividad de la enzima tirosinasa en disolución.....	41
3.2 Inmovilización por Enlace Covalente.....	45
3.2.1 Determinación de la actividad aparente de la enzima tirosinasa inmovilizada	

en CPG por Batch.....	45
3.2.2 Determinación de la actividad aparente de la enzima tirosinasa inmovilizada en CPG por FIA.....	52
3.3 Estudio de la estabilidad del reactor enzimático por efecto del disolvente.....	62
3.4 Determinación de la K_m' y $V_{máx}$	66
3.5 Inmovilización por Atropamiento.....	72
3.5.1 Determinación de la actividad aparente de la enzima tirosinasa inmovilizada en alginato por Batch.....	72
3.5.2 Determinación de la actividad aparente de la enzima tirosinasa inmovilizada en alginato por FIA.....	75

CAPÍTULO IV

Conclusiones.....	79
-------------------	----

CAPÍTULO V

Bibliografía.....	81
-------------------	----

RESUMEN

En condiciones naturales, las enzimas llevan a cabo su actividad catalítica en disolución acuosa. Por ello, la gran mayoría de las investigaciones en enzimología han utilizado el agua como medio de reacción.

El agua presenta un papel muy importante en la conformación de la proteína, le ayuda a conservar su actividad catalítica. Por lo tanto, la ausencia de agua puede distorsionar su estructura e inactivándola. Sin embargo, existen evidencias de que algunas enzimas prácticamente mantienen su actividad en medios no acuosos, por ejemplo, la enzima chimotripsina, polifenol oxidasa, peroxidasa y algunas lipasas.

El efecto de los disolventes orgánicos en la actividad de una enzima obtiene grandes ventajas sobre un medio acuoso.

Algunas de estas ventajas son: 1) la solubilidad de muchos compuestos orgánicos en medio no acuoso; 2) la capacidad para llevar a cabo nuevas reacciones que en agua son imposibles, 3) reacciones indeseables como hidrólisis de anhídridos ácidos causadas por el agua; 4) la estabilidad de las enzimas en disolventes orgánicos, 5) la mayor facilidad en la recuperación del correspondiente producto en disolvente orgánico en comparación con el agua y 6) la eliminación de la contaminación microbiana.

El uso de enzimas inmovilizadas ha aumentado considerablemente en los últimos años. Esto es debido a las ventajas que presenta la inmovilización de enzimas, sobre todo a nivel económico. La inmovilización de enzimas ha mostrado ser una gran herramienta, principalmente en el desarrollo de biosensores con el propósito de aumentar la sensibilidad y selectividad en la determinación de muestras complejas.

Por otro lado, los métodos automáticos de análisis, como Análisis por Inyección en Flujo (Flow Injection Analysis, FIA, por sus iniciales en inglés) ha sido de gran importancia principalmente para el desarrollo de metodologías analíticas. Dentro del desarrollo de estas metodologías ha sido el acoplamiento de biosensores a esta técnica, FIA; combinando el carácter dinámico de la técnica con el carácter cinético de la reacción enzimática.

En este trabajo se presenta el estudio cinético en medio acuoso y no acuoso de un reactor enzimático empacado con tirosinasa inmovilizada en vidrio de poro controlado

(controlled pore glass, CPG, por sus iniciales en inglés) y en alginato, acoplados a un sistema de flujo continuo.

Se eligió la tirosinasa, ya que esta enzima es específica para compuestos fenólicos y ha sido estudiada en medio no acuoso. Ha sido inmovilizada en diferentes soportes como geles específicamente en polihidroxixelulosa, membranas como polipirrol y en diversos polímeros: polivinilalcohol, Eastman AQ, poli-(Ni-protoporfirina IX-dimetil ester)²⁴⁻³⁵. La inmovilización en CPG se ha utilizado principalmente en sistemas acuosos, cuando el medio es un disolvente orgánico la determinación no se ha realizado en sistemas de flujo continuo.

En este proyecto se realizó un estudio de la actividad aparente de la tirosinasa inmovilizada en dos soportes diferentes, vidrio de poro controlado y alginato para empacarlos en reactores enzimáticos y acoplarlos a una configuración FIA.

También, se realizó un estudio de la estabilidad de los reactores enzimáticos en disolventes de diferente polaridad. Finalmente, se determinó la actividad de la tirosinasa inmovilizada en vidrio de poro controlado utilizando la constante de Michaelis – Menten (K_m) y la velocidad máxima ($V_{máx}$) las cuales fueron comparados con los coeficientes de partición ($\log P$) para cada disolvente estudiado en el sistema de flujo propuesto.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 BIOCATALISIS ENZIMÁTICA EN DISOLVENTES ORGÁNICOS

La bioquímica se ocupa en su mayor parte de las propiedades y reacciones de los componentes orgánicos. En las células, la mayor parte de los compuestos y las reacciones bioquímicas ocurren en medio acuoso.

El agua, cuyas propiedades son fundamentales para la vida, solubiliza y modifica las características de biomoléculas como las enzimas. Forma puentes de hidrógeno que mantienen su naturaleza y actividad catalítica. Es por esta razón que todos los estudios en enzimología como son: extracciones, purificaciones, caracterizaciones, reacciones y aplicaciones a escala industrial son realizadas en medio acuoso. Sin embargo, varias aplicaciones de biocatálisis dentro del área de la biotecnología han sido limitadas debido a que muchos procesos enzimáticos son imposibles en medio acuoso. Tomando como base esta limitación, diversas investigaciones surgen por la introducción de otro medio de reacción ^{1,2}:

- 1) Adición de pequeñas cantidades de disolventes orgánicos miscibles con disoluciones acuosas enzimáticas. Las enzimas son catalíticamente activas aunque en mucho menor grado, ya que el sistema no es tan distinto del agua la molécula de la enzima se encuentra localizada en un entorno acuoso ayudándole a conservar sus propiedades intrínsecas.
- 2) Mezclas bifásicas: la disolución acuosa enzimática se mezcla con un disolvente inmisible, originando una emulsión. Para estabilizar la emulsión, se adiciona un surfactante formando miscelas reversas. Éstas son formadas por colas hidrofóbicas y en su interior cabezas polares que son espontáneamente formadas cuando el surfactante es disuelto en el disolvente orgánico. Las miscelas solubilizan una gran cantidad de agua, en su interior. La enzima es atrapada por agitación, disolución enzimática y del surfactante en el disolvente orgánico. Por lo tanto, la molécula de

la enzima es situada en la cavidad acuosa, estando completamente en un medio acuoso, ideal para su funcionamiento (figura 1)^{3,4}

- 3) Introducción de disolventes orgánicos como medio de reacción: el estudio se llevo a cabo empleando enzimas capaces de hidrolizar proteínas solubles en agua. Por lo tanto, su hábitat natural involucra un medio acuoso. Las enzimas fueron colocadas en un disolvente orgánico (octano) para llevar a cabo una reacción de transesterificación. Ambas enzimas mostraron una constante de velocidad muy alta, por lo tanto, estas proteasas mostraron ser catalíticamente activas en un medio no acuoso².

Sin embargo, al probar otras enzimas como: alcohol deshidrogenasa, tirosinasa y alcohol oxidasa, comparando sus actividades en agua y en disolventes orgánicos las enzimas presentaron poca actividad en medio no acuoso, pero, al adicionar una pequeña cantidad de agua sus actividades aumentaron^{5,6}.

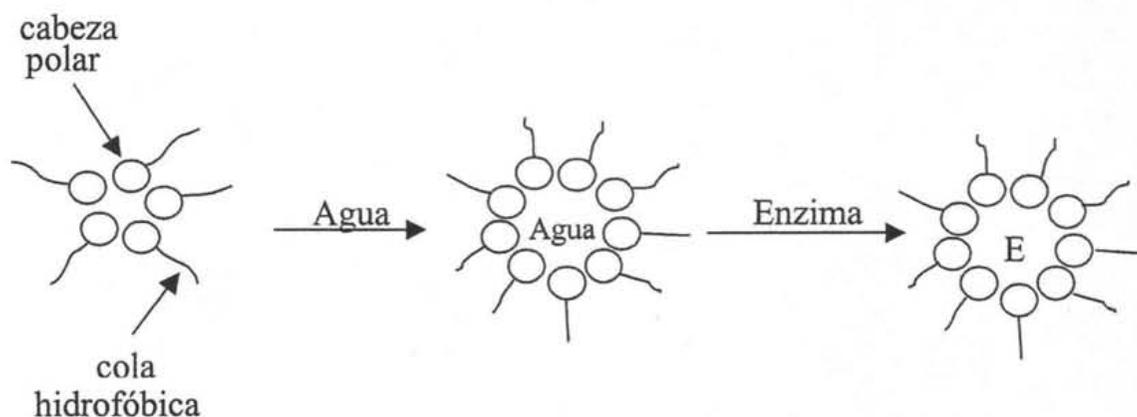


Figura 1. Formación de micelas reversas en disolventes orgánicos

La conformación natural de una enzima está determinada por una red complicada de enlaces de hidrógeno y de interacciones hidrofóbicas. La molécula enzimática posee moléculas de agua ordenadas en su superficie formando una capa que la protege e hidrata.

Esta capa o esqueleto de hidratación es importante para mantener la actividad y estabilidad de la enzima. Una enzima exhibe sus propiedades catalíticas cuando tiene bien definida su conformación natural³. Ésta puede ser alterada por diversos factores, como puede ser la presencia de un disolvente orgánico.

El disolvente orgánico puede interactuar con la enzima causando una desnaturalización parcial o total provocando la pérdida de sus propiedades catalíticas. Por lo tanto, la conservación del esqueleto de hidratación de la enzima es necesaria para la retención de la actividad en el medio orgánico. La eliminación de éste puede distorsionar la conformación e inactivar la enzima.

La estabilización de la estructura enzimática en un medio no acuoso se debe a la formación de una microfase acuosa en la superficie de la enzima. Por lo tanto, no hay contacto del disolvente con la enzima, debido a las moléculas de agua acumuladas en la superficie de la enzima (figura 2)

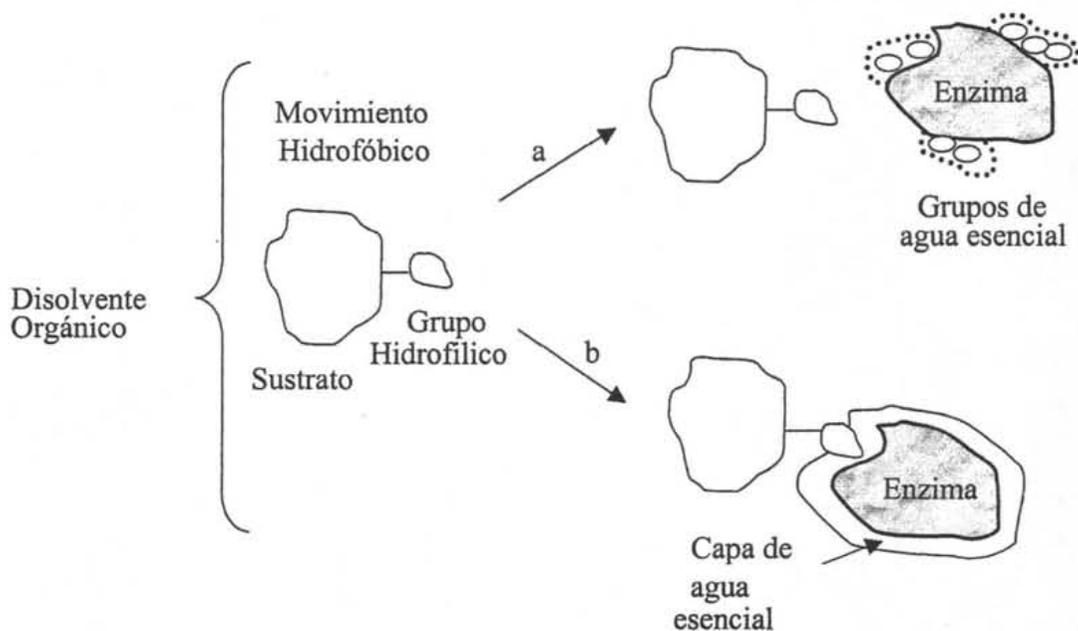


Figura 2. Catálisis enzimática en disolventes orgánicos. a) desactivación de la enzima por efecto del disolvente, b) estabilización de la enzima en medio no acuoso.

1.1.2 IMPORTANCIA DEL AGUA

El agua juega un papel central en la catálisis enzimática y es considerada como un componente ubicuo en todos los procesos biológicos: biosíntesis, fotosíntesis, metabolismo y catabolismo.

La naturaleza y la conformación catalíticamente activa de las enzimas son llevadas a cabo por un balance de varias interacciones no covalentes (puentes de hidrógeno, interacciones iónicas, hidrofóbicas y de Van der Waals). El agua participa directa o indirectamente en todas ellas, proporcionando estabilidad a todo el sistema. Por lo tanto, el agua es absolutamente requerida para la actividad de las enzimas. Forma una pequeña capa de hidratación alrededor de la molécula enzimática. Sin embargo, la pregunta no debe ser si el agua es requerida, si no cuanto de ella es necesaria para permitir que una enzima funcione. La concentración de agua en el contorno de estas enzimas es menor a 55.5 M en medio acuoso.

En los últimos años se ha investigado mucho con respecto al efecto de la concentración de agua en la actividad de la enzima en presencia de disolventes orgánicos. El grado óptimo de hidratación difiere de enzima a enzima y de disolvente a disolvente. Es decir, la chimotripsina requiere sólo 50 moléculas de agua para su actividad en octano. La actividad de la tirosinasa en cloroformo necesita alrededor de 3.5×10^7 moléculas de agua por molécula de enzima⁷.

Por otro lado, la actividad de la alcohol deshidrogenasa, polifenol oxidasa y alcohol oxidasa fueron evaluadas en diferentes disolventes orgánicos en función de la concentración de agua presente. Las enzimas presentaron actividad tanto en disolventes hidrofílicos como hidrofóbicos, su actividad dependió de la concentración de agua presente en el medio. La cantidad de agua requerida para la actividad de cada enzima varió significativamente de un disolvente a otro, es decir, la actividad de la alcohol oxidasa en éter etílico fue mil veces mayor que en sec-butanol con un contenido de agua del 0.6 %. La polifenol oxidasa en octanol al 97% sólo presentó un 40% de su actividad. Así, la actividad

de la alcohol oxidasa fue la misma en diferentes disolventes: éter dietílico, octanol y acetato butílico con la misma concentración de agua.

Los estudios mostraron que las enzimas suspendidas en disolventes hidrofóbicos requieren menor cantidad de agua para su actividad que cuando se encuentran suspendidas en disolventes hidrofílicos. Es decir, el agua actúa como un lubricante permitiéndole a la enzima la movilidad conformacional necesaria para su actividad óptima. En medios no acuosos, la enzima muestra actividad debido a que se encuentra fuertemente atada a su agua esencial, reteniéndola. En un medio hidrofóbico la actividad es mayor que en un medio hidrofílico debido a que los disolventes hidrofóbicos poseen una menor capacidad para eliminar el agua esencial de la molécula enzimática. Mientras que un disolvente hidrofílico elimina más fácilmente la capa de hidratación de la enzima.

La actividad catalítica de las enzimas depende de las propiedades del disolvente. La pérdida del agua esencial tiene un fuerte efecto perjudicial en la actividad enzimática, pero cuando se repone (adicionando agua a la suspensión de la enzima) la actividad catalítica puede ser restaurada.

El agua puede ser sustituida por otros compuestos. Al ser eliminada por algún disolvente, se puede asumir que las áreas de la enzima que normalmente se encontraban interactuando con el agua quedan expuestas, provocando un efecto perjudicial en su actividad. Sin embargo, la adición de compuestos que pueden imitar la interacción del agua con la enzima, formando puentes de hidrógeno debe en algún grado restaurar la actividad.

Muchas enzimas han mostrado actividad en una variedad de disolventes orgánicos, el mejor medio de reacción no acuoso para las reacciones enzimáticas son disolventes hidrofóbicos. Las enzimas en este tipo de disolventes tienden a mantener su capa de hidratación esencial, permitiéndoles mantener su conformación natural, así como suficiente flexibilidad.

1.1.3 EFECTO DEL DISOLVENTE ORGÁNICO

Las interacciones hidrofóbicas juegan un papel principal en la conformación catalítica de las enzimas. Una pequeña alteración en dicha conformación afecta la estabilidad de la enzima y por lo tanto su actividad enzimática.

Los disolventes en ocasiones producen efectos fisicoquímicos en la molécula de la enzima, estos efectos pueden ser imprevistos y potencialmente muy útiles dependiendo de la clase del disolvente y de la enzima.

Existen factores que provocan alteraciones en las propiedades fundamentales de las enzimas, factores como el efecto del disolvente orgánico al reemplazar el agua esencial del esqueleto de hidratación en la molécula de la enzima. Un disolvente debe tener la habilidad de conservar las interacciones hidrofóbicas, a tal grado de mantener la actividad de la enzima. Por lo tanto, la selección del disolvente es importante para evitar inactivar la enzima.

Los disolventes pueden alterar de diferentes formas una molécula enzimática:

Inactivación de la enzima por contacto directo con el disolvente:

Alteración de la conformación natural de la enzima por efecto del disolvente, es decir, penetrando en el núcleo hidrofóbico de la proteína, afectando los enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas provocando una desnaturalización en la enzima.

Esta situación es particularmente importante cuando las enzimas son solubles en un medio constituido por agua y un disolvente orgánico miscible y a bajas concentraciones de agua. Por el contrario, la insolubilidad de las enzimas en un disolvente orgánico, previene a la enzima de severas distorsiones en su estabilidad conformacional. De hecho, muchas enzimas en un medio totalmente orgánico son capaces de retener su conformación natural aún después de una fuerte agitación.

Interacción con la capa de agua esencial de la enzima:

Interacción directa del disolvente con el agua que rodea a la enzima. La naturaleza del disolvente es crucial para mantener esta capa de agua. Los disolventes muy polares o aquellos con características hidrofílicas son capaces de absorber el agua, por lo tanto, eliminar esta capa de la enzima, ocasionando la pérdida de sus propiedades catalíticas. Sin embargo, existen algunas enzimas en las cuales el agua es herméticamente enlazada por lo que el disolvente no puede eliminarla, como es el caso de las enzimas: oxidasa xantina, lipasa pancreática porcina y subtilisina⁷. Al ser suspendidas en algunos disolventes miscibles con el agua presentan actividad. Por el contrario, los disolventes no polares o hidrofóbicos no tan fácilmente absorben el agua de la enzima. Un disolvente que es suficientemente hidrofóbico debe permitir el funcionamiento de la enzima.

La hidrofobicidad de un disolvente orgánico es expresada como el logaritmo del coeficiente de partición ($\log P$) como una medida estándar de un sistema de dos fases octanol – agua.⁸⁻¹⁰ Los disolventes con un $\log P < 2$ están considerados a distorsionar fuertemente la interacción agua – biocatalizador. Aquellos disolventes con un $\log P$ entre 2 y 4 son distorsionadores relativamente débiles, afectando la actividad de la enzima de una manera imprevisible. Finalmente, los disolventes con un $\log P > 4$ son normalmente biocompatibles, como los hidrocarburos ya que no tan fácilmente absorben el agua de la enzima.

A pesar de algunas excepciones, como es el caso de la enzima subtilisina en dimetilformamida con un $\log P = -0.1$ y la lipasa pancreática porcina con un $\log P = 0.71$ en piridina presentan una actividad alta. Éste modelo ha sido aceptado como una guía para predecir la actividad biocatalítica en disolventes orgánicos.⁷

Solubilidad del sustrato y del producto en el medio:

La selección del disolvente para la solubilidad del sustrato como del producto debe ser considerada. El uso de disolventes donde el sustrato no sea soluble puede ser poco práctico para la reacción enzimática, ya que no habrá interacción entre enzima – sustrato.

Por otro lado, la compatibilidad de los productos de la reacción enzimática con el disolvente es crucial. Los productos polares eliminan agua del esqueleto de hidratación de la enzima provocando inhibición o alguna reacción indeseable.

Dependencia del pH:

En soluciones acuosas, la actividad enzimática depende del pH. Las enzimas presentan un pH característico en el cual su actividad es máxima.

El concepto de pH en disolventes orgánicos no tiene significado. Sin embargo, el estado de protonación de los grupos ionogénicos de la enzima deben ser controlados por otros factores. Se ha descubierto que las enzimas presentan un fenómeno denominado efecto de “pH memoria”, es decir, el comportamiento catalítico de la enzima en disolventes orgánicos va estar en función del pH de la solución acuosa anterior a la cual la enzima estuvo expuesta.

Sin embargo, el comportamiento de una enzima en un disolvente orgánico va estar en función del pH de la solución acuosa anteriormente expuesta. Así mismo, si la solución acuosa no presenta en valor de pH adecuado, la actividad de la enzima en el medio orgánico estará destinada a ser subóptima. Evitando este efecto, es preferible el uso de soluciones amortiguadoras para lograr la máxima actividad enzimática en el disolvente orgánico. Las enzimas antes de ser sometidas a un disolvente orgánico deben presentar un estado iónico adecuado, ya que en un medio orgánico no existe alguna fuerza que pueda alterar los grupos cargados.

Estabilidad Térmica:

Las enzimas son intrínsecamente inestables en solución y pueden ser inactivadas por desnaturalización, causada por un aumento en la temperatura¹¹. Cuando hay un aumento de temperatura, la molécula de la enzima primero se desdobra o se abre reversiblemente y sufre una o más de las siguientes reacciones: formación de estructuras mezcladas

incorrectamente, destrucción de enlaces sustrato – sustrato vía β - eliminación, deamidación de residuos de asparagina y glutamina e hidrólisis de enlaces peptídico a residuos de ácido aspártico. Cada proceso requiere agua y por consiguiente no deben ocurrir en un medio ambiente libre de agua.

Por lo tanto, la deshidratación en las enzimas la hace remarcablemente estables al calor. Se ha demostrado que la lipasa pancreática es extremadamente termoestable y puede resistir calentamiento a 100 °C. A esta temperatura la enzima es 10 veces más activa que a temperatura ambiente por varias horas.

El agua actúa como un lubricante que le permite una alta flexibilidad conformacional a la molécula de la enzima. Por consiguiente, la deshidratación las hace mucho más rígidas. Así, la lipasa pancreática puede resistir temperaturas de 100 °C en disolventes orgánicos. Esto significa que la estructura de la enzima permanece propiamente estructurada en medio orgánico aún a altas temperaturas.

Alteración de la especificidad de la enzima:

Las enzimas no sólo son selectivas al tipo de reacción que catalizan sino que también en su posición de ataque en una molécula.

La presencia de un disolvente orgánico en una enzima puede modificar su sitio activo en su conformación, es decir, al ser eliminada el agua, su estructura conformacional se vuelve rígida o inflexible provocando la imposibilidad a adaptar un sustrato determinado. Consecuentemente, el aumento de rigidez por la deshidratación produce un cambio en la especificidad del sustrato.

La lipasa pancreática, hidratada reacciona con sustratos grandes y pequeños. Sin embargo, deshidratada reacciona sólo con sustratos pequeños, ya que su centro activo se vuelve rígido rígido.

Las fuerzas de transmisión de enlace enzima–sustrato son interacciones hidrofóbicas, producidas por la presencia de agua. los sustratos lipofílicos son expulsados del agua en el centro activo de la enzima. En medio no acuoso estas fuerzas de transmisión

no existen, y esto provocara un cambio en el balance del enlace enzimas - sustratos debido a la energía que es usada en la catálisis.

En estudios realizados con la chimotripsina que hidroliza a la étil ester N-acetil-L-fenilalanina en agua es 100 veces más rápido que a la etil ester N-acetil-L-histidina debido a la hidrofobicidad del segundo sustrato. Al ser sometida en octano la especificidad del sustrato se invierte y el derivado de histidina se vuelve un sustrato apreciablemente mejor que la fenilalanina.²

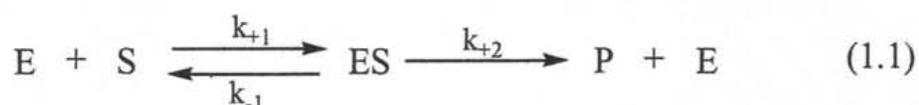
Existen enzimas que exhiben una especificidad muy alta en un medio no acuoso. Esta interacción preferida por las enzimas es muy útil principalmente en el caso de enantiómeros. Por lo tanto este hecho puede ser usado en el desarrollo de biosensores ópticos para reconocer isómeros ópticos.

La conservación de la actividad catalítica de enzimas en disolventes orgánicos ha resuelto grandes obstáculos en el área de la biotecnología ya que muchos procesos biocatalíticos que difícilmente podrían ser realizados en soluciones acuosas debido a la baja solubilidad del sustrato y/o un desfavorable desplazamiento del equilibrio de reacción en agua, ha sido de gran aprovechamiento para la estabilización de la enzima en un medio diferente al agua.

1.2 CATÁLISIS ENZIMÁTICA

Las enzimas son catalizadores muy eficaces y muy selectivos. Están especializadas en la catálisis de reacciones biológicas. Una de sus propiedades esenciales, es la capacidad de fijar uno o más sustratos en una reacción biomolecular. El gran tamaño de las proteínas en relación con los sustratos condujo al concepto de que una región restringida de la enzima, denominado sitio activo, se ocupa de la catálisis. El sitio activo constituye una pequeña porción de la estructura de la enzima. Así, la especificidad de la enzima depende del arreglo de los átomos en el sitio activo.

L. Michaelis y M. L. Menten desarrollaron una teoría general sobre la acción y cinética de las enzimas. Su teoría supone que la enzima se combina con el sustrato formando un complejo enzima – sustrato, ES, que se descompone para formar un producto, P, y la enzima libre:



La velocidad inicial de una reacción es la velocidad medida antes de que se haya formado suficiente producto para permitir que la reacción inversa ocurra. A una concentración baja de sustrato, la velocidad inicial de la reacción es casi proporcional a la concentración del sustrato y la reacción es aproximadamente de primer orden. A medida que la concentración del sustrato aumenta, la velocidad inicial de la reacción disminuye y deja de ser aproximadamente proporcional a la concentración del sustrato, en este punto el orden de la reacción es mixto. Con un aumento posterior de la concentración del sustrato, la velocidad de la reacción llega a ser esencialmente independiente de la concentración del sustrato y se aproxima asintóticamente a una velocidad constante. En este intervalo de concentraciones de sustrato la reacción es esencialmente de orden cero con respecto al sustrato, y se dice que la enzima se encuentra saturada con el sustrato (figura 3).

Todas las enzimas muestran el efecto de saturación, pero este varía ampliamente con respecto a la concentración del sustrato que se necesita para que se manifieste.

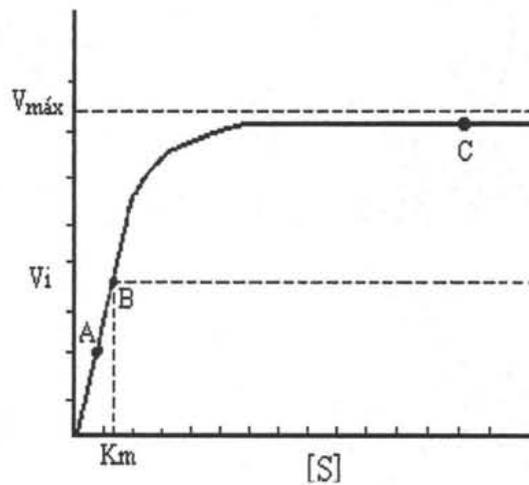


Figura 3. Efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad inicial de una reacción enzimática a una concentración de la enzima constante.

En la figura 3, los puntos A y B indican que solamente una porción de la enzima presente está combinada con el sustrato, aún cuando existan muchas más moléculas de sustrato que de enzima. Esto se debe a que la constante de equilibrio para la reacción no es infinitamente grande. En los puntos A o B al aumentar o disminuir la concentración del sustrato aumenta o disminuye la concentración de la enzima ligada al S como ES; de aquí que velocidad inicial dependa de $[S]$.

En el punto C, esencialmente toda la enzima se encuentra combinada con el sustrato de manera que un incremento posterior en $[S]$, aunque hace aumentar la frecuencia de las colisiones entre E y S, no puede causar incrementos en la velocidad de reacción, puesto que no existe enzima libre disponible para reaccionar.

El caso B presenta una situación de mayor interés teórico donde exactamente la mitad de las moléculas de enzima están unidas con sustrato. Entonces, la velocidad es la mitad de la velocidad máxima alcanzable ($V_{m\acute{a}x}/2$) a esa concentración particular de enzima.

Cuando la concentración del sustrato es tan elevada, prácticamente toda la enzima del sistema está presente en forma del complejo ES, es decir, cuando la enzima se encuentra saturada, se alcanzará la velocidad inicial máxima, $V_{m\acute{a}x}$ dada por:

$$V_{\text{m}\acute{\text{a}}\text{x}} = k_{+2} [E_{\text{T}}] \quad (1.2)$$

Donde $[E_{\text{T}}]$ es la concentración total de la enzima.

$$V_0 = \frac{V_{\text{m}\acute{\text{a}}\text{x}} [S]}{K_m + [S]} \quad (1.3)$$

La ecuación 1.3 es la ecuación de Michaelis-Menten, ecuación de la velocidad para una reacción de un solo sustrato, catalizada enzimáticamente. Ésta ecuación relaciona la velocidad inicial, la velocidad máxima y la concentración inicial del sustrato a través de la constante de Michaelis-Menten (K_m). Al parecer la ecuación no muestra un término para la concentración de la enzima, en realidad ésta se encuentra contenida en el término de $V_{\text{m}\acute{\text{a}}\text{x}}$ (ecuación 1.2).

De la ecuación de Michaelis-Menten se deriva una relación importante en el caso especial en que la velocidad inicial de la reacción sea exactamente la mitad de la velocidad máxima, es decir, $V_0 = 1/2V_{\text{m}\acute{\text{a}}\text{x}}$ (fig. 3, punto B). De donde se obtiene que $[S] = K_m$ cuando la velocidad inicial es igual a la mitad del valor de la velocidad máxima. Así, el valor de la constante de Michaelis-Menten (K_m) es una medida de la afinidad de la enzima por el sustrato.

Numerosas enzimas dan curvas de saturación que no permiten determinar fácilmente los parámetros cinéticos: velocidad inicial máxima y K_m , cuando se grafica V_0 en función de la concentración del sustrato $[S]$.

Para evaluar la velocidad máxima y la constante de Michaelis-Menten, es conveniente utilizar una regresión lineal.

La ecuación de Michaelis-Menten (1.3) puede ser invertida:

$$\frac{1}{V(o)} = \frac{K_m}{V_{max}} * \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (1.3)$$

Al graficar $1/V_o$ como función de $1/[S]$ se obtiene una recta con pendiente K_m / V_{max} y ordenada al origen $1 / V_{max}$.

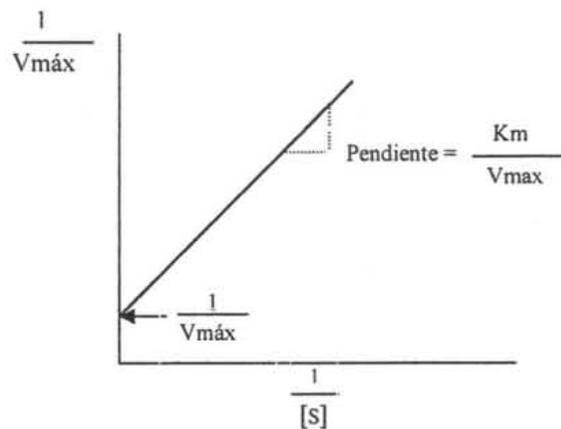


Figura 4. Gráfica de Lineweaver – Burk usada para valorar K_m y $V_{máx}$

Esta representación es conocida como la transposición propuesta por Lineweaver– Burk.

La constante de Michaelis–Menten (K_m) estará expresada de acuerdo a las unidades en las que se encuentre expresada la concentración del sustrato.

1.2.1 TIROSINASA

Polifenol Oxidasas (PPO) es un término genérico para el grupo de enzimas que catalizan la oxidación de compuestos fenólicos causando un color marrón principalmente en frutas, y en general, en los tejidos de plantas al poco tiempo de ser cortadas o dañadas. Dependiendo de la especificidad del sustrato, las polifenol oxidasas son designadas como monofenol monooxigenasa, cresolasa o tirosinasa (EC 1.14.18.1), difenol oxidasa, catecol oxidasa o difenol oxígeno oxidoreductasa (EC 1.10.3.2) y lacasa o p-difenol oxígeno oxidoreductasa (EC 1.10.3.1).¹²

La tirosinasa es una enzima muy importante y muy abundante en la naturaleza. Se encuentra tanto en las células de organismos vegetales como de animales. Es aislada de una gran variedad de fuentes y su purificación es difícil por la contaminación de pigmentos. Los productos de esta reacción enzimática, quinonas, forman melaninas permitiendo la modificación de proteínas, incluyendo la tirosinasa.

Muchas de las primeras purificaciones de la PPO fueron realizadas a partir de hongos silvestres, encontrando que se encuentra en múltiples formas (isozimas), la presencia de un cofactor (Cu) y diferente relación de actividades.

Estudios espectroscópicos, han establecido que el sitio activo de la enzima está constituido principalmente por dos iones cobre en la molécula enzimática, por lo tanto, el cobre forma una parte esencial en la molécula enzimática. Cuando la proteína se encuentra libre de cobre no tiene la habilidad para llevar a cabo su actividad¹³.

Así mismo, los iones cobre forman un sitio activo binuclear, los cuales se encuentran en sus dos estados de oxidación. Tres diferentes estados funcionales han sido distinguidos en la tirosinasa denominados: metitrosinasa (met), deoxitirosinasa (deoxi) y oxitirosinasa (oxi), los cuales son esenciales para el proceso enzimático

La metitrosinasa es denominada como una estructura tetragonal, donde el sitio activo de cobre binuclear Cu(II), forman puentes con iones hidroxilo (OH⁻) y de esta forma proporciona un camino efectivo para el intercambio de 2e⁻ para formar el estado funcional de la deoxitirosinasa.

La forma oxirosinasa es obtenida a partir de la presencia de oxígeno molecular, a partir de peróxido de hidrógeno (figura 5). Durante la lenta autoxidación de muchas sustancias como compuestos fenólicos, hay formación de peróxido de hidrógeno posiblemente a que la tirosinasa contiene catalasa y peroxidasa. La catalasa presente en la enzima se descompone rápidamente formando él peróxido, proporcionando así un átomo de oxígeno al sistema

Técnicas como resonancia espectroscópica raman, han mostrado que el oxígeno molecular es enlazado al sitio activo binuclear formando un peróxido. Estos datos muestran que los dos iones cobre están en su estado de oxidación cúprico.

Finalmente, en la deoxitirosinasa en el sitio activo binuclear los iones cobre se encuentran en su estado de oxidación (I), en contraste, a la forma met y oxirosinasa, la deoxitirosinasa reacciona con oxígeno molecular reversible dando lugar también al estado funcional oxirosinasa.

Estos tres estados funcionales de la tirosinasa son indispensables para la catálisis enzimática de la enzima.

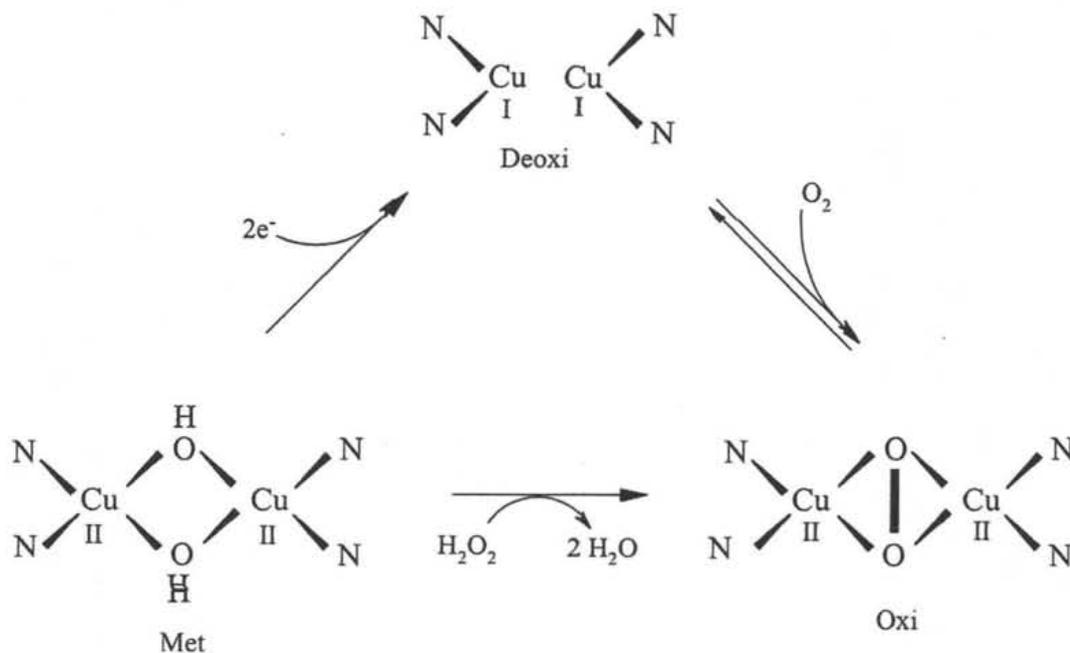
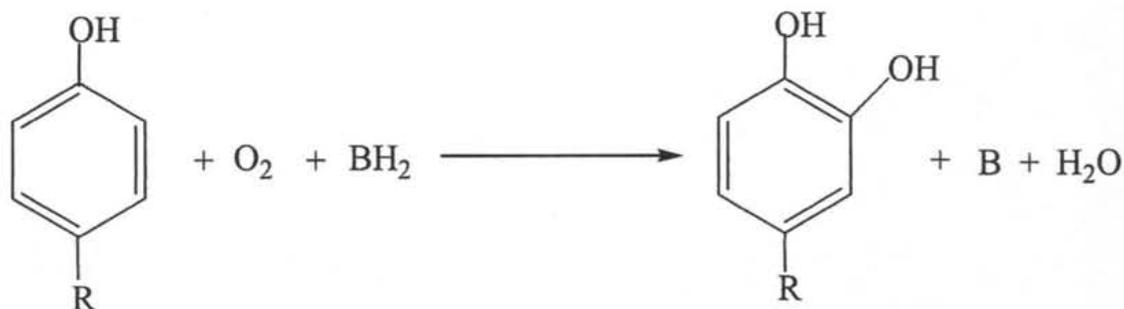


Figura 5. Interrelación de los tres estados funcionales del sitio activo de la enzima tirosinasa

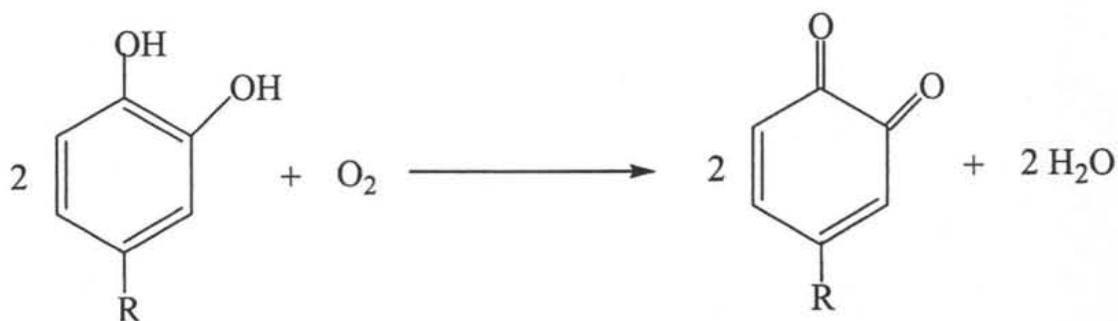
La tirosinasa tiene la capacidad de catalizar la oxidación aeróbica tanto de fenoles monohídricos y o-dihídricos. Estas dos actividades parecen ser tan diferentes en carácter, es decir, una involucra la inserción de un grupo hidroxilo, mientras que la otra involucra la eliminación de dos átomos de hidrógeno. La tirosinasa ha sido considerada poseedora de dos diferentes catálisis o actividades enzimáticas.

El hecho de que la relación de estas dos actividades puede variar durante el proceso de aislamiento y purificación de la enzima, ha permitido suponer que la tirosinasa es una enzima que presenta dos actividades, o es una mezcla de dos enzimas diferentes o una enzima más algún factor desconocido.

Dos sustratos han sido ampliamente usados para el estudio del modo de acción de la tirosinasa: p-cresol para el caso de la actividad de fenoles monohídricos y catecol para la actividad de fenoles o-dihídricos. Debido a estos sustratos, estas dos actividades son comúnmente nombradas como actividad cresolasa o monofenolasa (reacción 1) y actividad catecolasa o difenolasa (reacción 2)¹⁴⁻¹⁸. La relación de estas dos actividades varía irregularmente de una sección de célula a otra, estando en mayor proporción la actividad catecolasa y la cual va ser proporcional al contenido de cobre.



Reacción 1. Actividad cresolasa de la enzima tirosinasa.
BH₂ (compuesto o-difenólico)



Reacción 2. Actividad catecolasa de la enzima tirosinasa.

1.2.2 MECANISMO DE REACCIÓN DE LA TIROSINASA

La formación de o-quinonas por medio de la enzima tirosinasa consiste en un ciclo de dos etapas (figura 6). El mecanismo de oxidación del o-difenol parece ser más simple y será considerado primero.

Actividad Catecolasa (figura 6A)

Los iones cobre son fundamentales para que la enzima sea catalíticamente activa. Cuando estos sitios activos bicuprosos (estructura deoxitirosinasa (deoxi, IA)), una molécula de O_2 es enlazada a los dos iones de cobre, provocando la formación característica de un peróxido y un cambio en su estado de oxidación (II) dando lugar a la formación de la oxi-tirosinasa (oxi, IIA).

Los dos iones de Cu (II) de la oxitirosinasa se unen a los átomos de oxígeno de los dos grupos hidroxilo de una molécula de catecol, empleada como sustrato, para formar el complejo O₂-catecol-tirosinasa (III A). El catecol se convierte a o-benzoquinona y la enzima se reduce a su forma metitirosinasa (met, IV A).

Otra molécula de catecol, se une de la misma forma que cuando está en estado oxi, por medio de los átomos de oxígeno forman enlaces con los iones Cu (II) (V A). El catecol se oxida formando así la o-benzoquinona y la enzima es reducida a su estado deoxitirosinasa, completando el ciclo.

Actividad Cresolasa (Figura 6B)

El mecanismo de la o-hidroxilación de un monofenol por medio de la tirosinasa (figura 6B). Comienza con la metitirosinasa(IVA), partiendo del ciclo anterior. Este estado de la enzima se reduce por un compuesto BH₂ (reacción 1); designando como compuesto BH₂ , catecol, para obtener la deoxitirosinasa (IA).

Entonces el oxígeno molecular se une a la deoxitirosinasa , formando la oxitirosinasa (IIA). Así el compuesto monofenólico es enlazado a un ion Cu(II) mediante el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo del fenol formando el complejo O₂-monofenol-tirosinasa IB. Posteriormente, se lleva a cabo un nuevo arreglo permitiendo una forma asimétrica para poder atacar el monofenol por medio del desdoblamiento de enlace O-O (intermediario IIB).

Subsecuentemente, la posición orto del monofenol se hidroxila por un átomo de oxígeno del intermediario O₂-monofenol-tirosinasa para dar el complejo (IIIB), el cual es entonces disociado formando así deoxitirosinasa (IVB) y benzoquinona completando el ciclo.

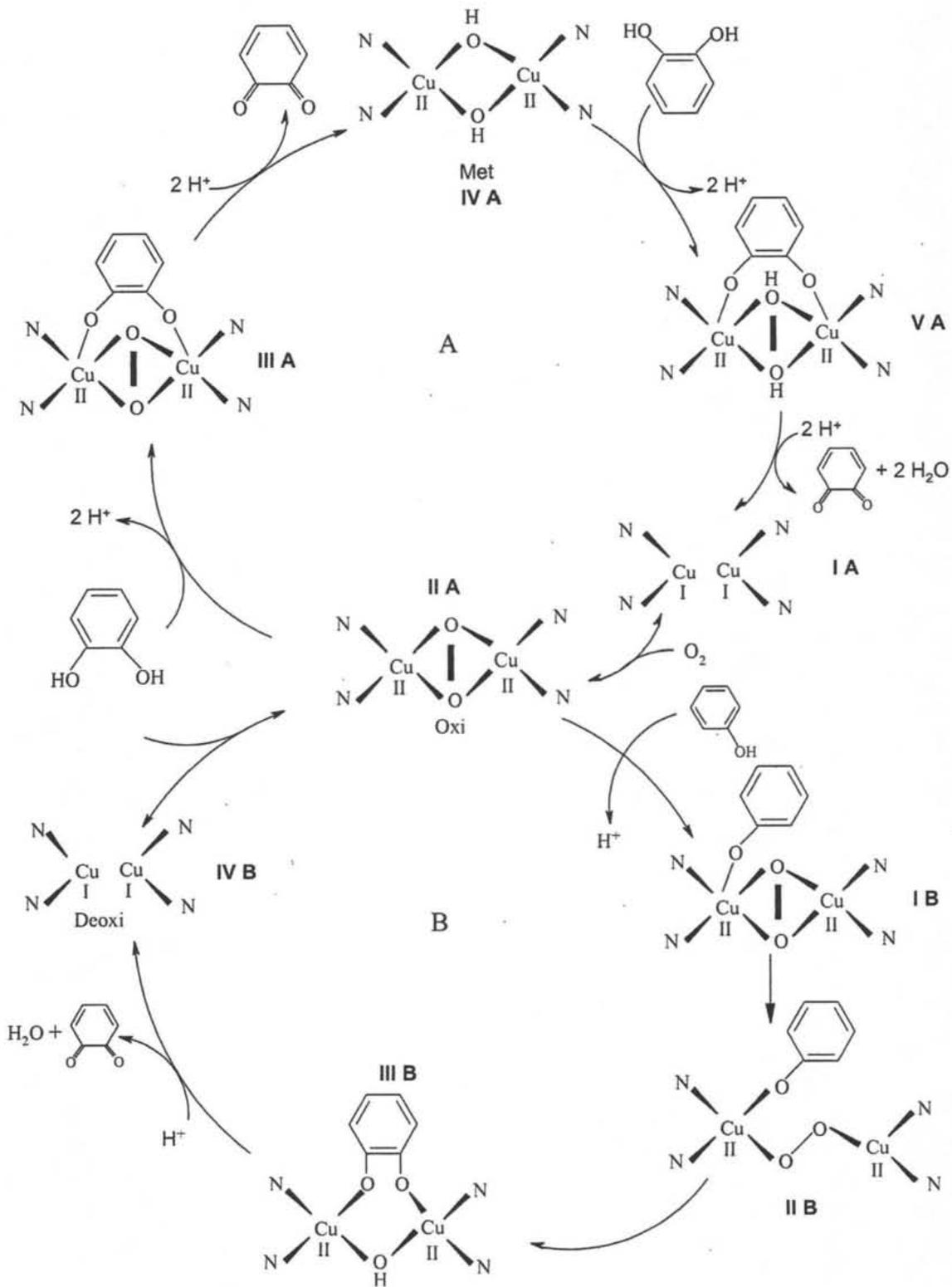


Figura 6. Mecanismo de la actividad enzimática de la tirosinasa.

A) actividad catecolasa, B) actividad cresolasa¹².

Durante mucho tiempo, los compuestos monofenoles y o-difenoles habían sido considerados como sustratos exclusivos de la tirosinasa. Sin embargo, estudios recientes con otro tipo de sustratos como aminas aromáticas y o-aminofenoles, han mostrado que este tipo de sustratos sufren las mismas reacciones catalíticas (orto hidroxilación y oxidación) formando o-quinonaiminas. Llevándose a cabo los ciclos explicados en la figura 6.

1.2.3 APLICACIONES

En la naturaleza, la tirosinasa es ampliamente distribuida en microorganismos, plantas y animales. En los animales la enzima tiene una gran relevancia ya que es responsable del proceso de melanización. La formación de melanina produce la pigmentación oscura marronacea de los epitelios, y también la tinta de los calamares y pulpos. La enzima tirosinasa convierte el aminoácido tirosina en el pigmento oscuro e insoluble melanina. La melanina proporciona una pantalla protectora frente a la radiación solar.

En algunas plantas el efecto oxidativo (oscurecimiento o un color marrón) puede ser benéfico. Los productos de reacción, quinonas, son dañinas para las bacterias, y por tanto protege a los tejidos vegetales heridos o dañados de la invasión bacteriana. Sin embargo, en muchos casos esta oxidación enzimática puede ser indeseable por la secuela del color deteriorando algunas frutas y vegetales comerciales, modificando el aspecto y sabor de éstos provocando la pérdida económica en la industria alimenticia y agrícola.

El efecto de la oxidación enzimática, es prevenido ya sea inhibiendo la enzima o por adición de agentes reductores. Por otro lado, la tirosinasa cataliza la formación de homopolímeros a partir de fenoles, proporcionando aplicaciones para la producción de resinas fenólicas o en la manufactura de adhesivos, útiles para aplicaciones quirúrgicas.

Se han desarrollado una gran cantidad de métodos de inmovilización, un gran número de autores han utilizado estos métodos de inmovilización principalmente para la construcción de biosensores electroquímicos¹⁹⁻²³.

Debido a la especificidad de la tirosinasa y a su fuerte acción en medios no acuosos, se han desarrollado métodos para la determinación de compuestos fenólicos, basados en la construcción de sensores y biosensores empleando diferentes soportes de inmovilización. Dentro de estos soportes de inmovilización se han empleado hidrogeles, membranas, vidrio de poro controlado y polímeros²⁴⁻³⁵. Diseñados como ya se menciono anteriormente para la determinación de compuestos fenólicos específicamente para muestras de alimentos operando en sistemas no continuos (batch).

Razón por la cual, crece el interés del estudio del comportamiento de un sensor elaborado con tirosinasa inmovilizada en vidrio de poro controlado acoplado aun sistema de flujo continuo.

1.3 BIOSENSORES

Un biosensor químico está constituido por 2 componentes básicos en serie: un sistema químico y un transductor físico, el cual tiene como función relacionar la concentración de un analito a una señal eléctrica medible. El sistema químico utiliza un mecanismo bioquímico, es decir, contiene un componente biológico, generalmente inmovilizado como: enzimas células o anticuerpo ^{36,37}.

A partir del surgimiento de los métodos de inmovilización de enzimas y del conocimiento que las enzimas pueden funcionar en disolventes orgánicos. Se han desarrollado biosensores con el propósito de aumentar la selectividad y sensibilidad en la determinación de compuestos en diferentes matrices ³⁸⁻⁴².

1.3.1 MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

A partir del desarrollo de biosensores para la determinación de glucosa, se ha desarrollado un gran número de técnicas de inmovilización. El alto costo de las enzimas, son un obstáculo para su recuperación después de haber sido utilizadas. Al unir la enzima a un soporte insoluble permitiéndole conservar sus propiedades, le permite a la enzima poder ser reutilizable y de alguna manera reducir los costos.

Los métodos de inmovilización se pueden agrupar en cuatro técnicas: atrapamiento, formación de enlaces covalentes, adsorción y por entrecruzamiento con reactivos bio-multifuncionales ^{43,44}.

Inmovilización por atrapamiento.

Este método de inmovilización consiste en el atrapamiento de la enzima dentro de una estructura que la retiene, sin dejar que se escape, permitiendo la penetración del sustrato y la salida del producto. En este tipo de inmovilización son empleados diferentes soportes como: geles, fibras, precipitados de hidróxidos metálicos o membranas.

1.- Atrapamiento por geles: la enzima es atrapada en los espacios intersticiales del gel insoluble en agua. La estructura se puede preparar por polimerización, formación de redes iónicas o por precipitación.

a) Atrapamiento por polimerización: pueden emplear matrices como poliacrilamida, poliacrilonitrilo, poliuretano, poli-(vinilalcohol), membranas sol- gel o hidrogeles redox. La matriz se forma por entrecruzamiento de compuestos bifuncionales. Debido a que la polimerización es muy exotérmica, hay que controlar la temperatura para evitar dañar la enzima.

b) Atrapamiento por formación de redes iónicas: el gel se forma por polimerización de polielectrolitos mediante iones multivalentes (Ca o Al). El más utilizado es el alginato (β -D manuronato (M) y residuos de α - L- guluronato (G)). La solución de la enzima a inmovilizar se mezcla con una solución de alginato sódico, posteriormente inyectando dicha suspensión a una solución endurecedora de cloruro cálcico.

2.- Atrapamiento en fibra: consiste en disolver un polímero formado de fibra, como el triacetato de celulosa, en un disolvente orgánico inmiscible con el agua es emulsificado con una suspensión acuosa de células con glicerol. La emulsión es extraída con un líquido coagulante, como el tolueno, que precipita al polímero en forma filamentosa, junto con microgotas de suspensión celular que quedan atrapadas en la fibra.

3.- Atrapamiento en precipitados de hidróxidos metálicos: las sales más comúnmente utilizadas son de cloruro de Ti^{4+} o Zr^{4+} que se añaden a una solución acuosa del

componente biológico y dependiendo del pH se forman precipitados poliméricos gelatinosos de los hidróxidos metálicos en los cuales quedan atrapados los componentes biológicos. Los hidróxidos de Ti^{4+} son más efectivos a pH ácido y los de Zr^{4+} a pH neutro o alcalino. Este método es de bajo costo, de fácil preparación y con una capacidad para inmovilizar los componentes biológicos con alta retención de su actividad enzimática.

4.- Atrapamiento en membranas semipermeables, de ultra filtración o de películas con poro calibrado: las membranas son impermeables a los receptores biológicos, pero dejan pasar los productos y en algunos casos a los sustratos. Son muy adecuados para la conversión de sustratos de alto peso molecular, solubles o insolubles en agua. Se pueden controlar los productos y los sustratos según la selectividad de la membrana. La inmovilización por esta técnica es fácil de llevar a cabo. Se ha de situar tan sólo la suspensión celular a un lado de la membrana.

Inmovilización por enlace covalente

La inmovilización por enlace covalente consiste en el enlace directo de la enzima a un soporte activado. El enlace suele ser con algún componente reactivo de la superficie celular, como grupos amino, carboxilos, tiol, hidroxilo, imidazol de las proteínas. Se pueden emplear dos tipos de soporte: orgánicos e inorgánicos. Dentro de los soportes inorgánicos, el vidrio es el soporte comúnmente empleado. Generalmente, requiere de un tratamiento previo para generar grupos amino, a su vez son los que sirven de puentes de unión con las proteínas. Por otro lado, como soportes orgánicos los más usados son la celulosa por lo que la inmovilización de los componentes biológicos precisa de la formación de los grupos reactivos apropiados para la unión, con los grupos reactivos de las proteínas.

Inmovilización por adsorción

Al colocar una superficie limpia en una solución acuosa, las moléculas orgánicas se adsorben rápidamente a la superficie, formando una pequeña capa viscosa sobre la misma. Esta capa cambia completamente las propiedades de la superficie, haciéndola más accesible a los componentes biológicos. Éstos llegan a la superficie del soporte, bien por fuerzas dinámicas del fluido, por sedimentación o por difusión browniana. Una vez en la superficie, se adhieren, primero de una forma reversible por fuerzas de Van der Waals, electrostáticas o covalentes. Formando una biocapa. Cuando esta biocapa crece demasiado empieza a haber problemas de difusión del sustrato y de los productos. Por lo que al ser muy gruesa, el sustrato no llega al componente biológico. Para este tipo de inmovilización se han utilizado un amplio número de soportes inertes como: arena, alúmina y arcillas. Varios factores, como la composición del soporte, así como la porosidad, influyen significativamente.

Otro tipo de soportes son el empleo de resinas de intercambio iónico. La carga de la pared celular de los componentes biológicos depende principalmente de péptidos, ácido diaminopimélico y hexosamina. A pH normal, la mayoría de las células están cargadas negativamente y son atraídos por resinas aniónicas. El enlace depende del número de cargas superficiales, de la configuración específica de los lugares cargados y de la accesibilidad de estos grupos funcionales iónicos.

Inmovilización por entrecruzamiento con reactivos bi o multifuncionales

Los receptores biológicos son adheridos unos a otros por medios físicos o químicos. Generalmente se emplea glutaraldehído, el cual se enlaza con los grupos amino libres de los mucopéptidos de las paredes microbianas. Son enlaces irreversibles y sobreviven a pH y temperaturas extremas.

Otra forma es por floculación, empleando agentes floculantes como polielectrolitos catiónicos (poliamidas) o aniónicos (poliacrilamidas carboxil sustituidas).

1.3.3 SISTEMAS EN FLUJO-CONTINUO

Durante el desarrollo de la técnica de inyección en flujo, ha sido posible la resolución de problemas analíticos. Acoplar un reactor empacado con una enzima inmovilizada a una configuración FIA, ha aumentado el interés en el desarrollo de metodologías por esta técnica.

Por otro lado, la capacidad y facilidad de inmovilizar enzimas y mantener su actividad, ha permitido grandes ventajas en el desarrollo de los biosensores, en especial combinarlos con la técnica por inyección en flujo y principalmente aumentar su aplicación en disolventes orgánicos.

Desde un punto de vista analítico, la combinación física de las enzimas inmovilizadas y de los transductores ópticos para formar equipos de detección selectiva en los sistemas de inyección en flujo proporciona ciertas ventajas sobre otros sistemas.

La aplicación de las enzimas inmovilizadas a los sistemas de flujo continuo pueden ser acoplando el reactor enzimático a la configuración FIA o bien la enzima inmovilizada ser empacada en la misma celda de flujo en el detector: .

1) Sistemas de reactor enzima - detección óptica, el suceso bioquímico se lleva a cabo en un reactor enzimático, el cual se encuentra en el sistema de flujo continuo y posteriormente el producto es medido espectrofotométricamente (figura 7a).

2) Sistemas reactor enzima - sensor óptico, la enzima es inmovilizada en un reactor donde se va a llevar a cabo la reacción enzimática y el cual se encuentra antes del sensor óptico (fosforescencia a temperatura ambiente) en el sistema en flujo continuo. Una celda de flujo convencional es empacada con algún otro componente que va ser sensible al producto de la reacción enzimática (figura 7b).

3) Sistemas de flujo directo enzima - optosensor, en este tipo de sistemas tanto la enzima inmovilizada como otro compuesto inmovilizado sensible al producto de la reacción enzimática son empacados en la celda de flujo en el sistema en flujo-continuo (figura 7c).

Los sensores ópticos y biosensores electroquímicos para medio orgánico y la combinación de la técnica de inyección en flujo, son de gran interés para diversas áreas. Se ha favorecido el desarrollo de metodologías analíticas por diversas razones, por ejemplo: muchas muestras importantes de la industria alimenticia farmacéutica y petroquímica son muy hidrofóbicas y requieren de tediosas etapas de pretratamiento antes de su análisis. El acoplamiento de los biosensores y el análisis por inyección en flujo evitan la necesidad del tratamiento de la muestra y permiten un rápido análisis ⁴⁵⁻⁵².

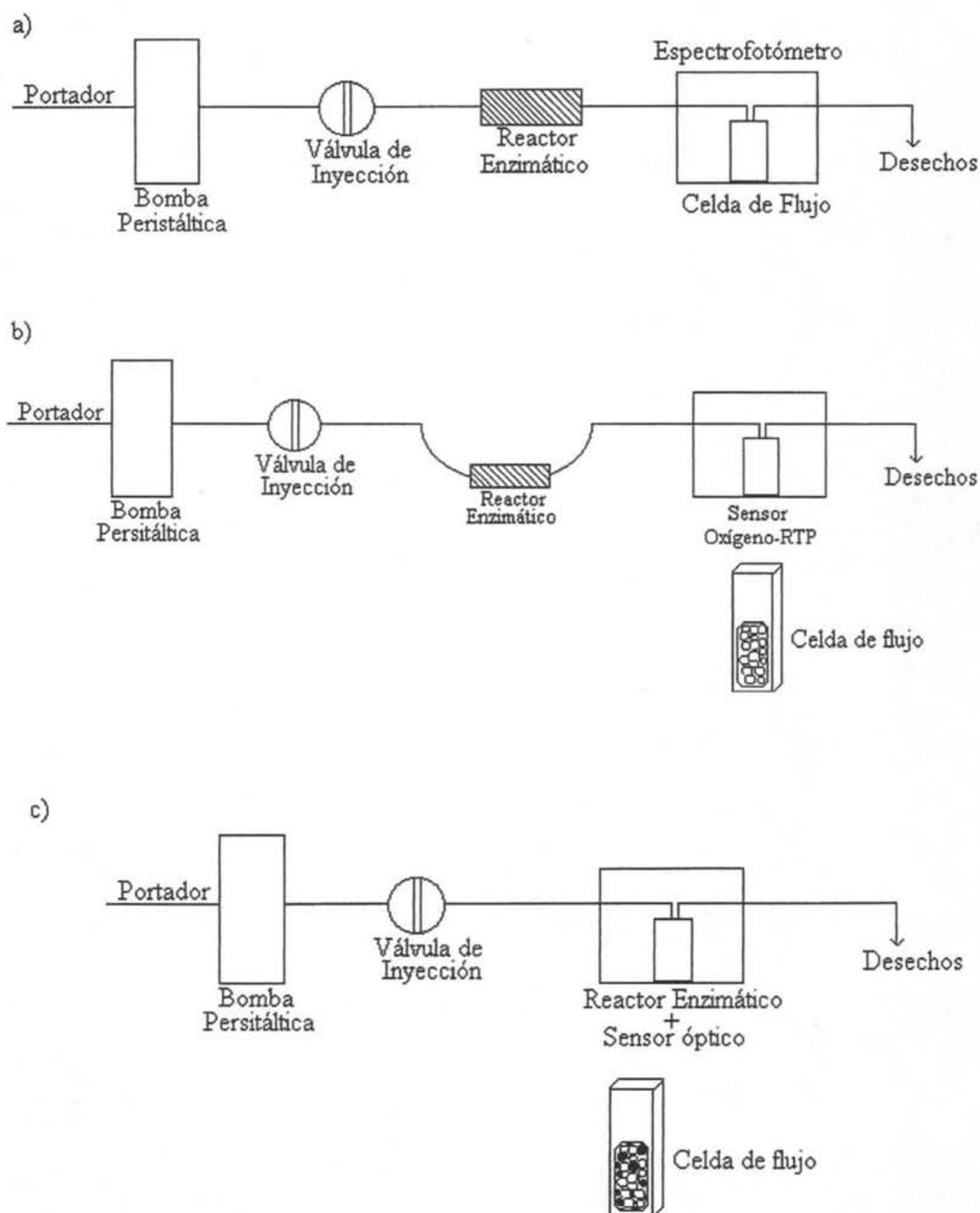


Figura 7. Diferentes sistemas para biosensores ópticos en flujo continuo. a) sistema reactor enzima - detección óptica, b) reactor enzima-sensor óptico y c) flujo directo enzima - optosensor.

En este trabajo, se realizó el estudio cinético de la tirosinasa inmovilizada, determinando la Constante de Michaelis–Menten (K_m) y la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$). Para llevar a cabo este estudio se inmovilizó la enzima empleando dos métodos de inmovilización: por enlace covalente usando como soporte vidrio de poro controlado y por atrapamiento en gel con alginato.

Una vez inmovilizada la tirosinasa, se evaluó la actividad aparente de la enzima en medio acuoso con disolución amortiguadora de fosfatos y en medio no acuoso se emplearon disolventes de diferente polaridad (heptano, hexano, cloroformo, etanol, isopropanol y acetonitrilo).

La actividad aparente de la enzima, se comparó por batch y por flujo-continuo. En un sistema en flujo continuo, se acopló un reactor enzimático (empacado con la tirosinasa inmovilizada), en ambos métodos el sistema de detección fue espectrofotométrico.

Con esta investigación se pretende determinar si la enzima al ser inmovilizada es capaz de mantener su actividad catalítica en medios no acuosos y en cual de estos presenta una mayor actividad. La finalidad principal de este proyecto es establecer las condiciones de reacción en medio acuoso y no acuoso para la tirosinasa y con ello desarrollar un método automático para la cuantificación de compuestos fenólicos en diferentes muestras de aceites, jugos, aguas, etc.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un reactor enzimático empacado con Tirosinasa que pueda reaccionar en un medio hidrofóbico utilizando una configuración de Análisis por Inyección en Flujo (FIA)

OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Inmovilizar la enzima Tirosinasa en vidrio de poro controlado (CPG). Comparar su comportamiento en Medio Acuoso y No Acuoso por medio de un sistema de flujo continuo (FIA) y un sistema no continuo (Batch)
- b) Estudiar la actividad de la Tirosinasa en diferentes disolventes orgánicos por FIA.
- c) Determinar las condiciones de reacción óptimas en medio acuoso y no acuoso de la enzima Tirosinasa inmovilizada en CPG en un sistema de flujo continuo.
- d) Evaluar el comportamiento cinético de la Tirosinasa inmovilizada mediante la determinación de la Constante de Michaelis- Menten (K_m) en Medio Acuoso y No Acuoso por FIA.
- e) Inmovilizar la tirosinasa en alginato y estudiar su comportamiento en medio acuoso y no acuoso por FIA.
- f) Evaluar y Comparar la actividad enzimática de la Tirosinasa inmovilizada en CPG y Alginato.

CAPÍTULO II

DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1 REACTIVOS Y DISOLUCIONES

Todos los reactivos y disolventes utilizados fueron grado analítico.

Tirosinasa (E:C 1.14.18.1) fungal, Sigma, con actividad específica de 2060 unidades/mg sólido

Perlas de vidrio de poro controlado (CPG) con un diámetro de 242°A, Sigma.

3-aminopropiltriethoxisilano de Aldrich

Glutaraldehído al 25% de Aldrich.

Ácido nítrico al 5%

Disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a diferentes pH (6.5 a 8.0)

Disolución amortiguadora de ácido acético/acetato 0.05 M pH=5.0.

Disolución madre de enzima tirosinasa de 86.68 u/mL.

Disolución de 3-aminopropiltriethoxisilano al 11%, añadiendo 5 ml de este compuesto a 45 ml de una disolución amortiguadora de ácido acético/acetato.

Disolución de alginato de sodio a una concentración de 33.46 mg/ml preparada en una disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH=7.0

Disolución de CaCl₂ a una concentración de 56.82 mM

Disoluciones de p-cresol preparadas en los disolventes a estudiar en un intervalo de 0.0055 – 8.22 mM.

Los disolventes orgánicos empleados fueron hexano con un 0.005% de agua , cloroformo con 0.006% de agua, heptano < 0.01% de agua, acetonitrilo, etanol e isopropanol.

2.2 INSTRUMENTACIÓN.

Espectrofotómetro UV-VIS de doble haz Cary 1 Varian, equipado con una celda de flujo de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

Bomba peristáltica de 4 canales marca Gilson Minipuls 3.

Mangueras para bomba peristáltica

Botella de desplazamiento

Válvula de inyección de baja presión de 6 puertos Rheodyne

Reactor tubular de teflón.

Reactor de vidrio de 0.3 mm de diámetro interno con una longitud de 5.0 cm.

2.3 METODOLOGÍA

2.3.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA TIROSINASA EN DISOLUCIÓN.

Se preparó una disolución madre de tirosinasa, disolviendo 1.052 mg de enzima en 25 ml de una disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH = 7.0. La actividad de ésta disolución es de 86.68 u/ml.

La actividad de la enzima se determinó usando como sustrato p-cresol a una concentración de 0.148 mM.

Se colocaron 5 ml de la disolución del p-cresol en un vaso de precipitado al que se le adicionaron 500 μ l de la disolución enzimática (86.68 u/ml) dejando reaccionar durante 30 minutos con agitación suave. Transcurrido este tiempo la actividad de la enzima tirosinasa se midió espectrofotométricamente a una λ de 400 nm.

La actividad de la enzima se calculó de acuerdo a la definición de una unidad de actividad para tirosinasa: $\Delta A = 0.001$ por minuto

2.3.2 INMOVILIZACIÓN POR ENLACE COVALENTE

INMOVILIZACIÓN EN CPG

La inmovilización de la enzima tirosinasa se llevó a cabo mediante la formación de enlaces covalentes directamente de la enzima con un soporte activado. Como soporte se empleó vidrio de poro controlado (CPG) el cual se sometió a un tratamiento previo antes de fijar la enzima⁵³:

Limpieza del Vidrio

A 200 mg de vidrio de poro controlado se le adicionaron 30 ml de ácido nítrico al 5%. Se calentó a ebullición cubriendo el vaso de precipitado con un vidrio de reloj, durante 30 minutos y con agitación magnética. Se enfrió a temperatura ambiente y se filtró al vacío, se lavó con suficiente agua destilada hasta eliminar los residuos de ácido y se secó a una temperatura de 95°C durante toda la noche.

Activación del Vidrio

La activación del vidrio consiste en dos etapas:

a) Silanización:

En primer lugar, se preparó la disolución del silanizante. A 45 ml de una disolución amortiguadora de acético/acetato 0.05 M pH = 5.0 se le adicionaron 5 ml de 3-aminopropiltrietoxisilano. El vidrio previamente limpio y seco se agregó a la disolución del silanizante, se calentó a baño maría a 90°C durante 2 horas y con agitación. Transcurrido este tiempo, se dejó enfriar la disolución a temperatura ambiente y posteriormente se filtró

a través de una placa porosa. Se lavó con suficiente agua destilada y se secó a 95°C. El vidrio ya silanizado y seco puede guardarse por tiempo indefinido protegido de la luz.

b) Acoplamiento con Glutaraldehído.

Al vidrio de poro controlado ya silanizado y seco se le adicionaron 10 ml de una disolución de glutaraldehído al 25%. Esta mezcla se dejó en agitación suave durante dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente, el vidrio con glutaraldehído se dejó secar en la estufa a una temperatura de 75°C durante una hora.

El vidrio ya activado se almacenó en un frasco de color ámbar para protegerlo de la luz hasta su uso.

Inmovilización de la Enzima Tirosinasa

Se pesaron 3.237 mg de enzima tirosinasa y se disolvieron en 2 ml de buffer de una disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH= 7.0. A 0.2 g de vidrio activado se les agregaron la disolución de la enzima, la mezcla se colocó en un baño de hielo y se dejó durante 6 horas aproximadamente, agitando ocasionalmente. Después de este tiempo la enzima, ya inmovilizada, se lavó primeramente con agua destilada y posteriormente con disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH = 7.0. Se almacenó en un frasco de color ámbar y en disolución amortiguadora de fosfatos a una temperatura de 4°C hasta su uso.

2.3.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD APARENTE DE LA ENZIMA TIROSINASA INMOVILIZADA EN CPG POR BATCH

Para la determinación de la actividad enzimática se prepararon disoluciones madre de p-cresol en una disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH=7.0 y para cada uno de los disolventes evaluados (hexano, cloroformo, acetonitrilo, etanol, isopropanol y heptano) a una concentración en promedio de 5.0 mM. De cada una de las disoluciones se tomaron alícuotas de 5 ml y se adicionaron en promedio 20 mg de enzima tirosinasa inmovilizada previamente seca; la mezcla se dejó en agitación suave a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente se filtró y se midió su absorbancia para determinar la actividad aparente en cada medio de reacción estudiado.

2.3.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD APARENTE DE LA ENZIMA TIROSINASA INMOVILIZADA EN CPG POR FIA

El reactor enzimático utilizado consistió de un trozo de tubo de teflón empacado con 23.7 mg de tirosinasa inmovilizada. La actividad aparente fue determinada tanto para medio acuoso como no acuoso empleando las siguientes configuraciones:

a) Medio acuoso: la muestra se inyecta por medio de la válvula de inyección (VI) en el portador (disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH=7.0) y por medio de éste se transporta a través del sistema pasando primero por el reactor enzimático (RE) donde se lleva a cabo la reacción, posteriormente el producto de reacción llega al sistema de detección (D) donde se mide espectrofotométricamente a 400 nm (figura 8)

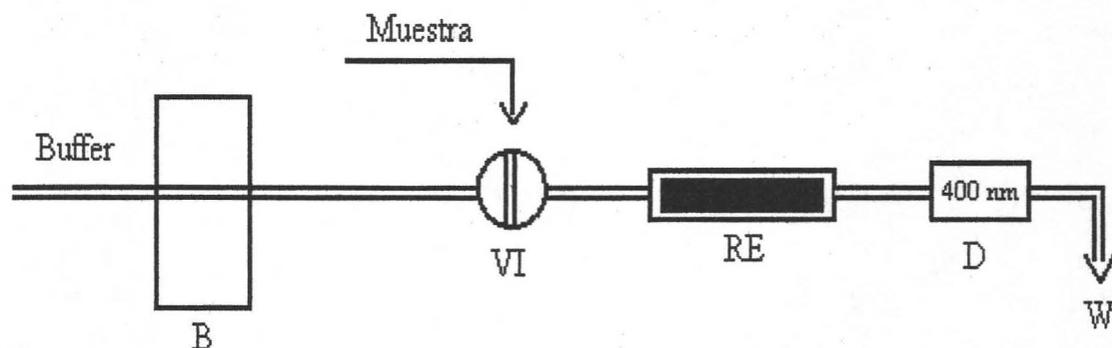


Figura 8. Configuración FIA utilizada para el estudio de la actividad de la tirosinasa en medio acuoso. B: bomba peristáltica para el portador (disolución amortiguadora de fosfatos) a un flujo de 03 ml/min, Muestra: 100 μ l de una disolución de p-cresol, VI: válvula de inyección, RE: reactor enzimático (23.7 mg de CPG-tirosinasa); D: detector a $\lambda_{\text{máx}} = 400$ nm y W: desechos.

b) Medio no acuoso: por medio de la bomba peristáltica (B) se pasa agua a una botella de desplazamiento donde se encuentra el disolvente orgánico a estudiar, (cloroformo, hexano y heptano) al momento de entrar el caudal de agua a la botella el disolvente orgánico sale hacia el sistema de reacción al mismo caudal con el que entró el flujo de agua. Por medio de la válvula de inyección (VI) la muestra se inyecta en el portador (disolvente orgánico) que la transporta al reactor enzimático donde se lleva a cabo la reacción. Finalmente el producto de la reacción llega al sistema de detección donde se mide a 380 nm.

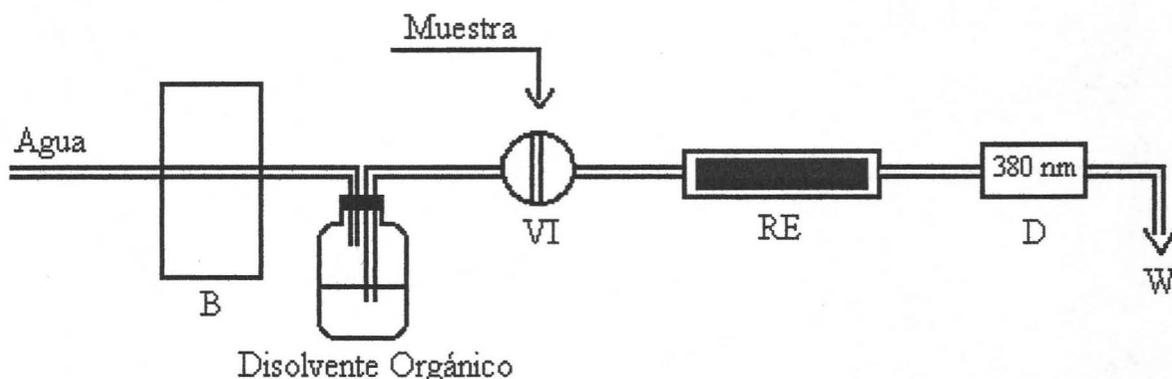


Figura 9. Configuración FIA para la determinación de la actividad de la tirosinasa en medio no acuoso. B: bomba peristáltica para el portador (disolvente orgánico) a un flujo de 0.3 ml/min, Muestra: 100 μ l de disolución de p-cresol, VI: válvula de inyección, RE: reactor enzimático; D: detector a $\lambda_{\text{máx}} = 380$ nm y W: desechos.

2.3.5 DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE APARENTE DE MICHAELIS – MENTEN (K_m') Y LA VELOCIDAD INICIAL MÁXIMA POR FIA

A partir de una disolución madre de p-cresol se prepararon disoluciones estándar en una disolución amortiguadora de fosfatos y en cada uno de los disolventes orgánicos en un intervalo de 0.0055 a 2.79 mM. En el caso del medio no acuoso la cantidad de agua presente en el sistema dependió del disolvente en estudio. Cada una de estas disoluciones fueron inyectadas por triplicado utilizando las configuraciones mostradas en la figura 8 y 9.

Para calcular la constante de Michaelis – Menten y la velocidad inicial máxima se empleó el método propuesto por Lineweaver – Burk, es decir, graficando el inverso de la velocidad inicial máxima como una función del inverso de la concentración del sustrato.

2.3.6 INMOVILIZACIÓN POR ATRAPAMIENTO

INMOVILIZACIÓN CON ALGINATO

En un vaso de precipitados, se disolvieron 0.5020 g de alginato de sodio, en 15 ml de una disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH= 7.0, la disolución se agitó magnéticamente y una vez disuelto todo el alginato se colocó en el ultrasonido para desaerear hasta la eliminación total de las burbujas de aire.

Por otro lado, se disolvieron 1.058 mg de enzima tirosinasa en 1.0 ml de disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH = 7.0. Esta disolución se agregó al alginato ya sin burbujas agitando magnéticamente y muy suave.

La disolución anterior enzima – alginato se inyectó goteando sobre una disolución de CaCl_2 a una concentración de 56.82 mM, agitando suavemente, obteniendo así esferas uniformes. Las esferas obtenidas de enzima – alginato se lavaron con agua y se guardaron en la misma disolución de CaCl_2 a una temperatura de 4°C aproximadamente.

2.3.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA TIROSINASA INMOVILIZADA EN ALGINATO POR BATCH

A 5 ml de una disolución de p-cresol a una concentración de 5.6 mM en disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH= 7.0, se le adicionaron 15 esferas de enzima – alginato. La disolución se agitó magnéticamente durante un periodo de 30 minutos a temperatura ambiente. El peso de las esferas de enzima – alginato deshidratadas fue de 11.2 mg.

En medio no acuoso la determinación se realizó empleando 5 ml de una disolución de p-cresol a una concentración de 5.44 mM en hexano, en este medio el experimento se

realizó a 5 tiempos diferentes, lavando con el mismo disolvente entre cada determinación. Posteriormente para cada medio se determino la actividad aparente.

2.3.8 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD APARENTE DE LA ENZIMA TIROSINASA INMOVILIZADA EN ALGINATO POR FIA

Se preparó un reactor enzimático empacando un tubo de vidrio de 3 mm de diámetro interno y 5 cm de largo con las esferas de enzima – alginato. El reactor enzimático se acoplo a la configuración de la figura 9.

La determinación por FIA se realizó de la misma forma que cuando se utilizó el reactor enzimático empacado con la enzima inmovilizada en CPG. Los resultados se compararon con los obtenidos cuando la enzima se inmovilizó en CPG.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA TIROSINASA EN DISOLUCIÓN.

Medio Acuoso (disolución amortiguadora de fosfatos)

Una de las principales propiedades de la tirosinasa es la regioselectividad que presenta hacia numerosos compuestos monofenólicos y o-difenólicos, los cuales han sido usados para estudiar su comportamiento enzimático.

Algunas de estas investigaciones han sido enfocadas al estudio de la actividad monocresolasa de la tirosinasa a través de la medición de la hidroxilación de este tipo de compuestos en medio acuoso como no acuoso. Se han reportado los efectos que tienen estos compuestos en la actividad de la tirosinasa, realizando comparaciones de sensibilidad, intervalos lineal y límites de detección. Los resultados obtenidos han mostrado que las mejores respuestas han sido cuando se empleó como sustrato p-cresol.^{14,17,28,29}

Tomando como referencia estos estudios, se seleccionó al p-cresol como sustrato para el estudio de la actividad enzimática de la tirosinasa.

Se preparó una disolución de p-cresol a una concentración de 0.148 mM en una disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH = 7.0. A esta disolución se le midió su espectro de absorción (figura 10) obteniendo un máximo de absorbancia a 280 nm. Posteriormente se adicionaron 500 μ l de la disolución madre de tirosinasa con una actividad de 86.68 u/mL. La mezcla se agitó y se determinó su espectro de absorción en un intervalo de 200 a 900 nm considerando esta primera lectura como el tiempo cero ($t = 0$). Se dejó reaccionar agitando ocasionalmente y realizando lecturas cada 10 minutos hasta un tiempo total de 30 minutos. A los 30 minutos de reacción la disolución presentó un color amarillo y al medir su espectro de absorción se obtuvo un máximo de absorbancia a 400 nm como se observa en la figura 11.

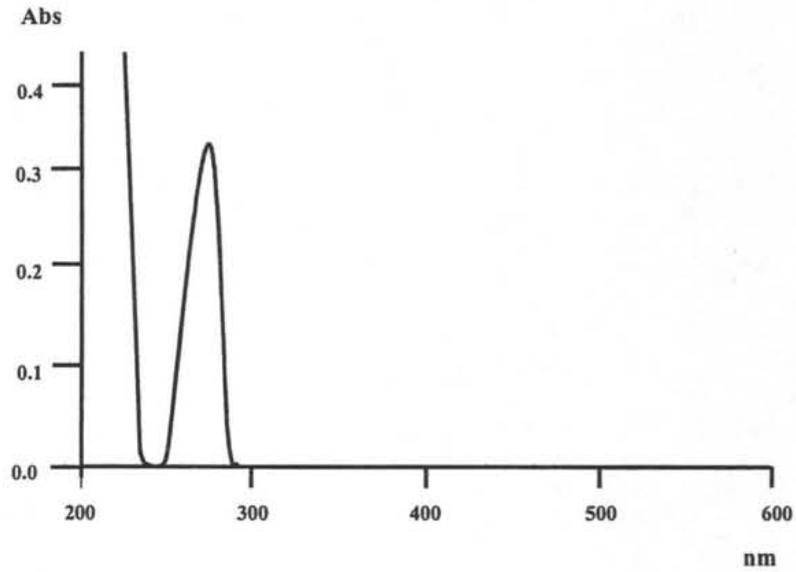


Figura 10. Espectro de UV-VIS correspondiente al p-cresol a una concentración de 0.148 mM en buffer de fosfatos 0.1 M pH = 7.0

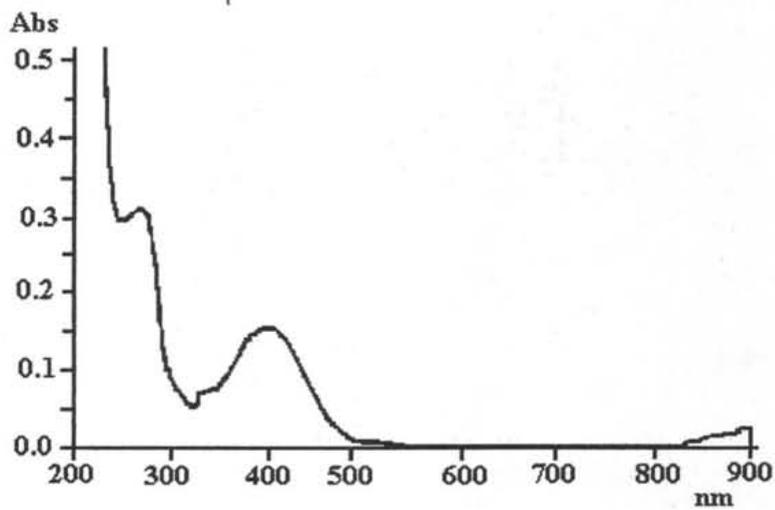
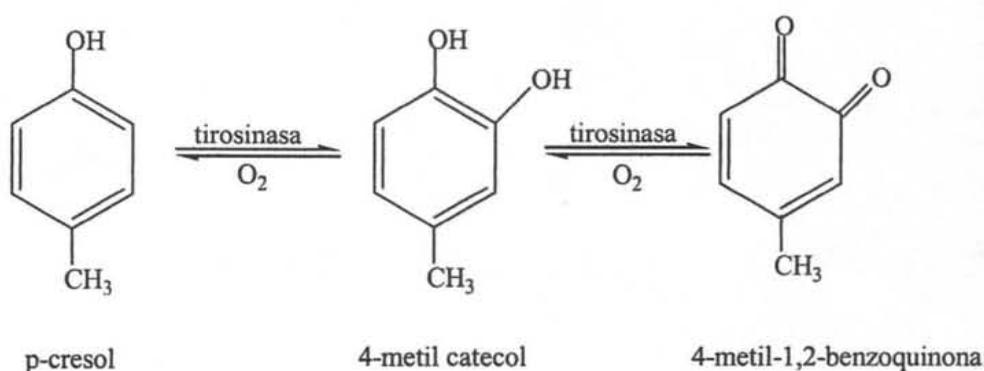


Figura 11. Espectro de UV-VIS de la 4 -metil - 1,2 - benzoquinona a 400 nm. Reacción enzimática de la tirosinasa en disolución con el p-cresol a una concentración de 0.148 mM en buffer de fosfatos 0.1 M pH = 7.0

Estos espectros de absorción comprueban que se está llevando a cabo la reacción enzimática, es decir, de acuerdo a las propiedades de la enzima anteriormente mencionadas, la tirosinasa, en presencia de oxígeno, hidroxila al p-cresol en posición orto al grupo hidroxilo formando así el 4-metil catecol y posteriormente éste es oxidado para producir 4-metil-1,2-benzoquinona, como se observa en la siguiente reacción:



Reacción 3. Catálisis enzimática de la enzima Tirosinasa con p-cresol como sustrato.

La 4-metil-1,2-benzoquinona es el responsable del color de la disolución y del incremento de absorción a una $\lambda = 400 \text{ nm}$. Al llevarse a cabo la reacción enzimática con el p-cresol se esperaría que la señal analítica a 280 nm disminuyera como consecuencia del p-cresol que no reaccionó. Sin embargo, se observa que hay un pequeño aumento de absorción a ésta longitud de onda (figura 12). Durante el proceso de la reacción se forma 4-metil catecol, compuesto que también absorbe a esa misma longitud de onda, motivo por el cual existe un aumento de absorción a 280 nm.

La actividad de la enzima se calculo empleando la ecuación 3.1. La enzima tirosinasa en disolución, bajo estas condiciones de trabajo, presentó una actividad de 246.039 u/mg de enzima (o 10.35 u/ml):

$$AE = \left(\frac{\Delta A/t}{0.001} \right) * f / E \quad (3.1)$$

donde:

AE = actividad de la enzima

ΔA = absorbancia

t = tiempo (minutos)

f = factor de dilución

E = cantidad de enzima (mg)

La actividad especifica obtenida es menor con respecto a la reportada por el proveedor (2060 u/mg). Esta actividad reportada por el proveedor fue determinada empleando como sustrato tirosina, lo cual explica la diferencia con el valor obtenido.

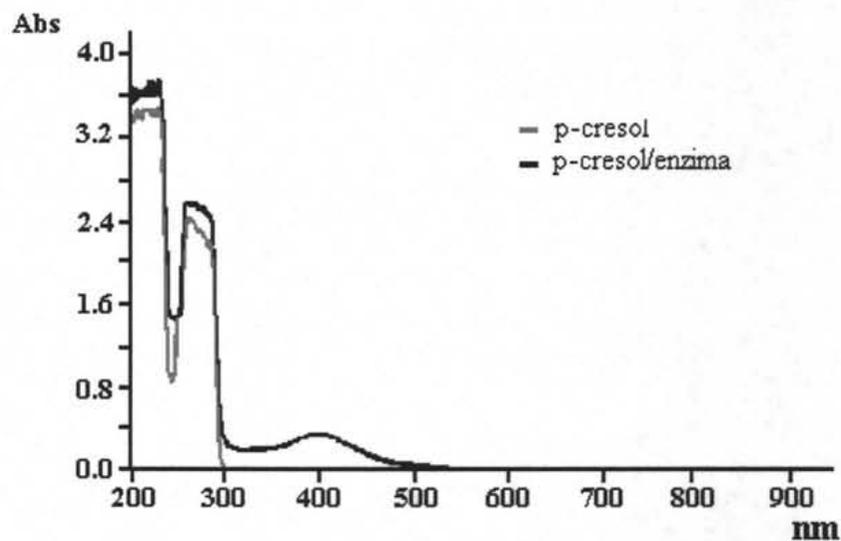


Figura 12. Comparación del espectro de absorción de la catálisis enzimática del p-cresol a 4 – metil – 1,2 – benzoquinona (—) contra una disolución de p-cresol en buffer de fosfatos (—)

Medio no acuoso (hexano)

500 uL de la disolución de tirosinasa con actividad de 86.68 u/mL fueron adicionados a 5 ml de una disolución de p-cresol (0.154 mM) en hexano, observando dos fases. Después de 30 minutos la fase orgánica presentó un color amarillo.

Para demostrar que la reacción enzimática puede ocurrir en un medio orgánico, se planteó la siguiente hipótesis: en este sistema bifásico, donde la enzima se encuentra disuelta en la fase acuosa y el sustrato en el disolvente orgánico, la reacción se lleva a cabo en el sistema acuoso / orgánico originando que el p-cresol sea convertido por la enzima a la 4 -metil -1,2-benzoquinona y provocando que el equilibrio de la reacción se desplace hacia el producto. Por lo tanto, al ser el producto de la reacción poco soluble en agua se disuelve preferentemente en el disolvente orgánico demostrándose por el color amarillo en la fase orgánica.

El espectro de absorción se midió y se observó un incremento de absorción a 380 nm. La actividad de la enzima calculada en este medio es de 50.33 u/mg (2.118 u/ml).

3.2 INMOVILIZACIÓN POR ENLACE COVALENTE

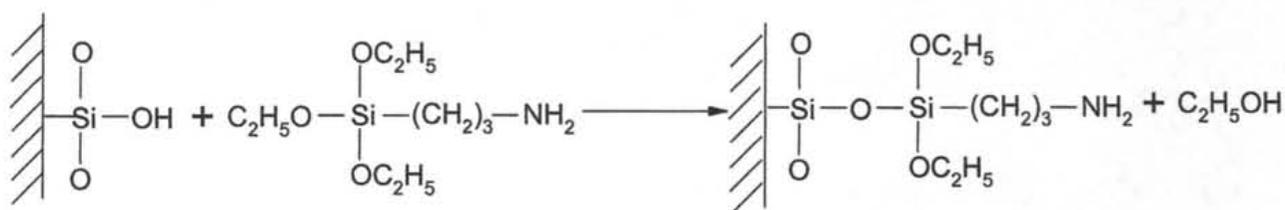
3.2.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD APARENTE DE LA ENZIMA TIROSINASA INMOVILIZADA EN CPG POR BATCH

El objetivo principal de este ensayo es demostrar que la enzima tirosinasa puede trabajar en un medio totalmente hidrofóbico.

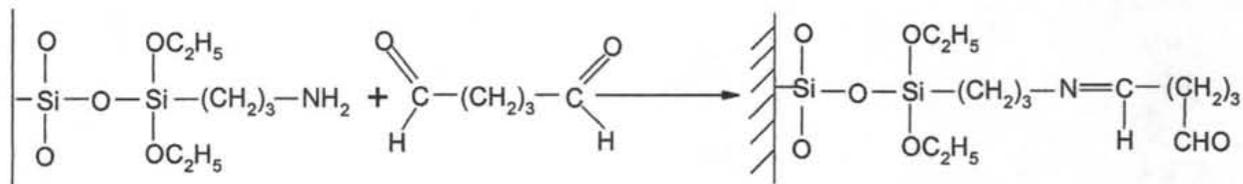
Para conservar la integridad y actividad de la enzima y dar una mayor resistencia a la desactivación por efecto de los disolventes orgánicos, la enzima fue inmovilizada covalentemente como se describe en la sección 2.3.2. Empleando como matriz vidrio de poro controlado CPG (reacción 4) con el propósito de que quede intacta bajo condiciones

que puedan provocar su desnaturalización. La unión covalente se basa en la activación de grupos químicos del soporte con el 3-aminopropiltrietoxisilano para generar grupos amino que son los que van a servir de puente unión (a) con el glutaraldehído para la formación de los grupos reactivos apropiados para la unión con los grupos reactivos de la enzima (b). Así el vidrio previamente activado contiene grupos carboxílicos que son los que van a servir de puente de unión para fijar la enzima (c)

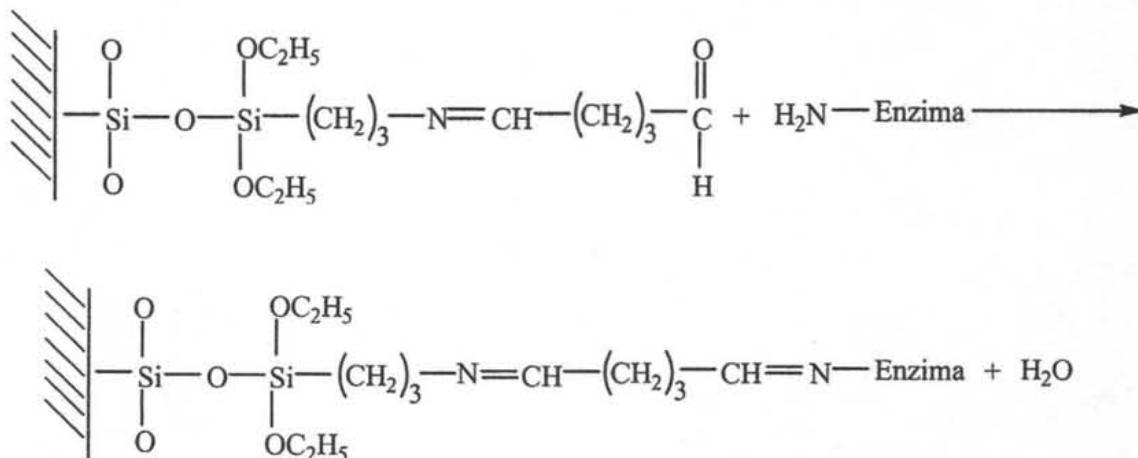
a) Silanización:



b) Acoplamiento con Glutaraldehído:



c) Inmovilización de la Enzima:



Reacción 4. Mecanismo de inmovilización de la enzima tirosinasa

Durante el proceso de inmovilización, el agua presente forma una capa de hidratación hermética alrededor de la molécula de la enzima. Así la actividad de la enzima no se ve afectada por el disolvente orgánico a menos que la capa de agua sea eliminada.

Si el total de la enzima queda inmovilizada en el vidrio de poro controlado, la actividad de la enzima inmovilizada sería de 32.962 u/mg de vidrio con un rendimiento de inmovilización del 98.86%.

La actividad aparente de la enzima inmovilizada fue determinada espectrofotométricamente en medio acuoso y no acuoso.

Medio acuoso

El estudio se realizó usando una disolución de p-cresol a una concentración de 7.33 mM en una disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH = 7.0. Se adicionó la enzima inmovilizada y se agitó suavemente. A los 30 minutos de reacción la disolución adquirió un color amarillo; al medir el espectro de absorción en un intervalo de 250 a 600 nm se observó un máximo de absorción a una longitud de onda de 400 nm.

Por otro lado, se hizo un blanco para comprobar que efectivamente la señal de absorción correspondiera a la formación de la 4-metil-1,2-benzoquinona y no a alguna interferencia proveniente de la misma enzima inmovilizada que pudiera estar absorbiendo a esta misma longitud de onda. El blanco se preparó pesando 20 mg de tirosinasa inmovilizada, se adicionaron 5 ml de disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH=7.0. La disolución se dejó reaccionar durante 30 minutos con agitación magnética; posteriormente se determinó su espectro de absorción. Comparándolo con el de la muestra anterior observamos que el blanco no presenta señal de absorción a la longitud de onda de trabajo, el máximo de absorbancia obtenido a 400 nm corresponde al producto de la reacción entre la enzima y el sustrato (figura 13)

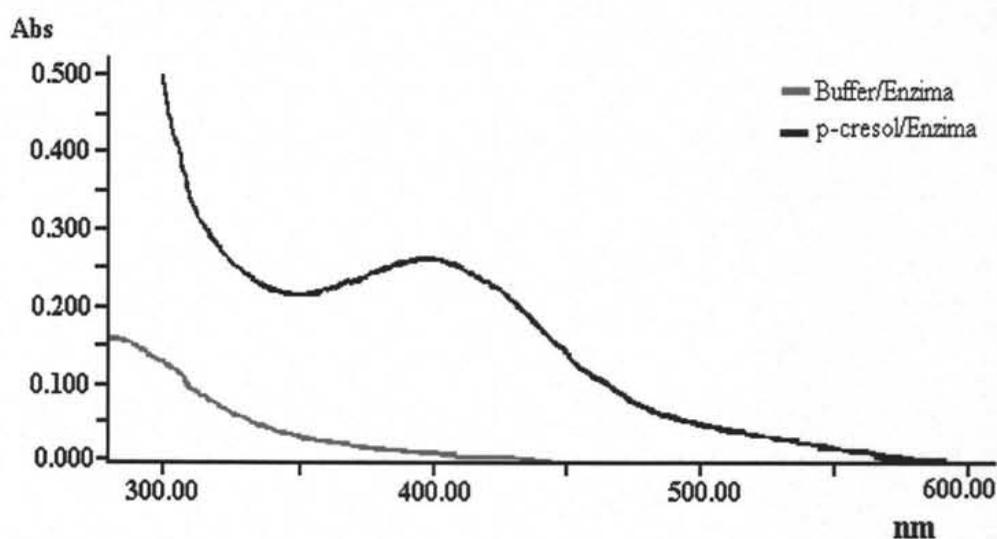


Figura 13. Catálisis enzimática del p-cresol por la enzima tirosinasa en CPG en buffer de fosfatos (—). Blanco: buffer de fosfatos 0.1 M pH = 7.0 con enzima inmovilizada en CPG (—)

Medio no acuoso

Para determinar la actividad aparente de la enzima en CPG en medio no acuoso se emplearon disolventes de diferentes polaridades: no polares, polares y de polaridad intermedia: heptano, hexano, cloroformo, etanol, isopropanol y acetonitrilo.

Este estudio fue realizado en primer lugar con aquellos disolventes con características no polares como hexano (0.006% de agua) y heptano (0.01% de agua), usando disoluciones de p-cresol preparadas en estos disolventes. La determinación se realizó de la misma manera que en medio acuoso. Después de 30 minutos de reacción se observó un color amarillo claro y su absorbancia fue medida en un intervalo de 200 a 600 nm obteniendo un máximo a 380 nm para ambos disolventes.

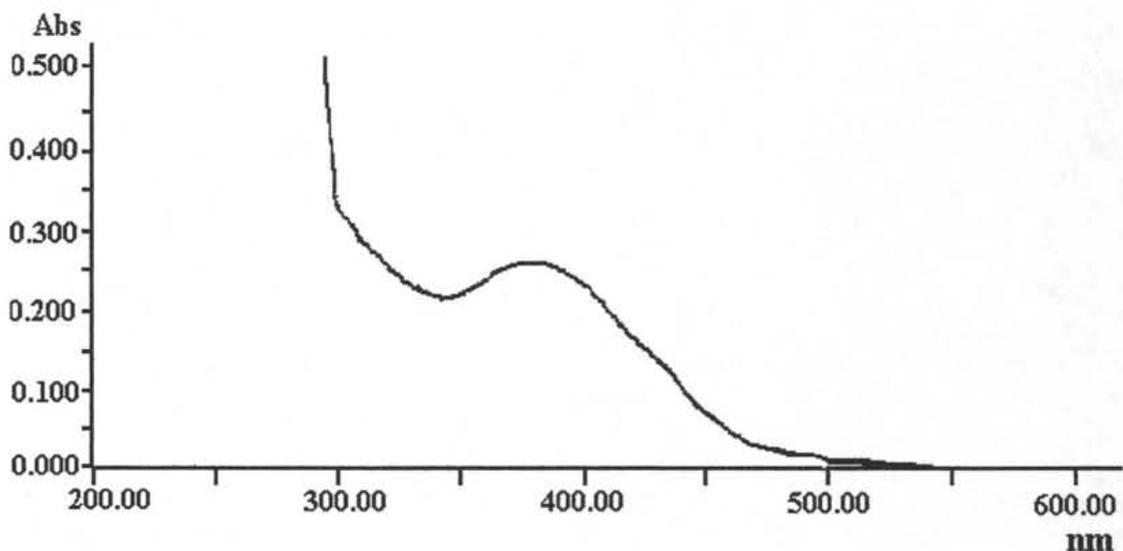


Figura 14. Catálisis enzimática del p-cresol en heptano por la tirosinasa inmovilizada en CPG.
Máximo de absorbancia a 380 nm de la 4-metil-1,2-benzoquinona

En el caso del cloroformo (con un 0.005% de agua), disolvente con características también no polares, pero que en comparación con el hexano y heptano se considera como un disolvente más polar. La señal obtenida fue muy pequeña por lo que se dejó 2 horas más reaccionando, con el propósito de aumentar la señal. Sin embargo, ésta no aumentó.

El estudio en acetonitrilo, disolvente con polaridad intermedia, después de 30 minutos se tomó la lectura de absorbancia sin ningún resultado. De la misma forma que para el cloroformo, se dio más tiempo a la reacción hasta un tiempo total de 4 horas, tiempo en que se observó que la disolución presentó un color amarillento y con un máximo de absorbancia también a 380 nm.

Finalmente, el estudio efectuado con etanol e isopropanol no fueron satisfactorios, ya que en ningún momento hubo aumento de la señal analítica a 380 nm. Ambos disolventes son considerados como hidrofílicos, pueden deshidratar la enzima eliminando la capa superficial de agua que la envuelve cuando se lleva a cabo la inmovilización.

La actividad aparente de la enzima inmovilizada, se calculó para cada una de las pruebas realizadas tanto en medio acuoso como no acuoso empleando la siguiente ecuación. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 1.

$$AE = \left[\frac{\Delta A / t}{0.001} \right] / E \quad (3.2)$$

donde:

AE = actividad enzimática

ΔA = absorbancia

t = tiempo (minutos)

E = enzima inmovilizada en el soporte (mg)

Tabla 1. Actividad aparente por batch de la enzima Tirosinasa
inmovilizada en CPG

Disolvente	Actividad u/mg de soporte (CPG)	Log P
Buffer de Fosfatos	0.4155	-
Acetonitrilo	0.00304	-0.33
Cloroformo	0.0379	2.0
Hexano	0.0830	3.5
Heptano	0.4187-	4.0

Los resultados obtenidos muestran, que a medida que la polaridad del disolvente aumenta, la actividad de la enzima disminuye. Los disolventes muy polares, como el etanol e isopropanol son capaces de absorber el agua y eliminar la capa de hidratación de la enzima, ocasionando la pérdida de sus propiedades catalíticas. Sin embargo, los disolventes hidrofóbicos o no polares no tan fácilmente eliminan el agua de la enzima manteniendo así su capa de hidratación. Es decir, son menos capaces de afectar su actividad catalítica. La tirosinasa presenta una mejor actividad en heptano y hexano, mientras que en etanol e isopropanol provocan una deshidratación en la enzima disminuyendo o eliminando su actividad catalítica.

Por otra parte, la actividad de la enzima se puede relacionar con el coeficiente de partición, es decir, $\log P$ (coeficiente de partición del disolvente entre el octanol y el agua) el cual es un parámetro que se ha introducido como una medida cuantitativa de la polaridad del disolvente. De acuerdo a la literatura, aquellos disolventes que presentan un $\log P < 2$ la actividad enzimática es baja, en disolventes con un $\log P$ entre 2 y 4 la actividad enzimática es moderada y en aquellos con un $\log P > 4$ la actividad es alta. En la tabla 1 se anexaron los valores de $\log P$ reportados en la literatura de los disolventes estudiados, mostrando así que para el heptano, hexano y cloroformo la actividad de la enzima es moderada. Sin

embargo, haciendo una comparación entre los tres la compatibilidad de la enzima es mejor con el heptano y hexano, con un log P mayor, que con el cloroformo.

El etanol donde no hubo reacción enzimática presenta un log P negativo, lo que indicaría una actividad baja. En este caso no se observa actividad posiblemente porque absorbe el agua esencial de la enzima provocando su inactivación. No obstante, la enzima presentó actividad muy pequeña en acetonitrilo a pesar de tener un log P también negativo, comparándolo con el del etanol el log de P es un poco mayor, lo que significa que la reacción tiene lugar pero es muy lenta y por lo tanto su actividad es muy baja. Podemos pensar que por ser de polaridad intermedia el tiempo de deshidratación es lento.

3.2.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD APARENTE DE LA ENZIMA TIROSINASA INMOVILIZADA EN CPG POR FIA

Para determinar la actividad enzimática por FIA fue necesario optimizar los parámetros químicos e hidrodinámicos del sistema en cada uno de los medios de reacción estudiados.

Optimización de los Parámetros Hidrodinámicos y Químicos

Medio Acuoso

Para la determinación de la actividad aparente por Análisis por Inyección en Flujo, se construyó un reactor enzimático empacando la enzima inmovilizada en una columna de teflón de aproximadamente 1.5 cm de largo y 2 mm de diámetro interno y se acopló a la configuración FIA (figura 8). Las variables hidrodinámicas y químicas estudiadas fueron: pH, temperatura caudal y volumen de inyección de la muestra con el fin de optimizar los valores para obtener la mayor actividad.

El estudio se realizó inyectando una disolución de p-cresol por triplicado para cada análisis a una concentración de 2.88 mM la cual se preparó en una disolución amortiguadora de fosfatos. La detección se realizó a una $\lambda = 400$ nm.

pH:

El pH es un parámetro crítico para la actividad de una enzima ya que la estabilidad de ésta va depender del pH en el que se encuentre. El efecto del pH en la actividad del reactor enzimático se estudió empleando disoluciones amortiguadoras de fosfatos 0.1 M a diferentes valores de pH (6.5 a 8.5) El reactor enzimático presentó su mejor comportamiento a un valor de pH de 7.5. A pH's menores y mayores de este valor la señal analítica disminuyó (figura 15).

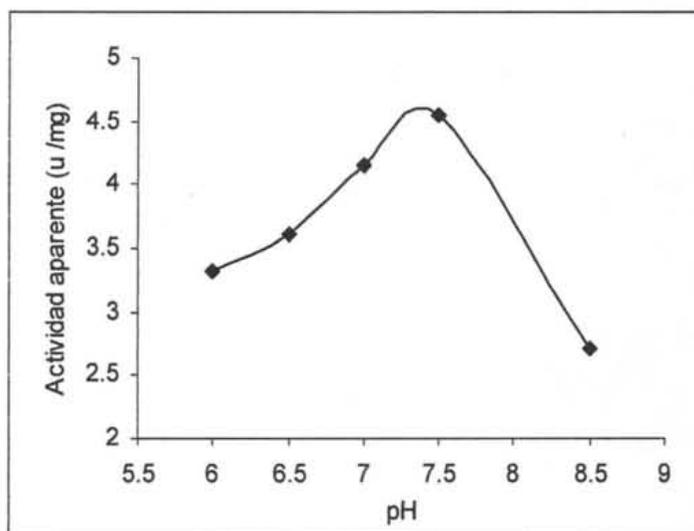


Figura 15. Efecto del pH en la actividad de la Tirosinasa inmovilizada en CPG

Temperatura:

Un estudio sobre el efecto de la temperatura sobre la enzima inmovilizada se llevó a cabo en un intervalo de 25°C a 40°C como se muestra en la figura 16. La sensibilidad analítica fue mayor a temperatura ambiente ya que a medida que la temperatura aumentó se vio afectada tanto la estabilidad de la línea base como la forma del pico, resultando picos dobleteados y de menor tamaño.

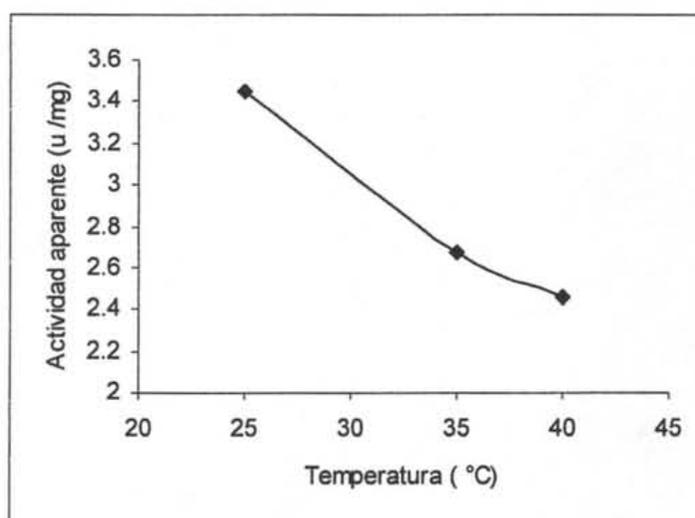


Figura 16. Efecto de la temperatura en la actividad de la tirosinasa inmovilizada en CPG

Caudal:

Un comportamiento similar al de la temperatura se observó con el caudal. Se estudio en un intervalo de 0.3 a 1.0 ml/min, encontrando la máxima respuesta a un caudal de 0.3 ml/min. A medida que la velocidad del flujo aumenta, la señal analítica correspondiente al producto de la reacción de la enzima disminuye, lo que nos indica que el tiempo de contacto entre la enzima y el sustrato no es suficiente (figura 17).

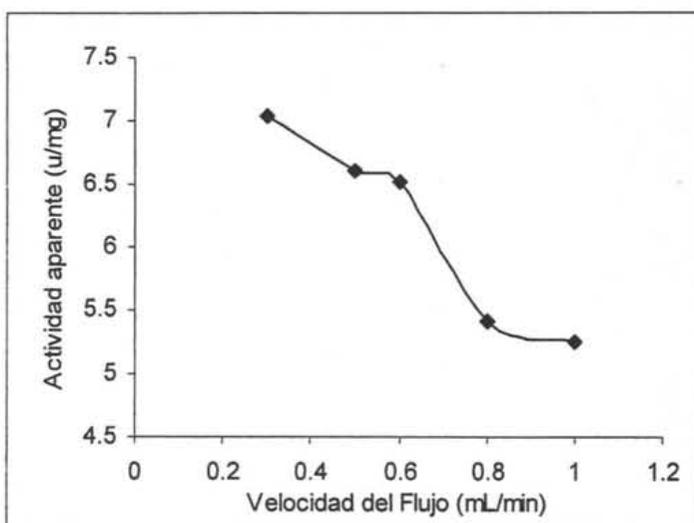


Figura 17. Efecto del caudal en la actividad de la tirosinasa inmovilizada en CPG.

Volumen de Inyección:

Se inyectaron diferentes cantidades de muestra (50 a 250 μ l). La señal analítica más alta se encontró al inyectar 100 μ l. Por encima de este valor la señal analítica se mantuvo constante pero se obtenían picos más anchos y por lo tanto una frecuencia de muestreo menor (figura 18).

En la tabla 2 se resumen las condiciones óptimas de trabajo para la determinación de la actividad aparente de la tirosinasa en medio acuoso por FIA.

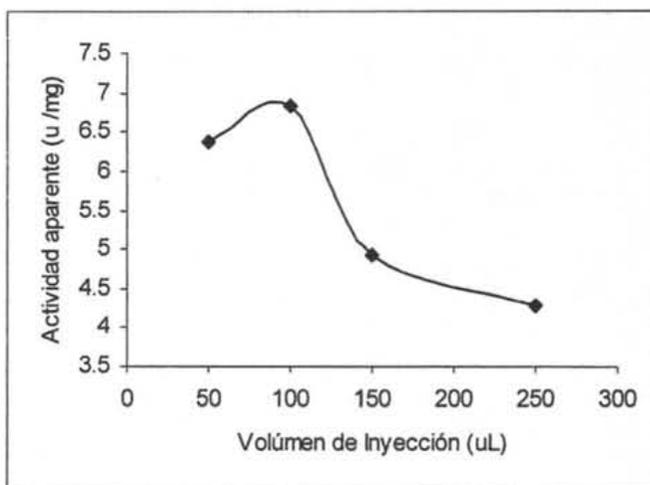


Figura 18. Efecto del volumen de inyección en la actividad de la tirosinasa inmovilizada en CPG.

Tabla 2. Condiciones óptimas de trabajo en medio acuoso por FIA

Parámetro	Condiciones
pH	7.5
Temperatura	25°C
Caudal	0.3 ml/min
Volumen de inyección	100 μ l

Medio No Acuoso

Basándose en los resultados obtenidos por batch, la enzima únicamente presentó actividad en los disolventes con características hidrofóbicas.

La optimización de los parámetros fue determinada para heptano, hexano y cloroformo. Para estos disolventes el efecto de las variables a estudiar sobre el reactor enzimático fueron: volumen de inyección de la muestra y caudal. Se inyectó por triplicado una disolución de p-cresol a una concentración de 2.8 mM preparada en el disolvente a analizar.

Volumen de Inyección:

El comportamiento del reactor con esta variable se llevó a cabo de la misma manera que en medio acuoso, inyectando volúmenes de 50, 100, 200 y 250 μl . Al trabajar con hexano y heptano la respuesta del reactor enzimático no se vio afectada, es decir, para cada volumen la señal obtenida fue la misma para ambos disolventes. Mientras que para el cloroformo, el reactor enzimático presentó su máxima actividad con un volumen de inyección de 100 μl . A medida que el volumen de inyección va aumentando, se observa una disminución en la actividad y el pico se va ensanchando, por lo tanto, el volumen de inyección óptimo para estos disolventes es de 100 μl .

Caudal:

La optimización de este parámetro, de acuerdo al comportamiento que presentó el reactor en medio acuoso; se estudió en un intervalo de 0.3 a 0.8 ml/min. El comportamiento fue similar al que se presentó en medio acuoso: a medida que el flujo aumentaba la actividad de la enzima disminuye. La señal máxima fue a un caudal de 0.3 ml/min.

A pesar de que por un sistema en batch la enzima inmovilizada no presentó actividad en isopropanol y etanol, se realizaron pruebas en flujo continuo. El agua es esencial para que la enzima mantenga su actividad catalítica, con una pequeña cantidad de agua que se suministre será suficiente para proporcionar su capa de hidratación. Por lo

tanto, con este tipo de disolventes que son miscibles con el agua, para evitar que la enzima perdiera su capa de hidratación, se adicionó disolución amortiguadora de fosfatos en una proporción de 10, 40 y 50% con el fin de poder estimular la actividad de la enzima y obtener una respuesta. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron satisfactorios en ningún momento. Al aumentar la proporción de la disolución amortiguadora incrementó la señal del blanco y la formación de burbujas y por lo tanto picos dobleteados.

Una razón del por qué no hay actividad bajo estas condiciones, es que al encontrarse estos disolventes en proporciones altas con respecto a la de la disolución amortiguadora, están reemplazando la capa de agua de la enzima, distorsionando así su estado de hidratación y ocasionando su desnaturalización e inactivación.

Una posible solución a este problema cuando se emplean sistemas basados en disolventes miscibles con el agua, podría ser utilizar concentraciones menores del disolvente, aunque en este caso la enzima no estaría trabajando en un disolvente orgánico puro.

Tabla 3. Actividad aparente de la enzima Tirosinasa por FIA en diferentes medios de reacción

Disolvente	u/mg de soporte(CPG)
Acuoso (Buffer de fosfatos)	7.0272
Etanol	-
Isopropano	-
Cloroformo	0.7577
Hexano	1.0649
Heptano l	1.9167

La tabla 3 muestra los resultados obtenidos. La actividad enzimática en un sistema de flujo continuo es menor a la actividad obtenida en disolución. Esto puede deberse a diferentes factores: 1) la dispersión del bolo de la muestra en el sistema es mayor, ocasionando una disminución en la señal y 2) que durante el proceso de inmovilización la estructura de la enzima haya sido alterada.

Sin embargo, al comparar estos resultados con los obtenidos por un sistema no continuo (batch), la actividad de la enzima es mayor en FIA. Es decir, al acoplar el reactor enzimático a la configuración FIA, proporciona mayor sensibilidad analítica, existe una reducción drástica en el tiempo de análisis; permitiendo realizar varias determinaciones consecutivas utilizando el mismo reactor enzimático. En un sistema no continuo, entre un análisis y otro se requiere de una etapa de lavado y posiblemente con una pérdida gradual de la enzima.

En ambos sistemas, FIA y batch, la enzima inmovilizada presenta una mejor actividad al trabajar en una disolución amortiguadora de fosfatos (medio acuoso), medio óptimo para conservar su actividad. Sin embargo, existe una desventaja para este tipo de análisis; se sabe que el producto de la reacción, es decir, la o-quinona en medio acuoso, es inestable y tiende a polimerizar rápidamente^{12,14}.

Basándonos en esta información, se realizó un análisis cualitativo en batch. Se colocaron aproximadamente 20 mg de enzima inmovilizada en un vaso de precipitado y 5 ml de disolución de p-cresol en disolución amortiguadora de fosfatos y se dejó agitar durante 30 minutos. Después de este tiempo se midió su espectro de absorción en un intervalo de 200 a 600 nm, obteniendo un máximo de absorbancia de $0.6460 = A_1$ a 400 nm. La solución se dejó reaccionar y cada 15 minutos se midió su espectro de absorción así como también sus lecturas de absorbancia: $A_2 = 0.4010$, $A_3 = 0.3713$ y $A_4 = 0.3936$ (figura 19), observando que a medida que pasaba el tiempo la solución cambia de un color amarillo a un café oscuro.

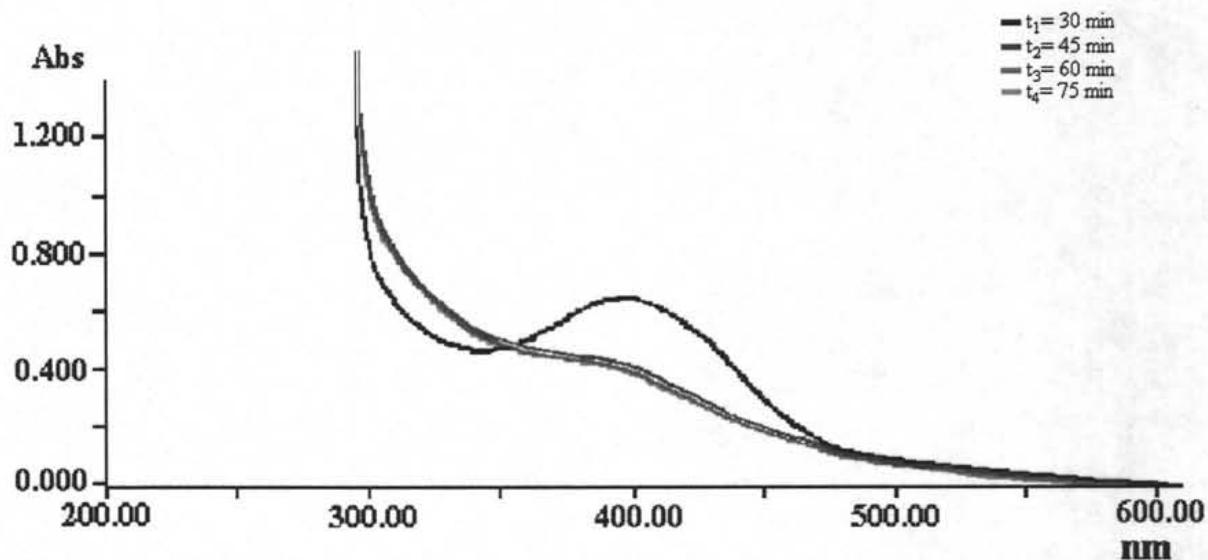


Figura 19. Seguimiento de la polimerización de la 4-metil-1,2-benzoquinona en buffer de fosfatos 0.1 M pH = 7.0

Este mismo análisis se realizó en medio no acuoso, colocando en un vaso de precipitados la enzima inmovilizada y solución de p-cresol en heptano. Después de 30 minutos ($t = 1$) la solución presentó un color amarillo, se decanto y midió su espectro de absorción, obteniendo una absorbancia de 0.1 a una longitud de onda de 380 nm. Después de un periodo de aproximadamente 24 horas ($t = 2$), la solución continuaba manteniendo su color inicial con una lectura de absorbancia de 0.0957. En la figura 20 observamos que la señal se mantiene constante después de este tiempo.

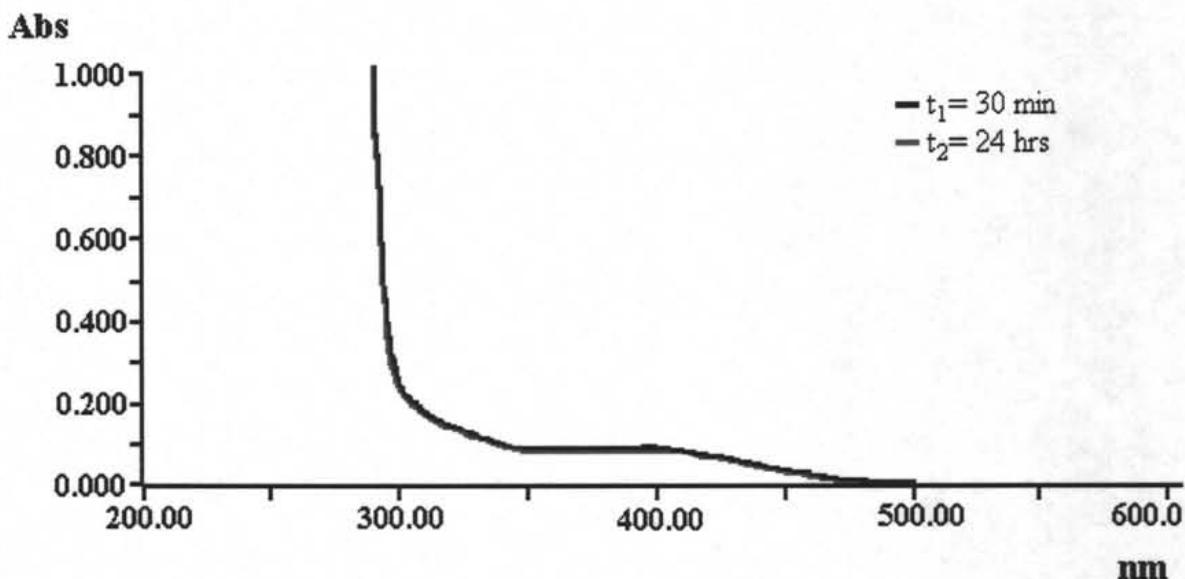
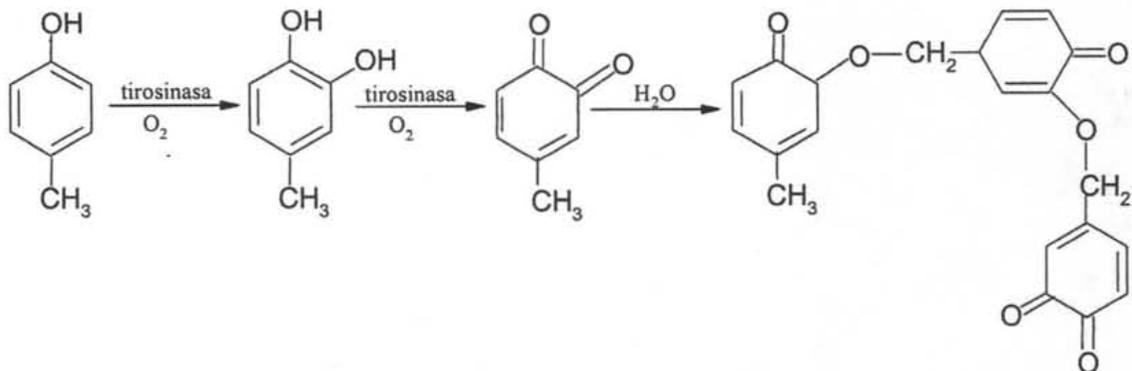


Figura 20. Catálisis enzimática del p-cresol en heptano mostrando la estabilidad de la 4 -metil-1,2-benzoquinona en un periodo de 24 horas aproximadamente.

Efectivamente se lleva a cabo la polimerización de la 4-metil-1,2- benzoquinona en medio acuoso. Formándose rápidamente un compuesto de color oscuro, lo cual explica los cambios en las lecturas de absorbancia. Este comportamiento no es observado en medio orgánico (heptano). Uno de los posibles mecanismos de polimerización del compuesto que posiblemente se llega a formar y el cual también puede llegar a provocar la inhibición de la enzima es:



Reacción 5. Producto de polimerización de la 4-metil-1,2-benzoquinona

3.3 ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DEL REACTOR ENZIMÁTICO POR EFECTO DEL DISOLVENTE

Con la finalidad de conocer la estabilidad del reactor enzimático en disolventes orgánicos se realizó un estudio en continuo. Relacionando la señal analítica contra el tiempo para los tres disolventes seleccionados: heptano con un contenido de agua menor de 0.01%, hexano con 0.006% y cloroformo con 0.005%.

Se inyectaron disoluciones de p-cresol a una concentración de 0.37 mM en hexano, 0.68 mM en cloroformo y 1.25 mM en heptano continuamente.

Después de 20 inyecciones de la disolución de p-cresol para cada medio (aproximadamente 100 minutos) la enzima perdió actividad, disminuyendo un 64.17% en cloroformo, 64.63% en heptano y 64.17% en hexano pero en un periodo más largo (170 minutos) (figura 23).

El reactor enzimático, mostró ser menos estable en cloroformo, al trabajar en este medio el contenido de agua presente en el sistema es relativamente menor con respecto a los otros medios (0.005%), ya que en hexano la cantidad de agua presente es de 0.006% y en heptano tenemos una concentración de 0.01%. Sin embargo, el contenido de agua

presente en cada uno de los medios no es suficiente para mantener la actividad de la enzima.

A pesar de que estos disolventes tienen características hidrofóbicas, están interaccionando con el agua esencial que rodea la enzima. Provocando que con el tiempo eliminen solo una parte del agua que requiere la enzima para su catálisis, ocasionando una disminución en la actividad enzimática. Como aún existe agua en el medio, esta protege a la enzima para no ser afectada totalmente por los disolventes orgánicos permitiendo tener aún actividad catalítica. Todo lo contrario, con aquellos disolventes con características hidrofílicas como el etanol que elimina totalmente el agua de hidratación desnaturalizando y por lo tanto dañando irreversiblemente a la enzima. No podemos decir exactamente cuanta es la cantidad de agua que cada uno de estos disolventes elimina, pero se piensa que la interacción entre el hexano y la capa de hidratación de la enzima es lento. Por lo tanto, la disminución de su actividad se lleva a cabo en un periodo más largo.

Para recuperar la actividad del reactor enzimático fue necesario someterlo a un proceso de rehidratación, el cual se realizó en línea. Se propuso la configuración que se muestra en la figura 21. El proceso de rehidratación constó de 2 etapas: 1) rehidratación de la enzima inmovilizada: Cuando las válvulas de selección VS1 y VS2 se encuentran en posición de llenado se hace pasar buffer a través del reactor enzimático, para la regeneración de éste, mientras que al mismo tiempo el portador (disolvente orgánico) fluye por el sistema sin pasar por el reactor hasta el detector.

2) Regeneración del medio orgánico: Cuando la válvula VS2 cambia de posición se hace pasar el disolvente orgánico a través del reactor enzimático por medio de la válvula de selección VS1 dirigiéndose hacia el desecho. Una vez que el disolvente orgánico ha desplazado el buffer de fosfatos del reactor enzimático se cambia de posición la válvula VS1 y se inyecta el estándar de p-cresol disuelto en el disolvente adecuado. El bolo de muestra inyectado pasa a través del reactor enzimático y se mide el producto de reacción a 380 nm.

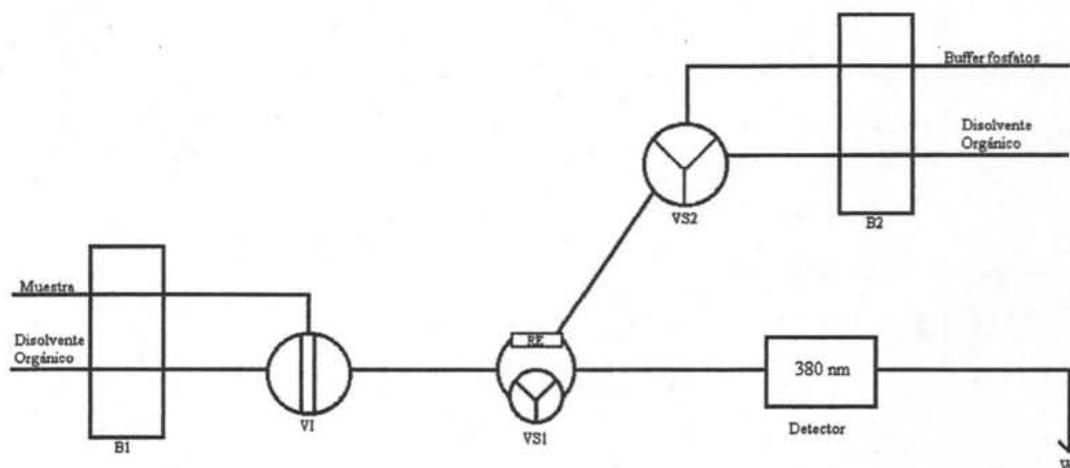


Figura 21. Configuración propuesta para la rehidratación en línea del reactor enzimático. B1: bomba peristáltica para el portador (disolvente orgánico), Muestra: disolución de p-cresol en el disolvente orgánico, VI: válvula de inyección con un loop de 100 μ l, RE: reactor enzimático, VS1: válvula de selección 1, VS2: válvula de selección 2; B2: bomba peristáltica para rehidratar el reactor con buffer y regenerar el medio orgánico y W: desechos.

Sin embargo, con esta configuración no fue posible regenerar el reactor debido a que se formaba una emulsión provocando la obstrucción del reactor enzimático y por lo tanto evitando el paso del portador.

Para evitar la emulsión se propuso la configuración de la figura 22. Por medio de la válvula VS1 se selecciona un flujo de aire que se hace pasar por toda la configuración utilizando la válvula de selección VS2. Después de 1 minuto se cambia de posición la válvula VS1 y se hace pasar buffer de fosfatos 0.1 M pH = 7.0 por 10 minutos para rehidratar la enzima inmovilizada. Al mismo tiempo se le cambia de posición a la válvula VS3 para que el buffer de fosfatos no llegue a la celda de flujo y la moje.

Después de 10 minutos se vuelve a cambiar de posición la válvula VS1 y se hace pasar aire durante 1 minuto para secar la tubería de la configuración. Posteriormente, se cambia de posición las válvulas VS2 y VS3 para que de nuevo pase el disolvente orgánico

por el reactor enzimático y el detector. Una vez lleno el sistema con el disolvente orgánico se inyecta la muestra disuelta en el disolvente estudiado por medio de la válvula VI.

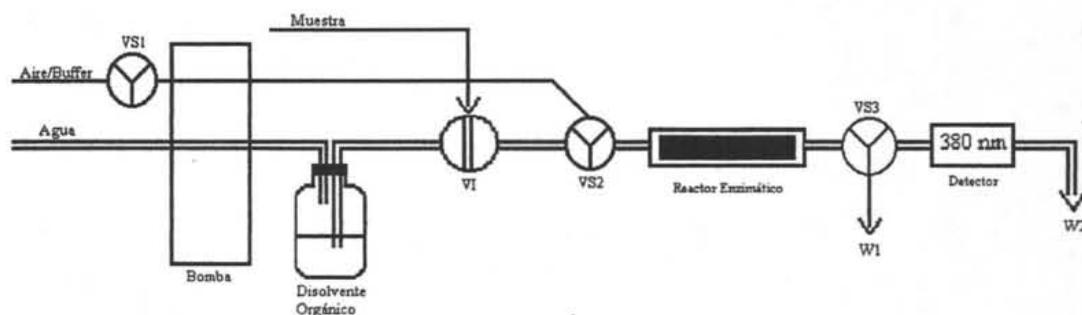


Figura 22. Configuración para la rehidratación en línea del reactor enzimático con buffer de fosfatos 0.1 M pH = 7.0. Muestra: disolución de p-cresol, VI: válvula de inyección con un loop de 100 μ l, VS1: válvula de selección 1, VS2: válvula de selección 2, VS3: válvula de selección 3; W1: desechos acuosos y W2: desechos orgánicos.

Con esta configuración se logró rehidratar la enzima inmovilizada y se regeneró el reactor para las siguientes determinaciones.

En la figura 23 se muestra que después de 100 minutos de trabajo continuo del reactor enzimático la actividad enzimática disminuye hasta un 65% con respecto a la inicial. Después del paso de rehidratación llevado a cabo como se describe en la figura 22, la actividad de la enzima se recupera un 81% para hexano, 60 % para cloroformo y 75% para heptano. Así, si cada 20 minutos de reacción se realiza el proceso de rehidratación en estos medios, se lograra mantener la actividad de la enzima por arriba del 90%. Los resultados también muestran que la enzima es más estable en hexano que en los otros disolventes estudiados ya que para perder el mismo % de actividad requiere más tiempo.

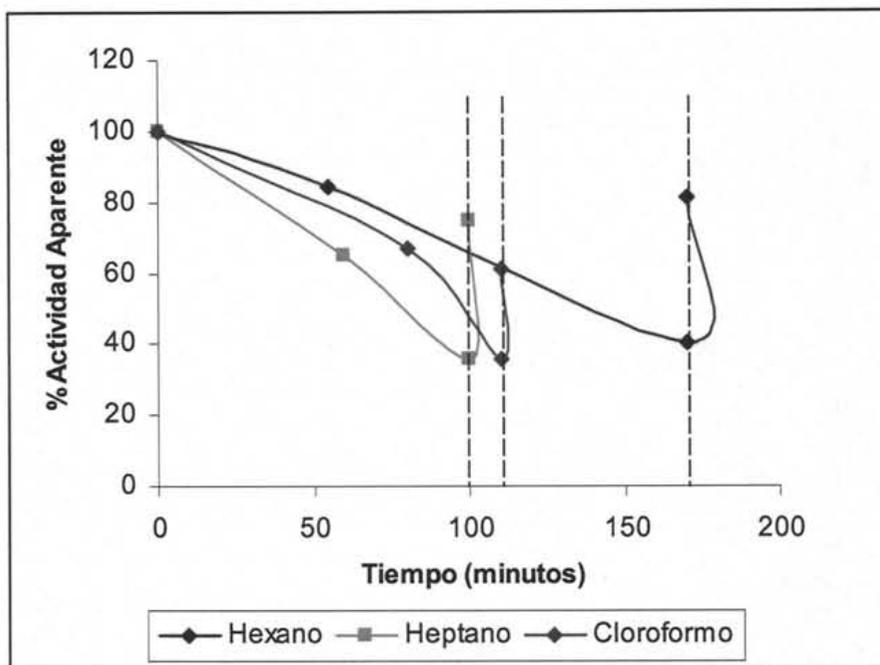


Figura 23. Efecto del disolvente orgánico sobre el reactor enzimático, (-----) señal después de la etapa de rehidratación.

Una vez establecidas las condiciones óptimas para que la enzima tirosinasa inmovilizada en CPG reaccione en un sistema de flujo continuo con disolventes orgánicos se determinó la K_m' y $V_{m\acute{a}x}$ para cada medio de reacción estudiado.

3.4 DETERMINACIÓN DE LA K_m' y $V_{M\acute{A}X}$

Se inyectaron por triplicado disoluciones de p-cresol en un intervalo de 0.0055 – 2.794 mM para cada uno de los disolventes analizados empleando las configuraciones de la figura 8 y 9. Las figuras 24 y 25, son ejemplos de fiagramas obtenidos en medio acuoso (disolución amortiguadora de fosfatos) como no acuoso (hexano). La longitud de onda a la

cual la absorbancia fue monitoreada corresponde al máximo del espectro de la 4-metil-1,2-benzoquinona 400 y 380 nm respectivamente. En ambos casos, la conversión del p-cresol se lleva a cabo en presencia de la enzima, es decir, la enzima tirosinasa inmovilizada en CPG empacada en un reactor y acoplado éste al sistema de flujo continuo, resultó ser satisfactoria. Mediante el sistema FIA la actividad de la enzima incremento debido al aumento de interacciones enzima-sustrato. Este tipo de inmovilización tiene una gran ventaja sobre otros sistemas donde se han empleado otros tipos de matrices para la inmovilización de enzimas, ya que al ser acoplados a sistemas en continuo presentan problemas en cuanto a su resistencia mecánica.

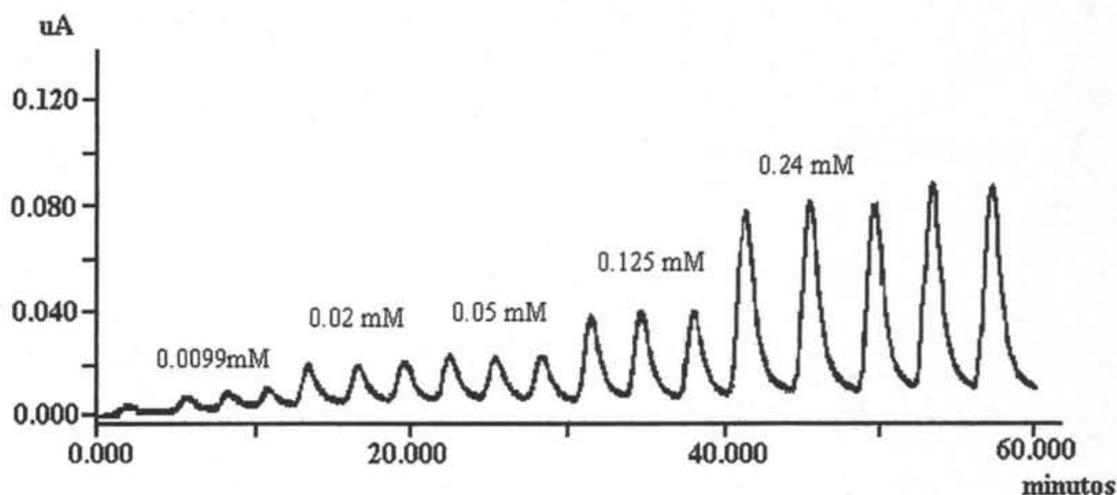


Figura 24. Señales obtenidas para el estudio cinético de la enzima tirosinasa de disoluciones de p-cresol en buffer de fosfatos por Análisis por Inyección en Flujo.

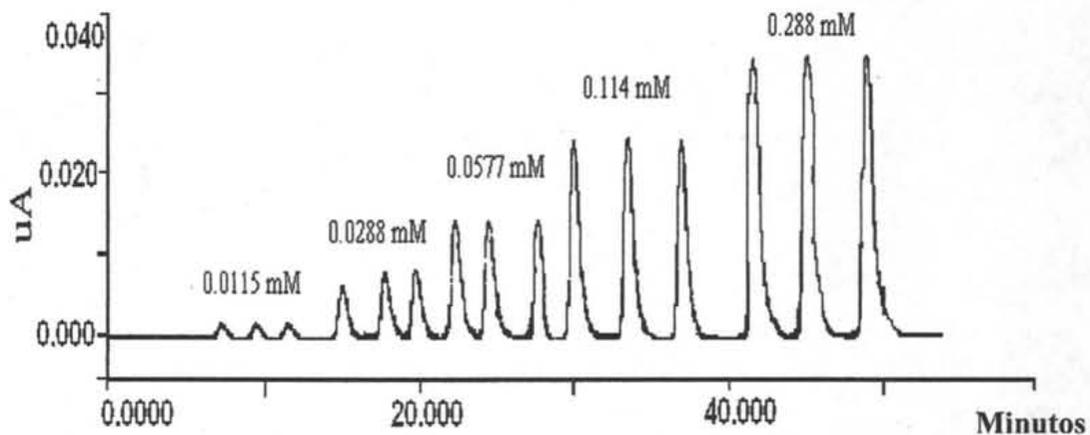


Figura 25. Señales obtenidas para el estudio cinético de la enzima tirosinasa de disoluciones de p-cresol en hexano por Análisis por Inyección en Flujo.

El cálculo de la velocidad inicial se realizó tomando medidas de tiempo, a partir de los fiagramas obtenidos para cada medio de reacción (p.e figura 25). Se considero como tiempo inicial al momento en que el pico empieza a subir y como tiempo final el máximo del pico, considerando este tiempo como el tiempo de residencia del sustrato con la enzima.

Para valuar la constante de Michaelis – Menten y la velocidad inicial máxima se realizó la obtención de la transposición de Lineweaver – Burke para cada medio estudiado, obteniendo las graficas siguientes:

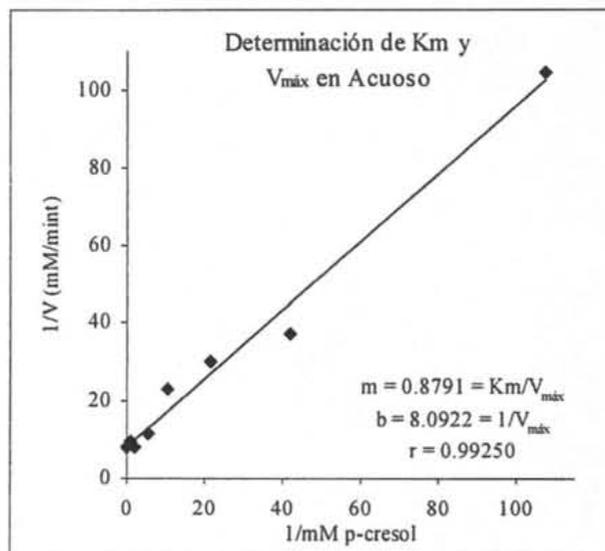


Figura 26. Determinación de la K_m y V_{max} de la tirosinasa en medio acuoso (disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH = 7.0)

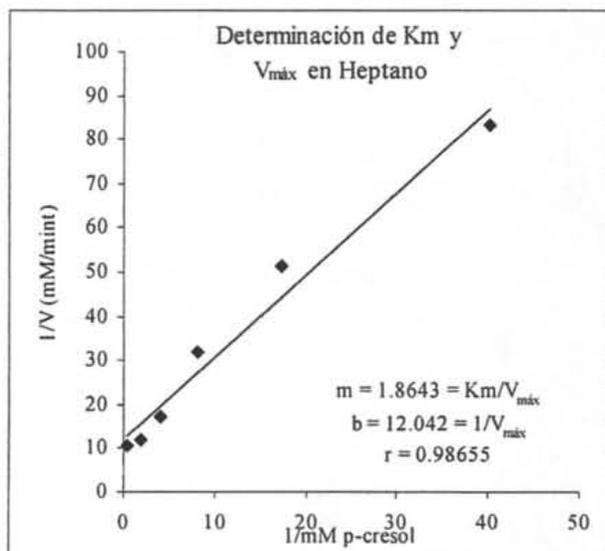


Figura 27. Determinación de la K_m y V_{max} de la tirosinasa en heptano

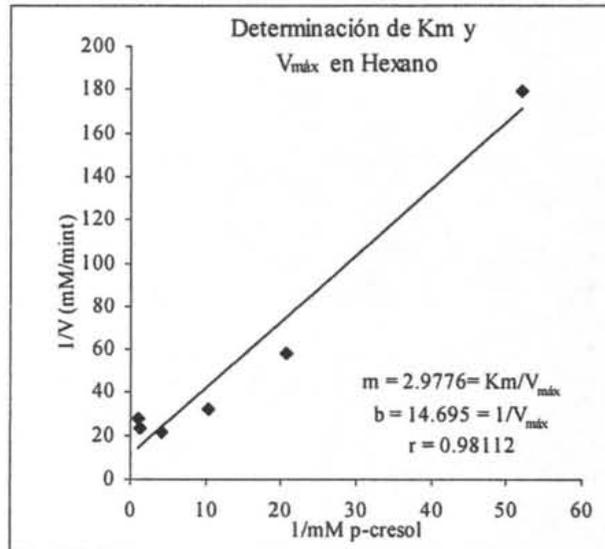


Figura 27. Determinación de la Km y V_{max} de la tirosinasa en hexano

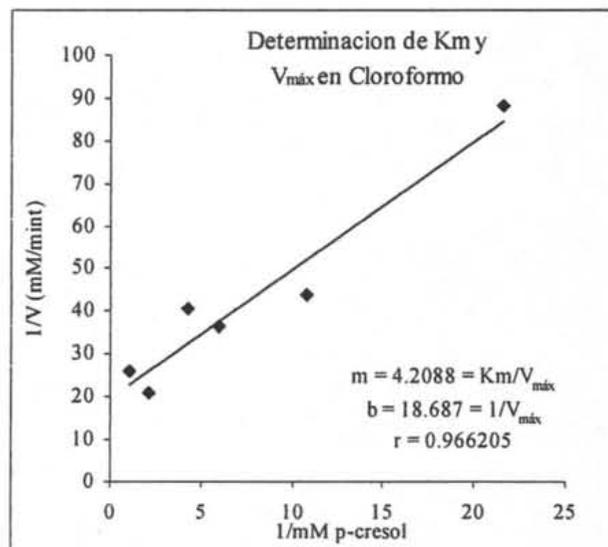


Figura 28. Determinación de la Km y V_{max} de la tirosinasa en cloroformo.

Con las graficas anteriores, se determino la constante de Michaelis-Menten y la velocidad máxima para cada uno de los medios.

Tabla 4. Parámetros cinéticos

Disolvente	V _{máx} (mM/min)	K _m ' (mM)	Actividad específica (u/g de vidrio- enzima)	Log P
Disolución amortiguadora de Fosfatos	0.1236	0.1086	5.2142	-
Cloroformo	0.0535	0.2252	2.2579	2.0
Hexano	0.0681	0.2026	2.8713	3.5
Heptano	0.0830	0.1548	3.5039	4.0

La tabla 4, muestra los valores obtenidos de los parámetros cinéticos evaluados. Se observa que los valores de K_m son menores en medio acuoso. Sin embargo, se piensa, que la polimerización de la 4-metil-1,2-benzoquinona se ve favorecida en este medio, lo cual puede causar la inhibición de la enzima. Por otro lado, la constante de Michaelis-Menten es menor en heptano con respecto a los otros medios estudiados. Indicando que existe una mayor afinidad de la enzima por el sustrato.

A medida que el log P aumenta los valores cinéticos disminuyen. Un disolvente no polar como el cloroformo, con un log P de 2, es menos hidrofóbico que el heptano y puede eliminar más cantidad de agua del medio reduciendo así la actividad de la enzima. Es decir, un log P menor e igual de 2 indica una baja actividad de la enzima.

Comparando las polaridades de estos disolventes, el cloroformo es más polar con respecto al hexano y heptano. Al ser más polar, como ya se ha mencionado anteriormente,

elimina más cantidad de agua de la capa de hidratación de la enzima. La molécula de la enzima se hace más rígida ó inflexible provocando una reducción en la actividad enzimática y consecuentemente una disminución en la sensibilidad del reactor enzimático.

El efecto deshidratante del cloroformo puede estar afectando la eficiencia de la enzima reflejándose en la constante de Michaelis-Menten, una K_m mayor y una actividad menor. Sin embargo, al aumentar el log P, es decir, al ser más hidrofóbico el disolvente, como el heptano, aumenta la sensibilidad del reactor obteniendo una K_m' menor y una actividad mayor. Por otro lado, al trabajar en este medio existe mayor cantidad de agua con respecto al hexano y cloroformo. Favoreciendo el medio de la enzima, por lo que podemos concluir que la enzima es más activa en este disolvente.

3.5 INMOVILIZACIÓN POR ATRAPAMIENTO

3.5.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA TIROSINASA INMOVILIZADA EN ALGINATO POR BATCH

La enzima tirosinasa fue inmovilizada empleando otra técnica de inmovilización usando como matriz un gel. El gel de alginato es un copolímero compuesto de β - D manuronato (M) y residuos de α - L- guluronato (G), que al estar en presencia de iones calcio o aluminio se lleva a cabo el proceso de gelación. Así en la red tridimensional del gel la enzima es atrapada en sus espacios intersticiales, siendo está bioquímicamente inerte para la enzima.

El CaCl_2 es la mejor fuente de iones calcio. Las perlas fueron formadas por gotas individuales de la enzima – alginato sobre una disolución de CaCl_2 , quedando la enzima inmovilizada y sin ser afectada por la concentración del alginato y del cloruro de calcio. Esta capa densa es formada durante el contacto inicial del alginato con el cloruro de calcio,

la cual va ser responsable para retener relativamente pequeñas cantidades de la enzima. Asimismo, el alginato proporciona un medio ambiente favorable para la enzima y de alguna manera simulando su cápsula natural y protegiéndola.

La inmovilización de la tirosinasa en alginato se llevo a cabo como se describe en la sección 2.3.6. Si el total de la enzima queda inmovilizada en el gel, la actividad de la tirosinasa inmovilizada sería de 8.6831 u/mg de alginato.

En los análisis de inmovilización en CPG realizados en batch se estableció un tiempo de reacción de 30 minutos, tiempo que se tomó como referencia para la realización de estos análisis.

Después del tiempo de reacción entre la tirosinasa inmovilizada en perlas de alginato con el p-cresol, la solución presentó un precipitado, observando que las perlas se estaban disolviendo. Al estar en un medio ambiente de fosfatos, estos son fuertemente enlazados al alginato, por lo tanto provocan alteración en el gel debido a la solubilización del enlace Ca^{2+} . Asimismo, el gel de alginato es alterado por la pérdida de estos enlaces disolviéndose. Este efecto puede ser resuelto por la adición de más iones Ca^{2+} .

La disolución se decanto, se midió su espectro de absorción en un intervalo de 200 a 500 nm obteniendo un máximo de absorción a 400 nm (figura 29). La actividad aparente de la tirosinasa fue determinada empleando la ecuación 3.1. La actividad enzimática calculada es de 0.2125 u/mg, menor a la actividad esperada. Esto puede deberse a que al ser alterado el enlace del alginato con el Ca^{2+} por la presencia de los fosfatos, parte de la enzima atrapada en el gel, se pierde. Provocando una disminución en su actividad.

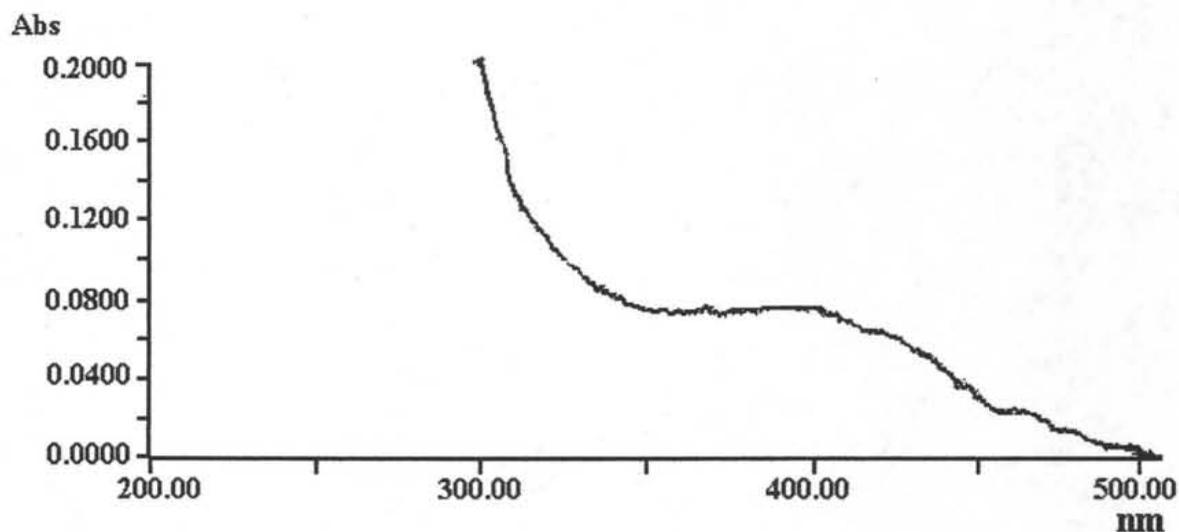


Figura 29. Espectro de UV de la 4-metil-1,2-benzoquinona. Catálisis enzimática del p-cresol en buffer de fosfatos por la enzima tirosinasa inmovilizada en alginto.

Tomando en consideración que en un medio de fosfatos existe alteración en el alginato, es decir, pérdida de los enlaces calcio se espera que en la presencia de otro medio este comportamiento no se presente. Así, el análisis fue realizado empleando un medio no acuoso, usando como disolvente hexano. Después del tiempo establecido para la reacción, se midió el espectro de absorción obteniendo un máximo de absorbancia a 380 nm. La señal obtenida fue muy pequeña por lo que se dejó más tiempo de reacción realizando lecturas cada 10 minutos hasta un tiempo total de 70 minutos. En cada medición, la señal aumentó pero la diferencia no fue muy grande. La actividad aparente de la enzima fue determinada para cada tiempo (tabla 5).

Tabla 5. Actividad aparente de la enzima inmovilizada en alginato en hexano por batch

Tiempo de reacción (minutos)	u/mg de soporte
30	0.0512
40	0.0741
50	0.0744
60	0.0765

Comparando estos resultados con los obtenidos en CPG por batch la enzima presenta una mayor actividad cuando se encuentra inmovilizada en vidrio de poro controlado, en alginato para ambos medios acuoso y no acuoso la respuesta de la enzima es muy pequeña aún dejándola reaccionar más tiempo. Este tipo de gel posee una gran cantidad de agua por lo que la enzima debería tener una actividad mayor, pero posiblemente la difusión del sustrato hacia la enzima es más lenta, hay un menor contacto con la enzima y el sustrato y además el producto de reacción posiblemente también se difunde más lento.

3.5.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD APARENTE DE LA ENZIMA TIROSINASA INMOVILIZADA EN ALGINATO POR FIA

Para determinar la actividad aparente de la tirosinasa inmovilizada en alginato por FIA, fue necesario la optimización de los parámetros hidrodinámicos. Los parámetros a optimizar fueron volumen de inyección y caudal. Estos parámetros fueron estudiados en medio orgánico empleando únicamente hexano.

Para optimizar los parámetros se utilizó una disolución de p-cresol a una concentración de 5.5 mM.

Volumen de Inyección:

La optimización del volumen de inyección fue evaluada en un intervalo de 50 a 200 μl , observando que la señal analítica obtenida fue pequeña. A pesar de los valores obtenidos se determinó que a un volumen de 100 μl la enzima muestra su máxima actividad, siendo ésta de 1.6503 u/mg.

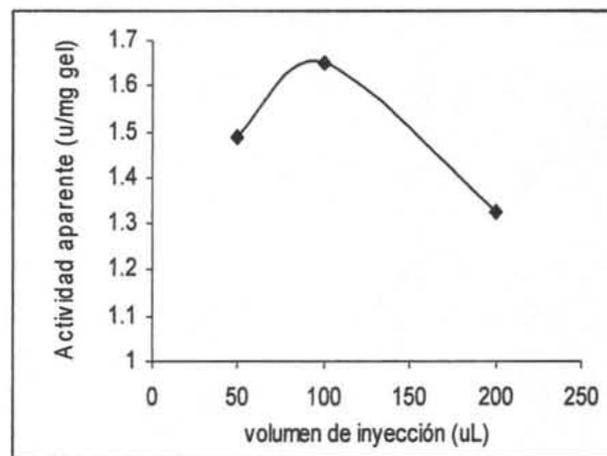


Figura 30. Efecto del caudal en la actividad de la tirosinasa inmovilizada en alginato.

Caudal:

La optimización del caudal fue evaluada a una velocidad de 0.3, 0.5 y 0.6 ml/min. Se intentó trabajar a velocidades mayores de 0.6 ml/min pero a medida que la velocidad del flujo se aumentó la señal analítica disminuyó ya que no fue posible diferenciarla del ruido. Como podemos observar la máxima respuesta es a una velocidad de 0.3 ml/min.

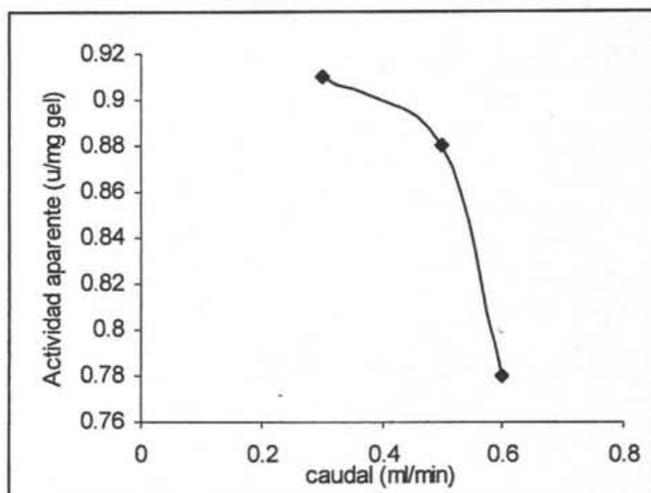


Figura 31. Efecto del caudal en la actividad de la tirosinasa inmovilizada en alginato.

Con este tipo de inmovilización las señales analíticas obtenidas tanto en medio acuoso y no acuoso fueron bajas. Intentando aumentar el tiempo de contacto entre la enzima y el sustrato, se utilizó un sistema abierto-cerrado, así en primer lugar se hizo pasar la muestra por el reactor enzimático en un intervalo entre 2 y 5 minutos, recirculando el volumen inyectado. A pesar de aumentar el tiempo de contacto la señal analítica no varío.

En estas condiciones la actividad enzimática es de 0.3267 u/mg por lo que este tipo de inmovilización no es recomendable para determinar fenoles en medio no acuoso y acuoso.

Esta técnica de inmovilización en alginato, es una técnica rápida y sencilla que proporciona un medio ambiente adecuado a la enzima y principalmente sin alterar su estructura. Por otro lado, las perlas de alginato también presentan gran resistencia mecánica al ser acopladas a un sistema en continuo. Sin embargo, la actividad que presenta la tirosinasa en este soporte de inmovilización es muy baja ya que al estar atrapada la enzima en el gel existe menor contacto con el sustrato debido a que el mecanismo de difusión del sustrato a través de la capa del gel hacia la enzima es lento.

Al ser acoplados los reactores enzimáticos a un sistema de flujo continuo, la actividad de la enzima aumenta, debido a que existe una mayor interacción entre la enzima y el sustrato.

En el caso de la inmovilización enzima-vidrio, la actividad es mayor, debido al aumento en el área superficial, provocando un mayor número de interacciones entre el sustrato y la enzima. Por lo tanto, un aumento de la actividad de la enzima.

En el caso del reactor enzima-alginato, el bolo de la muestra también sufre dispersión y por otro lado el efecto de la difusión es lento provocando una menor actividad con respecto al método de inmovilización anterior.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES

La Tirosinasa puede ser catalíticamente activa en un medio bifásico líquido – líquido. Sin embargo, en estos sistemas hay efectos desfavorables como la formación de emulsiones, pérdida de la enzima (económicamente) o simplemente la enzima es desactivada más rápidamente.

La inmovilización por enlace covalente en CPG de la enzima tirosinasa resultó ser efectiva para un sistema en flujo, ya que proporcionó estabilidad a la enzima y no es desorbida del soporte durante el funcionamiento continuo del reactor.

La tirosinasa inmovilizada en CPG, catalizó la conversión del p-cresol a 4-metil-1,2-benzoquinona en medio acuoso como no acuoso, aunque la oxidación enzimática del fenol en medio acuoso causa la polimerización espontánea del producto. La misma reacción en medio orgánico impide la polimerización del producto de reacción, permitiendo una mayor actividad en heptano y por lo tanto una K_m menor.

La enzima inmovilizada en CPG es capaz de oxidar el p-cresol en disolventes orgánicos no polares como: heptano, hexano y cloroformo. Por otro lado, la enzima fue completamente inactiva en disolventes orgánicos polares y de polaridad intermedia como: etanol, acetonitrilo e isopropanol.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

La estabilidad del reactor enzimático se vio afectada por los disolventes orgánicos, y la hidrofobicidad de éstos. Sin embargo, después de un proceso de rehidratación se logró regenerar al 90% la actividad de la enzima prolongando la vida del reactor enzimático.

El estudio cinético fue realizado empleando la gráfica de Lineweaver – Burk. Presentando un mejor comportamiento en heptano con una $K_m = 0.1548$ mM y $V_{m\acute{a}x} = 0.0830$ con respecto a los otros disolventes orgánicos, comportamiento que al ser relacionado con el log P es el disolvente más hidrofóbico.

La Tirosinasa inmovilizada en alginato catalizó la oxidación del p-cresol a 4-metil-1,2-benzoquinona tanto en medio acuoso como no acuoso. Sin embargo, al comparar la actividad enzimática aparente de los dos métodos de inmovilización se obtiene una mayor actividad de la enzima cuando se encuentra inmovilizada en CPG.

Finalmente, el objetivo principal de esta investigación, desarrollo de un reactor enzimático para ser usado en disolventes orgánicos de diferente polaridad fue totalmente logrado. Los resultados son definitivamente alentadores y confirman las expectativas de en un futuro poder usar este reactor en el análisis de fenoles solubles en disolventes no acuosos, por ejemplo, en la determinación del contenido de compuestos fenólicos en aceites de oliva.

CAPÍTULO V

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- K. R. Natarajan, Biocatalysis in Organic Solvents. *J. Chem. Edu.*, 1991,68 (1), 13
- 2.- Alexander M. Klibanov, Enzymes that work in organic solvents. *CHEMTECH*, 1986, 357
- 3.- Yu. L. Khmel'nitsky, A. V. Levashov, N. L. Klyachko y Karel Martinek, Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content. *Enzyme Microb. Technol.*, 1988, 10, 710
- 4.- A. J. Reviejo, F. Liu and J. M. Pingarrón, Amperometric biosensors in reversed micelles. *J. Electroanal. Chem.*, 1994, 374, 133
- 5.- M. E. Díaz-García, M. J. Valencia-González, Enzyme catalysis in organic solvents: a promising field for optical biosensing. *Talanta*, 1995, 42, 1763
- 6.- Lu Ann S. Gorman and Jonathan S. Dordick, Organic solvents strip water of enzymes. *Biotech. and Bioeng.* 1992, 39, 392
- 7.- Aleksey Zaks and Alan J. Russell, Enzymes in organic solvents: properties and applications. *J. Biotech.*, 1988, 8, 259
- 8.- Colja Laane, Sjef Boeren, Kees Vos, and Cees Veeger, Rules for Optimization of Biocatalysis in Organic Solvents. *Biotech. and Bioeng.*, 1987, Vol XXX, 81
- 9.- Qing Deng, Shaojun Dong, The effect of substrate and solvent properties on the response of an organic phase tyrosinase electrode. *J. Electroanal. Chem.*, 1997, 435, 11

- 10.- L. Campanella, G. Favero, L. Persi, M. P. Sammartino, M. Tomassetti, G. Visco, Organic phase enzyme electrodes: applications and theoretical studies. *Anal. Chim. Acta*, 2001, 426, 235
- 11.- C. H. Wong, Enzymatic Catalysts in Organic Synthesis. *Science*, 1989, 244, 1145
- 12.- Lee and Joseph Whitaker, Chang Y., 1995. Enzymatic Browning and its prevention. ACS Symposium Series 600. American Chemical Society, Washington.
- 13.- Dean E. Wilcox, Arturo G. Porras, Yeong T. Hwang, Konrad Lerch, Marjorie E. Winkler and Edward I. Solomon, Substrate Analogue Binding to the Coupled Binuclear Copper Active Site in Tyrosinase. *J. Am. Chem. Soc.* 1985, 107, 4015
- 14.- Rafi Z. Kazandjian and Alexander M. Klibanov, Regioselective Oxidation of phenols Catalyzed by Polyphenol Oxidase in Chloroform. *J. Am. Chem. Soc.* 1985, 107, 5448
- 15.- Marta Olga Rodríguez and William H. Flurkey, A Biochemistry Project to study Mushroom Tyrosinase. *J. Chem. Edu.*, 1992, 69, 767
- 16.- Maria Hedenmo, Arántzazu. Narváez, Elena Domínguez, Ioanis Katakis, Improved mediated tyrosinase amperometric enzyme electrodes. *J. Electroanal. Chem.*, 1997, 425, 1
- 17.- L. Campanella, A. Fortuney, M. P. Sammartino and M. Tomassetti, Tyrosinase biosensor response as a function of physical properties of organic solvents. *Talanta*, 1994, 41(8), 1397
- 18.- G. Rivas and M. Solis, Electrochemical determination of the kinetic parameters of mushroom tyrosinase. *Bioelectrochem. and Bioenerg.* 1992, 29, 19

- 19.-Jiri Janata and Mira Josowicz, Petr Vanýsek, D. Michael DeVaney, Chemical Sensors. *Anal. Chem.* 1998, 70, 179R
- 20.- Selwayan Saini, Geoffrey F. Hall, Mark E. A. Downs, Anthony P. F. Turner, Organic phase enzyme electrodes. *Anal. Chim. Acta*, 1991, 249, 1
- 21.- Joseph Wang, Eithne Dempsey and Arkadi Eremenko, Malcolm R. Smyth, Organic – phase biosensing of enzyme inhibitors. *Anal. Chim. Acta*, 1993, 279, 203
- 22.- Joseph Wang and Najih Naser, Tissue bioelectrode for organic – phase enzymatic assays. *Anal. Chim. Acta*, 1992, 264, 7
- 23.-Shaojun Dong and Yizhu Guo, A novel enzyme electrode for the water-free organic phase. *J. Electroanal. Chem.* 1994, 375, 405
- 24.- Joseph Wang, Lu Fang and David Lopez, Amperometric Biosensor for phenols based on a Tyrosinase-Graphite-Epoxy Biocomposite. *Analyst*, 1994, 119, 455
- 25.- Stephanie G. Burton, John Duncan, Perry. T. Kaye and Peter D. Rose, Activity of Mushroom Polyphenol Oxidase in Organic Medium. *Biotech. and Bioeng*, 1993, 42,938.
- 26.- Viviana Campo Dall'Orto, Claudia Danilowicz and Irene Rezzano, Comparison between three amperometric sensors for phenol determination in olive oil samples. *Anal. Lett.*, 1999, 32(10), 1981
- 27.- A. Escarpa, M. C. González, Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. *Anal. Chim. Acta*, 2001, 427, 119
- 28.- Qing Deng and Shaojun Dong, Construction of a Tyrosinase – based biosensor in pure organic phase. *Anal. Chem.* 1995, 67, 1357

- 29.- Christophe Védrine, Silva Fabiano, Canh Tran – Minh, Amperometric tyrosinase based biosensor using an electrogenerated polythiophene film as an entrapment support. *Talanta*, 2003, 59, 535
- 30.- Renato S. Freire, Nelson Duran, Joseph Wang and Lauro T. Kubota.. Laccase-Based screen printed electrode for amperometric detection of phenolic compounds. *Anal. Lett.* 2002, 35(1), 29
- 31.-S. V. Dzyadevych, I. Mai Anh, A. P. Soldatkin, N. Duc Chien, N. Jaffrezic – Renault, J-M Chovelon, Development of enzyme biosensor based on pH-sensitive field-effect transistors for detection of phenolic compounds. *Bioelectrochem.*, 2002, 55, 79
- 32.- Electrooxidation of phenol by catalase immobilized on graphite electrodes. *Bioelectrochem.* 2000, 53, 11
- 33.- T. Mai Anh, S. V. Dzyadevych, A. P. Soldatkin, N. Duc Chien, N. Jaffrezic – Renault, J-M Chovelon, Development of tyrosinase biosensor based on pH-sensitive field-effect transistors for phenols determination in water solutions. *Talanta*, 2002, 56, 627
- 34.- S. Sapelnikova, E. Dock, T. Ruzgas, J. Emnéus, Amperometric sensors based tyrosinase-modificated screen-printed arrays. *Talanta*, 2003, 61, 473
- 35.- E. A. Cummings, S. Linquette-Mailley, P. Mailley, S. Cosnier, B. R. Eggins, E. T. McAdams, A comparison of amperometric screen-printed, carbon electrodes and their application to the analysis of compounds present in beers. *Talanta*, 2001, 55, 1015
- 36.- Daniel R Thévenot, Klara Toth, Richard A Durst. and George S Wilson. Electrochemical Biosensors: Recommended definitions and classification. *Anal. Lett.* 2001, 34(5), 635

- 37.-O'Connell Philip J. and Guilbault, George G. Future trends in biosensor research. *Anal. Lett.* 2001, 34(7), 1063-1078.
- 38.- Rafi Z. Kazandijian, Jonathan S. Dordick and Alexander M. Klibanov. Enzymatic analyses in organic solvents. *Biotech. and Bioeng.*. 1986, Vol. XXVIII, 417-421.
- 39.- Saverino Mannino and M. S. Cosio, Joseph Wang, Determination of peroxide value in vegetable oils by an organic – phase enzyme electrode. *Anal. Lett.* 1994, 27(2), 299
- 40.- Florian Schubert, Selwayan Saini and Anthony P. F. Turner, Mediated amperometric enzyme electrode incorporating peroxidase for the determination of hydrogen peroxide in organic solvents. *Anal. Chim. Acta*, 1991, 245, 133
- 41.- Jean – Luc Besombes, Serge Cosnier, Pierre Labbé, Gilbert Reverdy, A biosensor as warning device for the detection of cyanide, chlorophenols, atrazine and carbamate pesticides. *Anal. Chim. Acta*, 1995, 311, 255
- 42.-L. Campanella, T. Beone, M. P. Sammartino and M. Tomassetti, Determination of Phenol in Wastes and Water using an Enzyme Sensor. *Analyst*, 1993, 118, 979
- 43.- F. Toldrá y J. L. Lequerica. Reactores con microorganismos inmovilizados. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.* 1986, 26(3), 349
- 44.- Michaela Kreiner, Marie Claire Parker, High – Activity Biocatalysts in Medio Organic: Solid – State buffers as the immobilization matrix for protein – coated microcrystals. *Biotech. and Bioeng.*, 2004, 87, 24
- 45.- Joseph Wang, Organic-phase biosensors-new tools for flow Analysis: a short review. *Talanta*, 1993, 40 (12), 1909

- 46.- Wolfgang Frenzel and Jolanta Oleksy – Frenzel, Jurgen – Moller, Spectrophotometric determination of phenolic compounds by flow – injection analysis. *Anal. Chim. Acta*, 1992, 261, 253
- 47.- Lorenzo Braco, José A. Darós and Miguel de la Guardia, Enzymatic Flow Injection Analysis in Nonaqueous Media. *Anal. Chem.*, 1992, 64,129
- 48.- Catalin Nistor and Jenny Emnéus, An enzyme flow immunoassay using alkaline phosphatase as the label and a tyrosinase biosensor as the label detector. *Anal. Commun.*, 1998, 35, 417
- 49.- Nobutoshi Kiba, Masae Ogi and Motohisa Furusawa, Flow – Injection determination of L- Tyrosine in serum with an immobilized tyrosinase reactor and fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta*, 1989, 224, 133
- 50.- Joseph Wang, Yuehe Lin and Liang Chen. Organic-phase biosensors for monitoring phenol and hydrogen peroxide in pharmaceutical antibacterial products. *Analyist*, 1993, 118, 277
- 51.- N. Peña, A. J. Reviejo, J. M. Pingarrón, Detection of phenolic compounds in flow system based on tyrosinase-modified reticulated vitreous carbon electrodes. *Talanta*, 2001, 55, 179
- 52.- José A. García – Mesa, M. Dolores Luque de Castro, and Miguel Valcárcel, Coupled Robot- Flow Injection Analysis System for Fully Automated Determination of total Polyphenols in Olive Oil. *Anal. Chem.*, 1993, 65, 3540
- 53.-Masoom and Townshend A. Determination of Glucose in blood by Flow Injection Analysis and an immobilized glucose oxidase column. *Anal. Chim Acta*, 1984, 111, 166.