



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

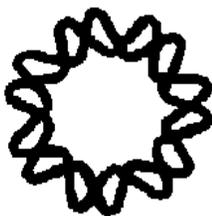
**SÍNTESIS DE DERIVADOS MONOFENÓLICOS
OXIDADOS UTILIZANDO UNA LACASA DE ORIGEN
FÚNGICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:
I.BQ. LIZETTE TRUJILLO ROBLES

TUTORA: DRA. MARCELA AYALA ACEVES



Cuernavaca, Morelos

2007



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.

Este trabajo se realizó en el **Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología-UNAM**, bajo la asesoría de la **Dra. Marcela Ayala Aceves**, en el grupo del **Dr. Rafael Vázquez Duhalt**.

Los estudios de maestría fueron posibles gracias a la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

DEDICATORIA

Con todo mi amor y admiración a mi mamá, por haberme enseñado a perseverar y resistir en los momentos difíciles.

A mi familia, por apoyarme en todos mis proyectos.

A Alexis, por el apoyo, amor y compañía, en esta hermosa etapa de mi vida.

A Blanca, Daniela y Pablo, por estar conmigo a pesar de la distancia.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rafael Vázquez Duhalt, por el apoyo otorgado y por haberme permitido formar parte de su grupo de investigación.

A la Dra. Marcela Ayala Aceves, por el apoyo, la enseñanza, consejos y paciencia brindados durante la realización de este proyecto.

A los miembros del Comité Tutorial: Dr. Edmundo Castillo Rosales, Dra. Brenda Valderrama Blanco y Dra. Marcela Ayala Aceves, por contribuir a mi formación profesional.

A los miembros del jurado: M. en C. Silvia Marquina Bahena, Dr. Leobardo Serrano Carreón, Dr. Enrique Rudiño Piñera y Dr. Alfredo Martínez Jiménez. Gracias por la crítica y sugerencias otorgadas para que éste documento fuese mejor.

Al M. en B. Raunel Tinoco Valencia y a la Biol. Rosa Román Miranda por el apoyo técnico brindado en el laboratorio.

A la M. en C. Silvia Marquina Bahena, por la valiosa ayuda otorgada en la interpretación de técnicas espectroscópicas.

A mis queridos recalitrantes: Raunel, Adriana, Cristina, Lorena, Alexis, Dayanira, Marcela, Rosa, Lucía, Adriaan, Sergio, Elizabeth, Julio, Juan y Jorge, por haber hecho tan grata mi estancia en el laboratorio. Porque más que compañeros, fueron amigos.

A mis amigos Chío, Eliane y Alfonso, a mis compañeros de generación y a todas y cada una de las personas que contribuyeron de alguna forma a la realización de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de los estudios de Maestría en Ciencias Bioquímicas.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
RESUMEN.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. La familia de las oxidasas multi-cobre.....	3
2.2. Lacasas fúngicas: estructura y ciclo catalítico.....	6
2.3. Aplicaciones biotecnológicas de las lacasas.....	13
2.4. Potencial de las lacasas en el campo de la biocatálisis.....	14
2.5. Síntesis de compuestos oxidados.....	19
2.6. Radicales libres: formación y reactividad.....	22
3. JUSTIFICACIÓN.....	23
4. HIPÓTESIS.....	25
5. OBJETIVOS.....	25
5.1. Objetivo general.....	25
5.2. Objetivos particulares.....	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
6.1. Reactivos y solventes.....	27
6.2. Preparación de la enzima.....	27
6.3. Derivatización de radicales fenólicos.....	27
6.3.1. Sistema oxígeno/ácido ascórbico.....	27
6.3.2. Sistema con moléculas nucleofílicas.....	28
6.4. Extracción de productos de reacción.....	29
6.5. Purificación e identificación del producto.....	29
6.5.1. Purificación.....	29
6.5.2. Identificación.....	30
6.5.2.1. Espectroscopia infrarroja.....	30
6.5.2.2. Resonancia Magnética Nuclear.....	30
6.6. Determinación de concentración de proteína.....	30
6.7. Determinación de actividad específica de la lacasa.....	30
6.8. Efecto de la temperatura sobre la actividad específica de la lacasa.....	31

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
7.1. Oxidación de monofenoles sustituidos.....	32
7.2. Formación de derivados en presencia de oxígeno y un agente reductor..	43
7.3. Empleo de moléculas nucleofílicas.....	48
8. CONCLUSIONES.....	63
9. PERSPECTIVAS.....	64
10. BIBLIOGRAFÍA.....	66
11. APÉNDICES.....	72
11.1. Señales de infrarrojo.....	72
11.2. Desplazamientos químicos en Resonancia Magnética Nuclear.....	75
11.2.1. Desplazamientos químicos (δ) en Resonancia Magnética Nuclear de ^1H	76
11.2.1.1. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento de hidrocarburos aromáticos.....	77
11.2.2. Desplazamientos químicos (δ) en Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C	78
11.2.2.1. Constantes de acoplamiento de ^{13}C - ^1H	79
11.2.2.2. Constantes de acoplamiento ^{13}C - ^{13}C	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Sitios de cobre en proteínas cúpricas	4
Figura 2.2. Vía de transferencia de electrones y sitios de cobre en oxidasas azules multicobre	5
Figura 2.3. Estructura cristalográfica de la lacasa del hongo <i>Trametes versicolor</i>	7
Figura 2.4. Tripéptido His-Cys-His implicado en la vía de transferencia de electrones entre el sitio Cu T1 y <i>cluster</i> trinuclear	8
Figura 2.5. Coordinación de los tres sitios de cobre en la lacasa de <i>Trametes versicolor</i>	9
Figura 2.6. Ilustración del movimiento de la α -hélice (residuos 455-461) presente en la lacasa de <i>Trametes versicolor</i>	10
Figura 2.7. Representación del ciclo catalítico de la lacasa	11
Figura 2.8. Representación de ciclos redox catalizados por la lacasa para la oxidación de sustratos. (a) En ausencia de mediadores; (b) en presencia de mediadores químicos	12
Figura 2.9. Hidroxilación indirecta de fenol por la lacasa	20
Figura 2.10. Posible mecanismo de reacción entre la lacasa y oxígeno.....	21
Figura 2.11. Resonancia de un radical fenólico	22
Figura 3.1. Formación de estructuras poliméricas mediante el acoplamiento de los radicales libres producidos por la lacasa	24
Figura 3.2. Formación hipotética de derivados oxidados a partir de monofenole... ..	24
Figura 6.1. Estrategia experimental planteada para el desarrollo de este proyecto. ..	26
Figura 7.1. Reacción hipotética entre compuestos derivatizantes y los radicales libres producidos por la lacasa	32
Figura 7.2. Actividad específica de la lacasa en función de la energía de ionización de los fenoles utilizados	36
Figura 7.3. Actividad específica de la lacasa de <i>C. gallica</i> a diferentes concentraciones de sustrato	37
Figura 7.4. Experimentos adicionales para explicar la caída en la actividad específica de la lacasa. a) Actividad residual en presencia de 4-metoxifenol; b) Efecto del burbujeo de aire sobre la actividad específica	38
Figura 7.5. Correlación semilogarítmica entre la actividad específica de la lacasa y el potencial redox de una selección de fenoles.....	41
Figura 7.6. Reacción hipotética del radical libre en presencia de oxígeno y un reductor.....	43
Figura 7.7. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la lacasa	44
Figura 7.8. Desaparición de 1-naftilamina (a) en presencia de lacasa y ácido ascórbico; b) Consumo de naftilamina en ausencia del reductor	45
Figura 7.9. Efecto del ácido ascórbico adicionado en pulsos en la reacción de oxidación de 1-naftilamina	46
Figura 7.10. Estrategia para la obtención de derivados fenólicos con el empleo de moléculas nucleofílicas	48
Figura 7.11. Cromatograma de HPLC de la reacción de 4-metoxifenol sin PABA .	49

Figura 7.12. a) Espectro UV-Vis realizado a los productos de reacción. b) Placa de TLC.....	50
Figura 7.13. Cinéticas de consumo de compuestos. a) Reacciones individuales; b) Reacciones en relación molar 1:1; c) Reacciones en presencia de nucleófilo/sustrato en relación molar 10:1	51
Figura 7.14. Cromatogramas de la reacción de 4-metoxifenol y PABA a) en relación equimolar y b) en exceso de PABA	52
Figura 7.15. Mecanismo de reacción propuesto para la formación del posible aducto.....	53
Figura 7.16. Espectros de FTIR de los productos obtenidos	55
Figura 7.17. Purificación del posible aducto	57
Figura 7.18. Espectro de RMN de ^1H	58
Figura 7.19. Espectro de RMN de ^{13}C	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Clasificación de las lacasas basada en su potencial redox	9
Tabla 2.2. Ejemplos de reacciones catalizadas por la lacasa	17
Tabla 2.3. Efectos de los sustituyentes sobre la reactividad de diferentes posiciones en un anillo aromático	22
Tabla 6.1. Longitudes de onda utilizadas para el monitoreo de reacciones con nucleófilos	28
Tabla 7.1. Sustratos utilizados	33
Tabla 7.2. Secuencia de aminoácidos en donde podría encontrarse el tripéptido característico en lacasas con potencial redox alto	35
Tabla 7.3. Datos obtenidos considerando la estequiometría de la reacción en 1 mL	39
Tabla 7.4. Monofenoles transformados por la lacasa con burbujeo de aire	40
Tabla 7.5. Compuestos nucleófilos utilizados	49

RESUMEN

La lacasa, una fenol oxidasa, es una alternativa interesante para la catálisis de reacciones redox ya que únicamente utiliza al oxígeno como cofactor. La oxidación directa de fenoles por la lacasa genera radicales libres que sufren reacciones de acoplamiento llevando a la formación de dímeros, oligómeros y, eventualmente, polímeros. Desde el punto de vista ambiental, la remoción de fenoles mediante su polimerización utilizando lacasas constituye una alternativa para la detoxificación de efluentes industriales. Sin embargo, la derivatización de los radicales libres producidos por esta enzima a partir de compuestos monofenólicos no ha sido estudiada a la fecha. Dado el alto potencial redox que presentan las lacasas de origen fúngico, este trabajo pretende estudiar un sistema quimioenzimático, basado en una lacasa fúngica, para favorecer la obtención de derivados monofenólicos que pueden ser de importancia en el área farmacéutica y en la industria química.

La estrategia experimental, de manera general, consiste en generar radicales monofenólicos con una lacasa fúngica, para después intentar derivatizarlos con oxígeno o moléculas nucleofílicas.

Los resultados obtenidos indican que la lacasa de *Coriolopsis gallica* sólo oxida sustratos con energía de ionización menor a 8.7 eV. Así también, se observó que aún en volúmenes pequeños de reacción, pueden existir limitaciones de oxígeno para las reacciones catalizadas por la lacasa. Además, se encontró que no fue posible derivatizar a los radicales fenólicos con oxígeno, ya que posiblemente la reacción entre el radical libre con este derivatizante no se esté llevando a cabo, aún incrementando la concentración de oxígeno disuelto.

En las reacciones realizadas en presencia de nucleófilos, se encontró que a partir del 4-metoxifenol se forma un radical que reacciona con ácido *p*-aminobenzoico (PABA) para producir un derivado del fenol original.

1. INTRODUCCIÓN

La oxidación constituye uno de los pasos clave para la inserción de grupos funcionales en la materia prima utilizada para síntesis orgánica. La metodología química tradicional para este tipo de síntesis presenta desventajas debido a que los oxidantes más económicos e inocuos (p. e. oxígeno molecular) no pueden ser utilizados eficientemente. Por otro lado, las reacciones de oxidación frecuentemente involucran la utilización de iones de metales tóxicos (p. e. cromo), o bien compuestos halogenados (p. e. HBr, HCl), que por ser recalcitrantes ocasionan severos problemas ambientales. Además, otra de las desventajas que presenta este tipo de síntesis son las reacciones alternas indeseables provocadas por la carencia de especificidad, por lo que las oxidaciones regioselectivas son difíciles de desarrollar (Faber, 1997).

Así también, la hidroxilación directa y regioselectiva sobre compuestos aromáticos es una de las áreas más desafiantes en la síntesis orgánica. Existen reactivos disponibles para la hidroxilación regioselectiva de sustituyentes en posiciones *orto* y *para* (Faber, 1997), pero algunos de ellos son explosivos, los rendimientos obtenidos suelen ser muy bajos y, frecuentemente, se obtienen subproductos.

Sin embargo, muchas de las desventajas arriba mencionadas pueden ser evitadas con el empleo de biocatalizadores, ya sean células completas o enzimas. En particular, para aquellos casos en donde una alta especificidad y regioselectividad es requerida, las enzimas son una excelente opción. Además, estos catalizadores son biodegradables y, por lo tanto, causan bajo impacto ambiental en comparación con los reactivos químicos tradicionales utilizados para oxidaciones.

En la actualidad, la biocatálisis es una tecnología estándar para la obtención de diversos productos. En cuanto a la síntesis de compuestos que requieren reacciones específicas de oxidación (p. e. oxigenación) y reducción bajo condiciones inocuas para el medio ambiente, las enzimas óxido-reductasas son biocatalizadores altamente versátiles. A pesar de ello, su aplicación en la industria se ve limitada por necesitar una enzima adicional para la regeneración de los cofactores implicados en la biocatálisis (Straathof *et al.*, 2002).

No obstante, las aplicaciones de las óxido-reductasas pueden estar divididas en la industria de la síntesis química especializada, la alimentaria, la médica, en el ramo ambiental y en campos de cuidado personal. Considerando que las enzimas son específicas y biodegradables, los biocatalizadores basados en óxido-reductasas se ajustan al desarrollo de industrias altamente eficientes, sostenibles y ambientalmente amigables (Xu, 2005).

Dentro de las óxido-reductasas se encuentra un grupo de enzimas denominadas fenol oxidasas, las cuales catalizan reacciones con la intervención directa de oxígeno. Entre las pocas enzimas que son capaces de catalizar la reducción de oxígeno molecular a agua se encuentran los miembros de la familia de las oxidasas azules multi-cobre, las cuales poseen este metal en su sitio activo y catalizan reacciones de oxidación utilizando al oxígeno molecular como aceptor de electrones (Mayer y Staples, 2002).

Un miembro representativo de la familia de las oxidasas azules multi-cobre es la lacasa, la cual únicamente utiliza al oxígeno molecular como cofactor. Debido al gran número de sustratos que puede reconocer, esta enzima ha sido utilizada para diferentes aplicaciones. Sin embargo, la utilización de lacasas para la síntesis de compuestos oxidados no ha sido ampliamente estudiada y los reportes en la literatura son escasos.

Por lo anterior, en este trabajo se pretende estudiar la aplicación de una lacasa fúngica en reacciones de oxidación de compuestos monofenólicos, con el objetivo de favorecer la obtención de monofenoles derivatizados.

2. ANTECEDENTES

2.1. La familia de las oxidasas multi-cobre

Las óxido-reductasas son enzimas que están ampliamente distribuidas entre microorganismos, plantas y animales. Ellas catalizan el intercambio de electrones o equivalentes redox entre moléculas donadoras oceptoras, en reacciones que involucran transferencia de electrones, abstracción de protones, extracción de hidrógeno, inserción de oxígeno u otros pasos importantes en este tipo de reacciones. En general, dos reacciones (una oxidativa y otra reductora) toman lugar, y por lo menos dos sustratos (uno reducido y otro oxidado) son transformados (Xu, 2005).

Para realizar su función fisiológica, las óxido-reductasas emplean varios centros activos redox. Los centros están protegidos por el esqueleto polipeptídico de estas enzimas, los cuales pueden modular su selectividad, potencial redox, reactividad, estabilidad y resistencia a la inhibición. Los centros comunes redox incluyen residuos de aminoácidos (p. e. histidina, tirosina o cisteína), iones o complejos metálicos (p. e. cobre, hierro, molibdeno, hierro-azufre, hemo) y coenzimas (p. e. Flavin Mono Nucleótidos o FMN; Flavin Adenin Dinucleótido o FAD; pirroloquinolina quinona o PPQ) (Xu, 2005).

El cobre (Cu) es un elemento traza esencial en sistemas vivientes, presente en concentraciones de partes por millón. Es un cofactor clave en diversas reacciones biológicas de oxidación-reducción. Las oxidasas que contienen cobre en su sitio activo catalizan la oxidación de una amplia variedad de sustratos con la concomitante reducción de oxígeno a peróxido de hidrógeno o agua (McGuirl y Dooley, 1999; Solomon *et al.*, 1996).

Los sitios con cobre han sido divididos en tres clases basados en sus características espectroscópicas, las cuales reflejan la estructura geométrica y electrónica del sitio activo. La figura 2.1 muestra la representación de estos sitios.

El sitio tipo 1 (T1) o cobre azul (figura 2.1 a), está caracterizado por una fuerte absorción alrededor de 600 nm; el tipo 2 (T2) o cobre normal (figura 2.1 b) exhibe sólo una débil señal de absorción en la región visible y posee una señal activa en resonancia electro-paramagnética (REP) y, finalmente, el sitio tipo 3 (T3) o centro de cobre dinuclear (figura 2.1 c), que no exhibe señal de REP, sin embargo, muestra un espectro de absorbancia a 330 nm (Solomon *et al.*, 1996) y posee un espectro de fluorescencia característico (Shin y Lee, 2000).

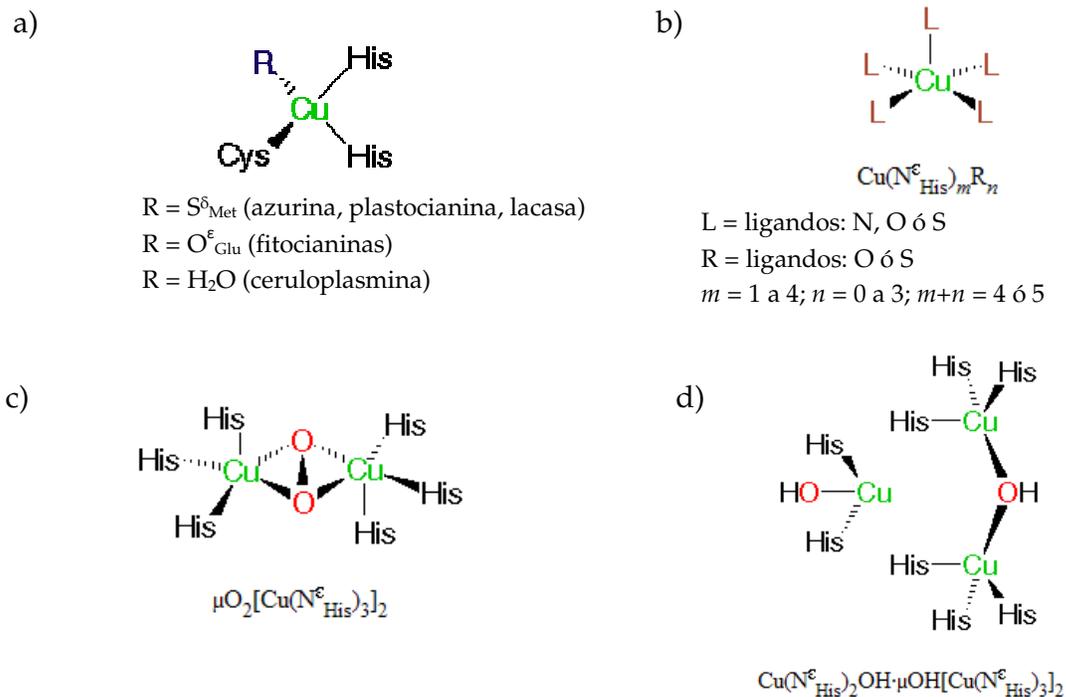


Figura 2.1. Sitios de cobre en proteínas cúpricas. a) Sitio Cu T1; b) Sitio Cu T2; c) Sitio Cu T3; d) *cluster* trinuclear T2/T3. (PROMISE Database, 2007).

La riqueza creciente de información estructural para proteínas con cobre, utilizadas en conjunto con datos de secuencia, ha permitido establecer relaciones evolutivas entre esta clase de proteínas. De esta forma, es sabido que mientras que las oxidasas que contienen sitios mononucleares de cobre con uniones no sulfúricas, llamadas cobre tipo 2 (T2) (p. e. galactosa oxidasa), parecen estar derivadas de proteínas con hierro o manganeso, las oxidasas de cobre dinucleares llamadas cobre tipo 3 (T3) (p. e. tirosinasa) son descendientes de un único y aún desconocido ancestro de cobre mononuclear (Mc Guirl y Dooley, 1999).

Por otro lado, existen oxidasas cuyos sitios catalíticos han sido considerados un híbrido de centros de cobre T2 y T3. Estas oxidasas trinucleares (p. e. ascorbato oxidasa) no están relacionadas a las oxidasas T2 o T3 sino que se consideran derivadas de las proteínas con cobre mononuclear del tipo 1 (T1) (McGuirl y Dooley, 1999) (figura 2.1 d). Dichas proteínas con cobre T1, funcionan principalmente como proteínas de transferencia de electrones y son también llamadas proteínas de cobre azul debido a su intenso color originado de una transición por transferencia de carga de $\text{Cu(II)} \rightarrow \text{S}$ (cisteína) (McGuirl y Dooley, 1999).

Las oxidasas azules multi-cobre son una clase de enzimas que pueden ser definidas por su espectroscopía, homología de secuencias y reactividad (Messerschmidt y Huber, 1990). Actualmente, las oxidasas azules multi-cobre bien definidas son la lacasa, la ascorbato oxidasa y la ceruloplasmina.

Una combinación de estudios espectroscópicos detallados y de cristalografía por rayos X ha revelado que todas las oxidasas azules multi-cobre, descritas a la fecha, contienen por lo menos un sitio de cobre azul o T1 y un *cluster* de cobre trinuclear T2/T3 (Messerschmidt y Huber, 1990; Solomon *et al.*, 1996). La figura 2.2 muestra la vía de transferencia de electrones y los sitios de cobre en oxidasas azules multi-cobre.

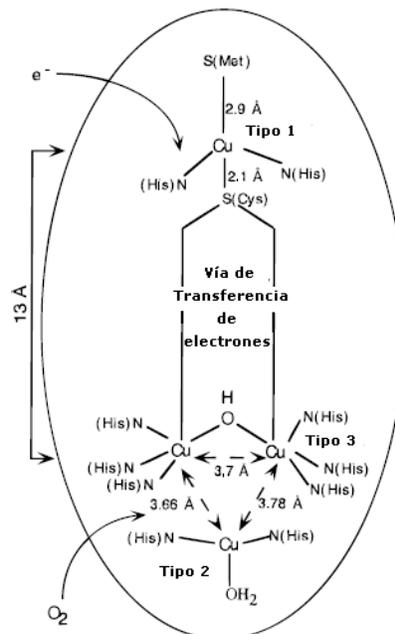


Figura 2.2. Vía de transferencia de electrones y sitios de cobre en oxidasas azules multicobre. Las longitudes están dadas en Angstroms (Å) y corresponden al estado oxidado de las enzimas (Solomon *et al.*, 1996).

Los sustratos son oxidados cerca del sitio T1, el cual realiza la transferencia de electrones al *cluster* trinuclear T2/T3, donde el O₂ es reducido a agua. Funcionalmente, todas las oxidasas azules multi-cobre acoplan la reducción del oxígeno molecular a agua con la oxidación del sustrato.

En presencia de la lacasa, la ascorbato oxidasa y la ceruloplasmina, el sustrato es oxidado por un electrón. Sin embargo, a pesar de tener gran cantidad de información disponible sobre los diferentes miembros de la familia de las oxidasas azules multi-cobre, no se tiene conocimiento preciso de la vía de transferencia de electrones ni del mecanismo de reducción de oxígeno molecular (Bukh *et al.*, 2006).

De todos los miembros que forman parte de la familia de las oxidasas multi-cobre, la lacasa es la más estudiada por ser su miembro más simple y por presentar características que la hacen atractiva para aplicaciones biotecnológicas.

2.2. Lacasas fúngicas: estructura y ciclo catalítico

Como se mencionó anteriormente, un miembro representativo de la familia de las oxidasas azules multi-cobre es la lacasa (benzenediol: oxígeno óxido-reductasa E.C. 1.10.3.2). Esta enzima se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza. En hongos, está involucrada en el proceso de pigmentación de esporas y participa en el proceso de delignificación durante la podredumbre blanca de la madera asociada con basidiomicetos (Thurston, 1994; Yaropolov *et al.*, 1994; Baldrian, 2006); también actúa como factor de virulencia protegiendo al hongo patógeno de fitoalexinas y taninos presentes en el hospedero (Thurston, 1994; Mayer y Staples, 2002; Burton, 2003; Baldrian, 2006). En plantas, las lacasas se encuentran involucradas en el proceso de reconstitución y regeneración de protoplastos y en la lignificación de la pared celular de plantas superiores (Mayer y Staples, 2002). Además, la presencia de lacasas en bacterias ha sido reportada desempeñando una función en el proceso de pigmentación de endosporas (Claus, 2003; Martins *et al.*, 2002).

Las lacasas son frecuentemente producidas como holoenzimas activas y glicosiladas, su peso molecular varía típicamente entre 40,000-140,000 Da. El contenido de carbohidratos de la enzima puede constituir entre el 10 al 45 % del peso de la enzima e incluye a carbohidratos como la glucosa, manosa, galactosa, fucosa y arabinosa (Thurston, 1994; Yaropolov *et al.*, 1994).

La estructura de la lacasa con un peso molecular aproximado de 60,000 Da contiene cuatro átomos de cobre por monómero enlazados a tres sitios redox de cobre (Cu T1, Cu T2 y Cu T3), formando así el sitio catalítico de la enzima (Solomon *et al.*, 1996). En la Figura 2.3 se muestra la primera estructura cristalográfica de una lacasa, con los cuatro átomos de cobre, proveniente del hongo *Trametes versicolor* (Piontek *et al.*, 2002).

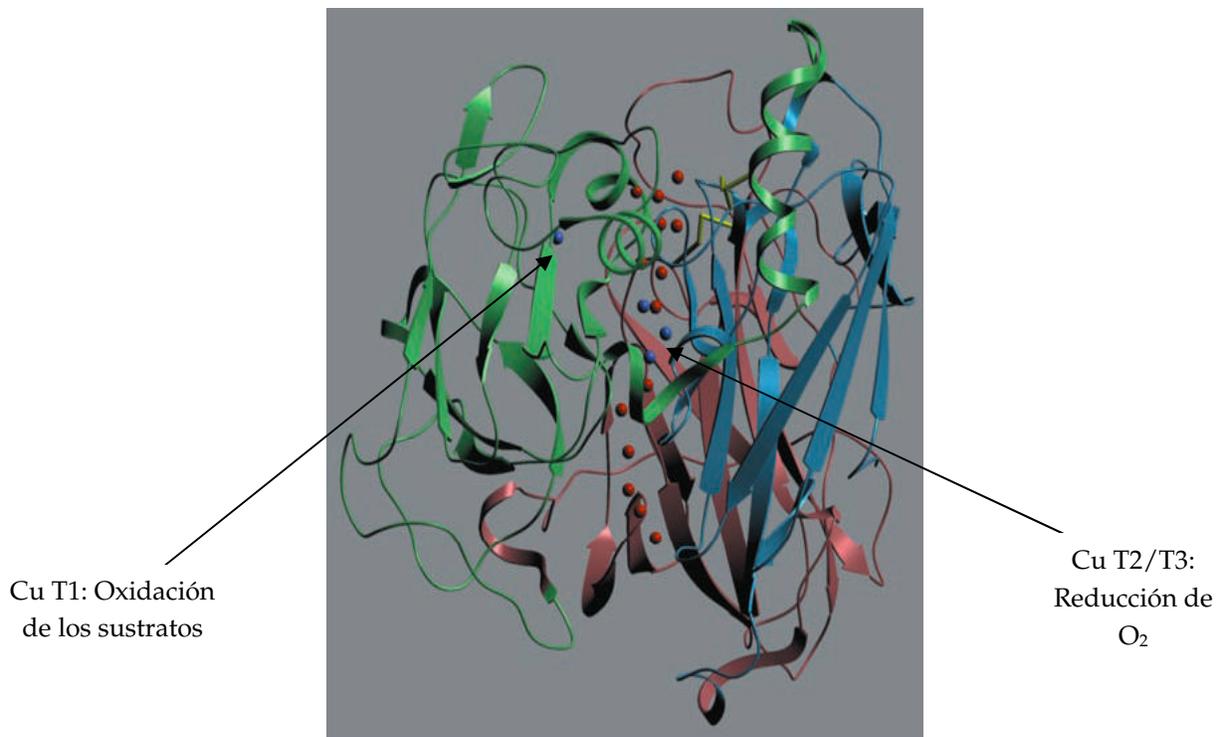


Figura 2.3. Estructura cristalográfica de la lacasa de *Trametes versicolor* (código en el Protein Data Bank 1GYC). Las esferas azules representan a los átomos de cobre y las rojas a moléculas de H₂O (Piontek *et al.*, 2002).

El sitio Cu T1, que es donde se realiza la oxidación del sustrato, es el sitio primario aceptor de electrones y le confiere un color azul a la proteína con una absorbancia cercana a los 600 nm (Solomon *et al.*, 1996). El sitio Cu T2 no confiere color, pero como se mencionó previamente, tiene una señal activa en REP (Solomon *et al.*, 1996). El sitio Cu T3 contiene un par de átomos de cobre que exhibe una banda de absorbancia cercano al UV (Solomon *et al.*, 1996).

Los sitios Cu T2 y Cu T3 están siempre unidos en un centro de cobre trinuclear llamado *cluster* trinuclear Cu T2/T3, donde se realiza la reducción de oxígeno molecular a agua (Solomon *et al.*, 1996; Piontek *et al.*, 2002).

El sitio Cu T1 se encuentra conectado con el *cluster* trinuclear por un tripéptido His-Cys-His, el cual se encuentra altamente conservado entre los miembros de la familia de las oxidasas azules multi-cobre y está implicado en la vía de transferencia de electrones entre el sitio Cu T1 y el *cluster* trinuclear (figura 2.4) (Solomon *et al.*, 1996; Baldrian, 2006).

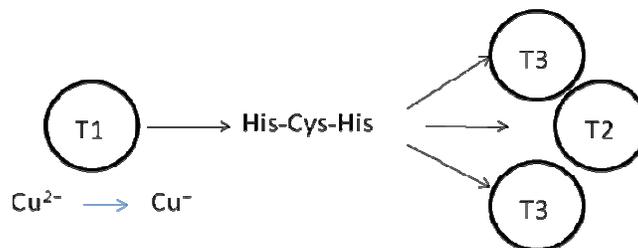


Figura 2.4. Tripéptido His-Cys-His implicado en la vía de transferencia de electrones entre el sitio Cu T1 y *cluster* trinuclear (Baldrian, 2006).

Esta conservación estructural refleja un mecanismo de reacción común para la oxidación del cobre y la reducción del oxígeno molecular en estas enzimas (Piontek *et al.*, 2002; Garavaglia *et al.*, 2004). Los aminoácidos propuestos para la coordinación de los tres sitios de cobre se encuentran altamente conservados en un gran número de lacasas y en otras oxidasas azules.

El sitio Cu T1, responsable de la oxidación de los sustratos, se encuentra coordinado por dos histidinas contiguas y una cisteína, además de un ligando axial (usualmente metionina o fenilalanina) presente en casi todas las oxidasas multi-cobre (figura 2.5) (Solomon *et al.*, 1996; Piontek *et al.*, 2002; Riva, 2006).

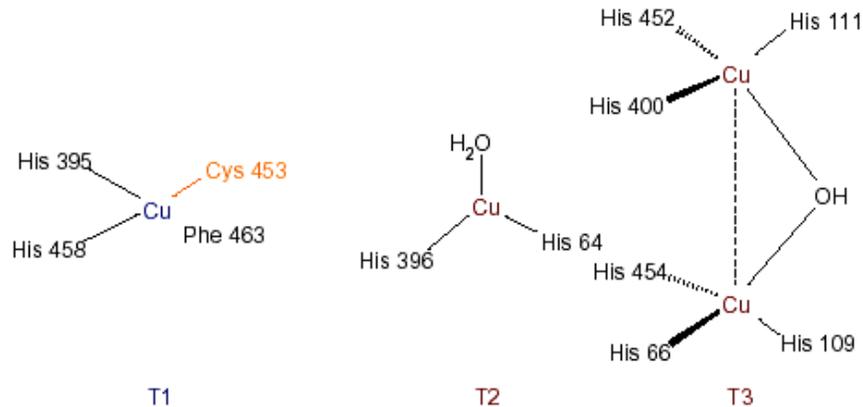


Figura 2.5 Coordinación de los tres sitios de cobre en la lacasa de *Trametes versicolor* (Riva, 2006).

Una de las características más sobresalientes de las lacasas es el potencial redox del sitio Cu T1, ya que ha sido correlacionado con la reactividad de estas enzimas (Piontek *et al.*, 2002; Xu, 1996). Los valores de potencial redox del sitio Cu T1 de las lacasas varían de 400 a 800 mV (medidos con un electrodo normal de hidrógeno) (Solomon *et al.*, 1996; Shleev *et al.*, 2004; Pita *et al.*, 2006). Con base en lo anterior, las lacasas se clasifican como de alto, medio o bajo potencial redox (Tabla 2.1):

Tabla 2.1. Clasificación de las lacasas basada en su potencial redox (Xu *et al.*, 1998)

CLASIFICACIÓN	POTENCIAL REDOX (mV)	LACASA
Alto	700-800	<i>Trametes versicolor</i>
Medio	500-650	<i>Scytalidium thermophilum</i>
Bajo	400-500	<i>Myceliophthora thermophila</i>

Anteriormente, se pensaba que la coordinación axial del Cu T1 era un factor determinante en la regulación de este potencial, sin embargo, distintos estudios de mutagénesis (Xu *et al.*, 1998; Farver *et al.*, 1993) han demostrado que son otros los factores determinantes.

En un estudio cristalográfico realizado a la lacasa del hongo *Trametes versicolor* (de alto potencial redox) (Piontek *et al.*, 2002), se encontró que existe un alargamiento en el enlace de coordinación entre el cobre del sitio Cu T1 y el nitrógeno de la histidina 458 que lo coordina. Dicho alargamiento puede provocar una mayor deficiencia de electrones en el cobre y, por lo tanto, un aumento en el potencial redox. Esta hipótesis se basa en la observación de la formación de un puente de hidrógeno entre el Glu 460 y Ser 113, que parece incrementar la distancia entre el cobre y la α -hélice que contiene a la histidina 458 (figura 2.6) (Piontek *et al.*, 2002; Ducros *et al.*, 1998). En lacasas con bajo potencial redox, la formación de tal puente de hidrógeno no es posible, debido a la carencia de un residuo donador y/o aceptor apropiado.

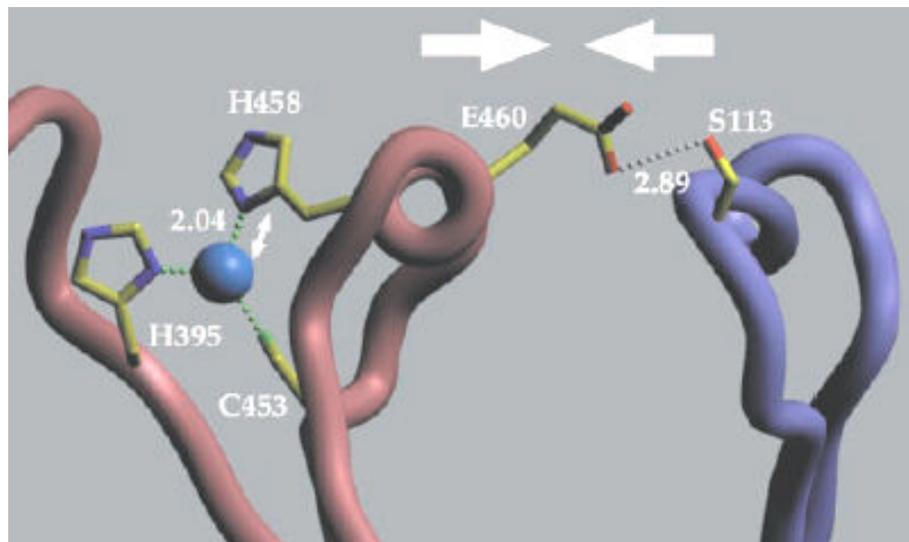


Figura 2.6. Ilustración del movimiento de la α -hélice (residuos 455-461) presente en la lacasa del hongo *Trametes versicolor*. Las longitudes están dadas en Angstroms (Piontek *et al.*, 2002).

Así también, una secuencia que revela un tripéptido Leu-Glu-Ala, inmediatamente seguida de la His 458 (que coordina al sitio Cu T1), es una característica conservada entre lacasas con altos potenciales redox (Xu *et al.*, 1998). Esta secuencia incluye al ácido glutámico mostrado en la figura 2.6, apoyando la hipótesis del puente de hidrógeno propuesta por Piontek *et al.* (2002).

Las reacciones catalizadas por lacasas proceden por la oxidación monoelectrónica de una molécula de sustrato al correspondiente radical libre. El proceso redox toma lugar con la asistencia del sitio CuT1 y el *cluster* trinuclear T2/T3.

El resultado del ciclo catalítico es la reducción de una molécula de oxígeno a dos moléculas de agua y la concomitante oxidación de cuatro moléculas de sustrato para producir cuatro radicales libres (figura 2.7). Estos intermediarios reactivos pueden producir después dímeros, oligómeros y polímeros (Riva, 2006).

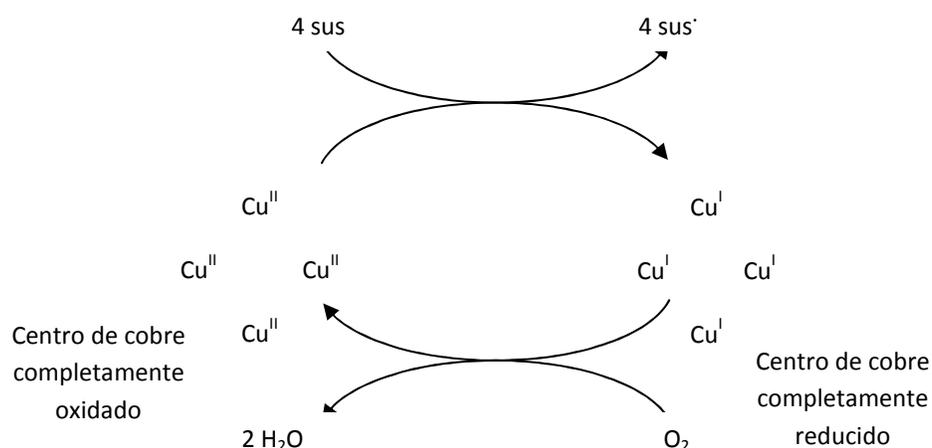


Figura 2.7. Representación del ciclo catalítico de la lacasa. Sus: molécula de sustrato; Sus': radicales libres derivados del sustrato (Riva, 2006).

Las reacciones catalizadas por la lacasa en aplicaciones tecnológicas o sintéticas pueden ser representadas por los esquemas representados en la figura 2.8.

En el caso más simple (figura 2.8 a), las moléculas de sustrato son oxidadas a sus correspondientes radicales por interacción directa con el sitio Cu T1.

Sin embargo, a menudo los sustratos de interés no pueden ser oxidados directamente por la enzima, debido a un impedimento estérico o, bien, por tener un potencial redox elevado. Esta limitante puede ser superada con la adición de mediadores químicos, los cuales pueden actuar como sustratos intermediarios para la lacasa, en donde al ser oxidados por ésta producen radicales que ayudan a oxidar al sustrato de interés (figura 2.8 b).

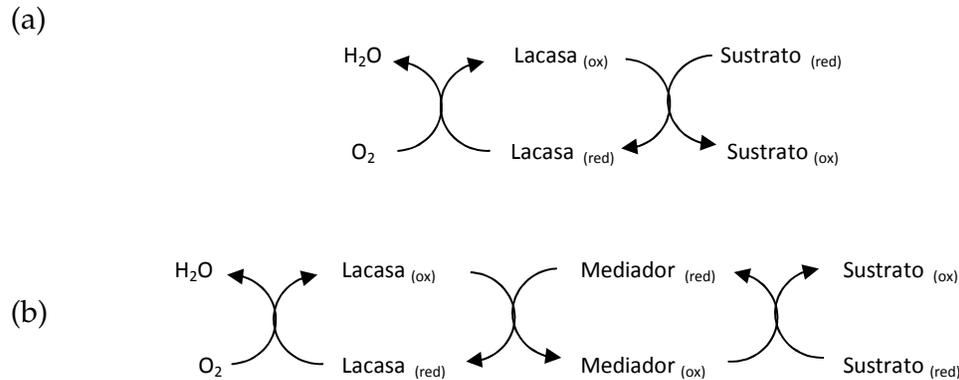


Figura 2.8. Representación de ciclos redox catalizados por la lacasa para la oxidación de sustratos. (a) En ausencia de mediadores; (b) en presencia de mediadores químicos (Riva, 2006).

Se necesitan 4 electrones y 4 protones para poder reducir el oxígeno a agua. La catálisis inicia con un acercamiento entre el sitio Cu T1 y el sustrato, convirtiendo al sustrato a su radical correspondiente y reduciendo el sitio Cu T1; los electrones de 4 moléculas de sustrato se transfieren al *cluster* trinuclear, en donde ocurre la reducción de oxígeno molecular a agua (Gianfreda *et al.*, 1999).

Las lacasas catalizan la oxidación de una gran variedad de compuestos orgánicos *orto* y *para* sustituidos incluyendo mono y polifenoles, aminas aromáticas y moléculas estructuralmente similares a los monómeros de la lignina (Thurston, 1994; Burton, 2003; Mayer y Staples, 2002). También catalizan la demetilación de lignina, ácidos metoxifenólicos y metoxiaromáticos, así como la depolimerización de lignina hacia monómeros y su co-polimerización con fenoles y acrilamida (Burton, 2003; Thurston, 1994; Mayer y Staples, 2002; Baldrian, 2006). Con base en su baja especificidad, las lacasas pueden ser explotadas para un gran número de aplicaciones biotecnológicas.

2.3. Aplicaciones biotecnológicas de las lacasas

Las lacasas ofrecen varias ventajas de gran interés para aplicaciones biotecnológicas. Principalmente, estas aplicaciones son de importancia en el área ambiental y en la industria alimentaria. Debido a que las lacasas exhiben una baja especificidad hacia sus sustratos, son capaces de oxidar a un gran número de compuestos xenobióticos que incluyen fenoles clorados (Leontievsky *et al.*, 2001), tintes sintéticos (Rodríguez *et al.*, 1999), hidrocarburos policíclicos aromáticos (Pickard *et al.*, 1999) y pesticidas (Leontievsky *et al.*, 2001). Así también, la oxidación directa de fenoles y sus derivados ha sido investigada para la biorremediación de aguas residuales provenientes de las industrias. En estos casos, los polímeros fenólicos resultantes del acoplamiento oxidativo de radicales libres producidos por la lacasa, son usualmente insolubles, siendo fácilmente separados por filtración o sedimentación (Torres *et al.*, 2003).

Los procesos basados en lacasas muestran gran potencial en industrias de manufactura. Una lacasa ha sido comercializada para preparar tapones de corcho para botellas de vino, en los cuales la enzima disminuye oxidativamente las manchas características del corcho y la astringencia que es impartida a las botellas de vino añejo (Xu, 2005).

Así también, la remoción selectiva de derivados fenólicos es requerida para la estabilización de bebidas, tales como jugos de fruta, vino y cerveza. En estos casos, la enzima debe estar inmovilizada ya que su uso no está aprobado como aditivo en alimentos (Xu, 2005).

Actualmente, una de las principales aplicaciones biotecnológicas de la lacasa está en la industria del papel, en donde participa en la delignificación de las fibras de madera, particularmente, durante el proceso de blanqueo (Xu, 2005).

2.4. Potencial de las lacasas en el campo de la biocatálisis

Recientemente, la información colectada sobre las lacasas ha despertado el interés de los químicos orgánicos, cuyos esfuerzos en el área de la biocatálisis están dirigidos hacia el desarrollo de nuevas aplicaciones sintéticas.

Investigaciones de los procesos de delignificación catalizados por la lacasa, han mostrado que la presencia de mediadores químicos permite la oxidación de sustituyentes no fenólicos, particularmente, de grupos de alcohol bencílico, en varios modelos de lignina. Como una extensión lógica a estos resultados, esta biotransformación fue aplicada a la oxidación de alcohol bencílico, alílico, propargílico y alifáticos a sus correspondientes aldehídos y cetonas, respectivamente (Potthast *et al.*, 1996) (tabla 2.2, entrada 1). Así también, una mezcla compleja de productos fue obtenida tras la oxidación de un imidazol sustituido y su reacción con el oxígeno presente en el medio de reacción (Schäfer *et al.*, 2001) (tabla 2.2, entrada 2).

Por otro lado, considerando que la oxidación directa de la lacasa hacia un sustrato genera radicales libres que pueden sufrir reacciones posteriores y llevan a la formación de oligómeros, se han obtenido compuestos que pueden ser de relevancia sintética. Un ejemplo de compuestos obtenidos bajo este criterio, con importancia en la industria química y farmacéutica, son los polímeros conductores (Karamyshev *et al.*, 2003) y dímeros de penicilina X (Agematu *et al.*, 1993), respectivamente (tabla 2.2, entrada 3).

Además, los radicales libres derivados de compuestos fenólicos pueden participar en reacciones de acoplamiento para formar diferentes dímeros con enlaces C-O y C-C. Este aspecto fue explotado para la síntesis de derivados de compuestos naturales, tales como los dímeros de la penicilina X (Agematu *et al.*, 1993) y de bisfenol A (Uchida *et al.*, 2001) (tabla 2.2, entrada 4).

Así también, dímeros C-C y C-O de la hormona esteroide 17β -estradiol, oxidada en presencia de lacasa, han podido ser aislados y completamente caracterizados (Nicotra *et al.*, 2004) (tabla 2.2, entrada 5). Similarmente, la oxidación de isoeugenol o alcohol coniferílico por esta enzima produce una mezcla de derivados diméricos y tetraméricos (Shiba *et al.*, 2000) (tabla 2.2, entrada 6).

Además, existe un reporte bibliográfico en donde la lacasa oxidó una fitoalexina, el *trans*-resveratrol, facilitando el aislamiento del dehidrómero racémico como un único producto (Nicotra *et al.*, 2004) (tabla 2.2, entrada 7).

Otro ejemplo fue dado por el acoplamiento de derivados de ácido antranílico para dar compuestos como actinocina que contienen un cromóforo de fenoxazinona (Osiadacz *et al.*, 1999) (tabla 2.2, entrada 8), el cual se encuentra presente en antibióticos de actinomicina.

Otro posible uso de radicales generados por la lacasa es en reacciones de acoplamiento cruzado con una molécula diferente, donde el intermediario reactivo es atrapado impidiendo las reacciones de polimerización secundarias.

Este enfoque no ha sido ampliamente investigado pero hay algunos ejemplos significativos, en donde *o*- y *p*-difenoles en presencia de lacasas fúngicas pudieron ser transformados en derivados fenólicos de interés, a través de un acoplamiento heteromolecular con aminas aromáticas y alifáticas.

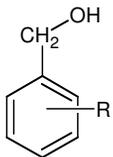
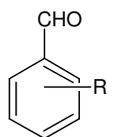
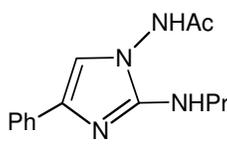
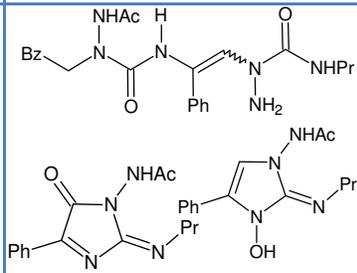
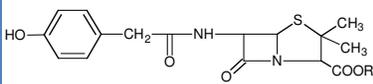
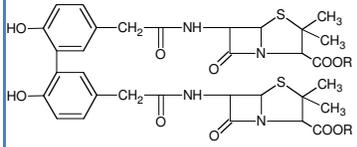
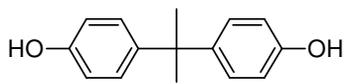
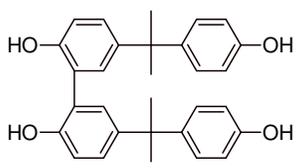
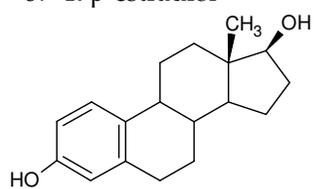
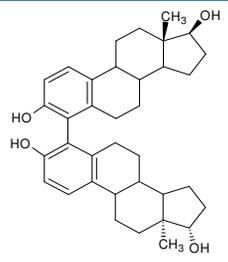
Entre estos ejemplos se encuentra el acoplamiento del compuesto antiviral ácido dihidrocafeico con ácido *p*-aminobenzoico (PABA) para obtener ácido(3-[6-(4-carboxifenil)amino-3,4-dihidroxifenil]-propionico) como principal producto de reacción (Mikolasch *et al.*, 2002) (tabla 2.2, entrada 9), mientras que en el acoplamiento de ácido dihidrocafeico con hexilamina se obtuvo como único producto al ácido 3-(6-hexilamino-3,4-dihidroxifenil)-propiónico (Mikolasch *et al.*, 2002), siendo ambos productos, estructuras hidroxiladas. Sin embargo, estudios posteriores (Niedermeyer *et al.*, 2005) sugieren que la aminación de *o*- y *p*-hidroquinonas siempre resulta en la formación de una quinoamina (tabla 2.2, entrada 10) y, por lo tanto, las reacciones catalizadas por la lacasa no son factibles para la síntesis de aminohidroquinonas, dado que estas últimas son susceptibles a la oxidación.

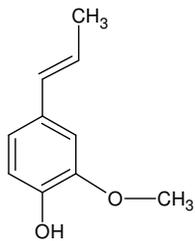
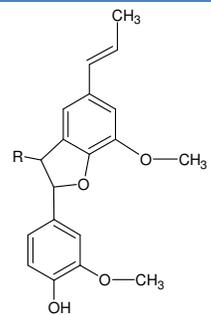
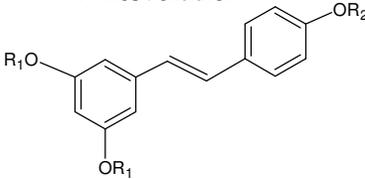
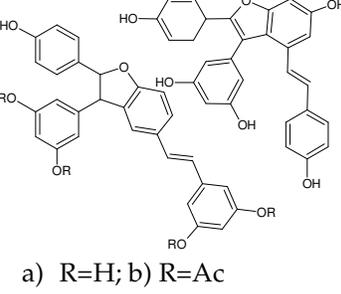
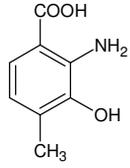
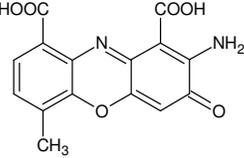
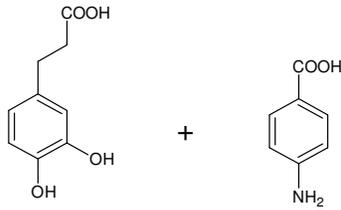
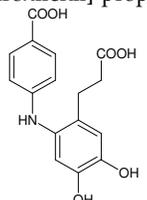
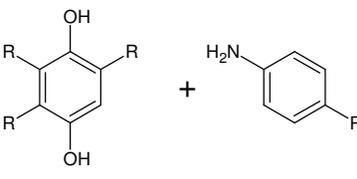
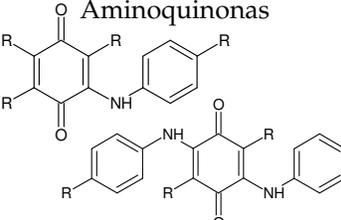
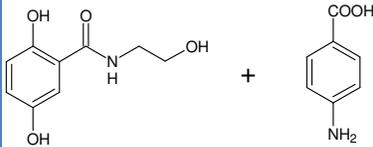
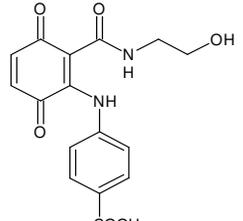
No obstante, los derivados obtenidos de este compuesto antiviral pueden ser interesantes para propósitos farmacéuticos.

Otro caso reportado en la literatura es el acoplamiento de *p*-hidroquinonas (derivados de ácido benzoico *p*-dihidroxilados) y aminas aromáticas (ácido *p*-aminobenzoico) (Niedermeyer *et al.*, 2005; Manda *et al.*, 2005) (tabla 2.2, entrada 11). Los productos obtenidos corresponden a quinonas mono o diaminadas y ya que antibióticos comunes tales como mitomicina (benzoquinona), actinorodina (naftoquinona), tetraciclina y antraciclina son antibióticos que poseen este tipo de estructuras, estos productos también pueden ser de relevancia en la industria farmacéutica.

Los ejemplos anteriormente citados son resumidos en la tabla 2.2.

Tabla 2.2. Ejemplos de reacciones catalizadas por la lacasa

SUSTRATO	REACCIÓN	PRODUCTO	LACASA
1. Alcoholes bencílicos 	Oxidación	Aldehídos 	<i>Corioulus versicolor</i>
2. Imidazoles sustituidos 	Oxidación		<i>Trametes versicolor</i>
3. Penicilina X 	Dimerización (homodímeros)		<i>Coriolus versicolor</i>
4. Bisfenol A 	Dimerización (homodímeros)		<i>Trametes villosa</i>
5. 17β-estradiol 	Dimerización (homodímeros)		<i>Myceliophthora</i> , <i>Trametes pubescens</i>

<p>6. Isoeugenol</p> 	Polimerización		<p><i>Rhus vernicifera</i>, <i>Pycnoporus coccineus</i></p>
<p>7. Resveratrol</p>  <p>a) $R_1 = R_2 = H$; b) $R_1 = Ac$; $R_2 = H$; c) $R_1 = H$; $R_2 = CH_3$</p>	Polimerización	 <p>a) $R = H$; b) $R = Ac$</p>	<p><i>Myceliophthora thermophila</i>, <i>Trametes pubescens</i></p>
<p>8. Ácido 4-metil-3-hidroxi-antranílico</p> <p>2</p> 	Polimerización (homodímeros)	<p>Actinocina</p> 	<p><i>Trametes versicolor</i></p>
<p>9. Ácido dihidrocafeico + PABA</p> 	Acoplamiento (heterodímeros)	<p>Ácido 3-[6-(4-carboxifenil)amino-3,4-dihidroxifenil]-propiónico</p> 	<p><i>Pycnoporus cinnabarinus</i></p>
<p>10. <i>p</i>-hidroquinonas + PABA</p> 	Acoplamiento (heterodímeros)	<p>Aminoquinonas</p> 	<p><i>Trametes spec.</i>, <i>Myceliophthora thermophila</i></p>
<p>11. 2,5-dihidroxi-N-(2-hidroxietil)-benzamida</p> 	Acoplamiento (heterodímeros)	<p>2-(4-carboxi-anilina)N-(2-hidroxietil)3,6-dioxo-1,4-ciclohexadieno-1-carboxamida</p> 	<p><i>Trametes villosa</i></p>

2.5. Síntesis de compuestos oxidados

Diversas subestructuras aromáticas oxidadas, ya sea en formas hidroxiladas (OH) o cetónicas (C=O) son comúnmente encontradas en compuestos farmacéuticos con efectos analgésicos, cardiovasculares o antibióticos. Dichos efectos bioactivos se encuentran ligados a la presencia de los sustituyentes mencionados, por lo que los compuestos oxidados cobran gran interés.

Las hidroxilaciones pertenecen a reacciones de transferencia de oxígeno en donde se introduce el grupo hidroxilo (OH) en moléculas orgánicas, principalmente a través de la sustitución de grupos funcionales o átomos de hidrógeno. Sin embargo, la introducción directa y selectiva del grupo hidroxilo a anillos aromáticos es uno de los campos más desafiantes en la síntesis orgánica moderna.

Gracias a la amplia versatilidad, especificidad, estereoselectividad y la capacidad de trabajar en condiciones no extremas, las enzimas óxido-reductasas tienen un enorme potencial en aplicaciones de síntesis orgánica (Ullrich y Hofrichter, 2007). Estas enzimas pueden transformar una amplia variedad de compuestos aromáticos y alifáticos. Además, pueden funcionalizar hidrocarburos inertes mediante reacciones de hidroxilación, sulfoxidación, epoxidación, etc., de forma ambientalmente amigable, en comparación con los reactivos químicos tradicionales utilizados en este tipo de reacciones (Xu, 2005).

Algunas óxido-reductasas pueden incorporar el oxígeno indirectamente vía mecanismos de radicales libres y/o adición de agua, tal es el caso de la lacasa. Esta enzima no puede hidroxilar directamente anillos fenólicos, pero es capaz de iniciar una cascada de reacciones que puede llevar indirectamente a la formación de *p*-hidroquinonas y *p*-quinonas, vía radicales libres fenoxilos, cationes ciclodienona y la adición de agua (figura 2.9).

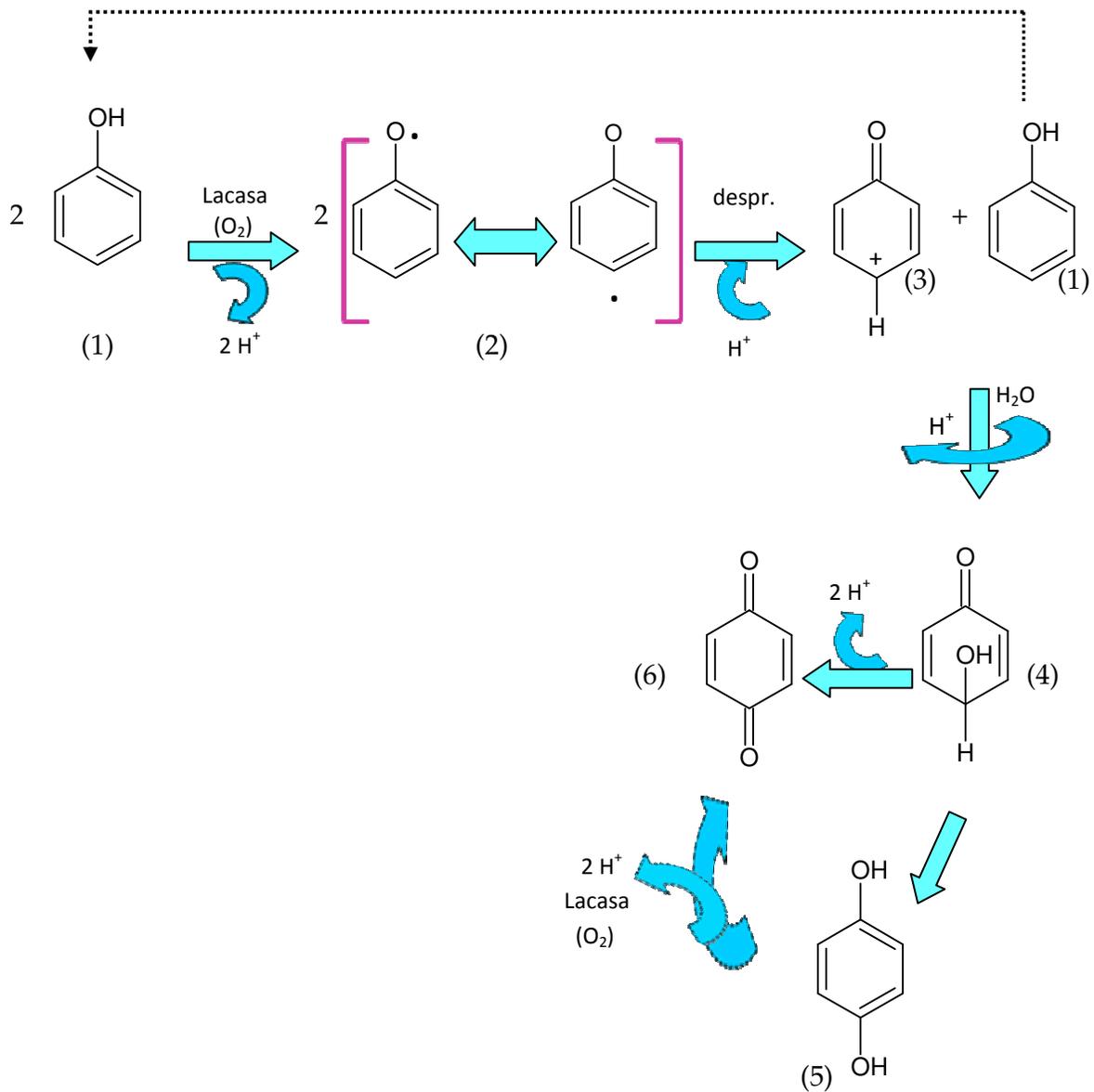


Figura 2.9. Hidroxilación indirecta de fenol por la lacasa. (1) Fenol, (2) Formas mesoméricas del radical fenoxilo que pueden desproporcionar hacia un catión ciclodienona (3) y una molécula de fenol (1), (4) hidroxiciclodienona inestable rearreglándose a hidroquinona (5), o *p*-benzoquinona (6) (Ullrich y Hofrichter, 2007).

Las reacciones entre radicales libres y oxígeno han sido encontradas en diversos compuestos (Fossey *et al.*, 1995). En el caso de la inserción de oxígeno en reacciones catalizadas por la lacasa, se encontró que al utilizar compuestos aromáticos derivados de la lignina, el oxígeno presente en el medio de reacción fue incorporado al producto final al reaccionar con el radical libre producido por la lacasa proveniente del hongo *Coriolus versicolor* (Kawai *et al.*, 1988). Sin embargo, esta introducción ocasionó una apertura del anillo aromático (figura 2.10), originando una muconolactona.

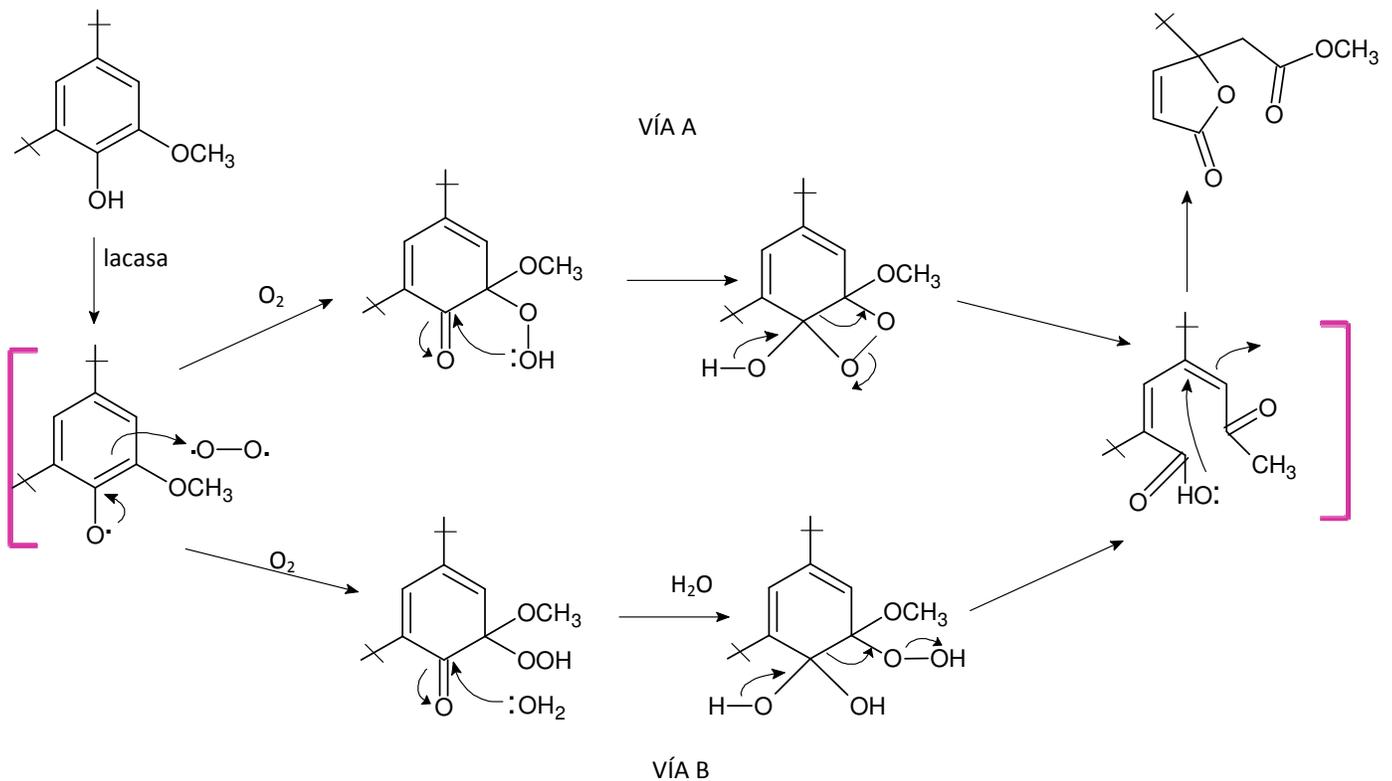


Figura 2.10. Posible mecanismo de reacción entre la lacasa de *Coriolus versicolor* y oxígeno, ocasionando una apertura del anillo fenólico (Kawai *et al.*, 1988).

Así también, en el caso de la oxidación de imidazoles sustituidos, se han encontrado imidazoles con nuevas sustituciones como productos de reacción y se ha sugerido que son resultantes de reacciones entre radicales libres y oxígeno (Schäfer *et al.*, 2001).

2.6. Radicales libres: formación y reactividad

La oxidación de un sustrato por las lacasas involucra la formación de un radical libre sobre el oxígeno o nitrógeno (según sea un fenol o amina); este tipo de radical es resonante y se encuentra deslocalizado en el anillo aromático. La posición que puede ocupar el radical libre en el anillo se muestra en la figura 2.11.

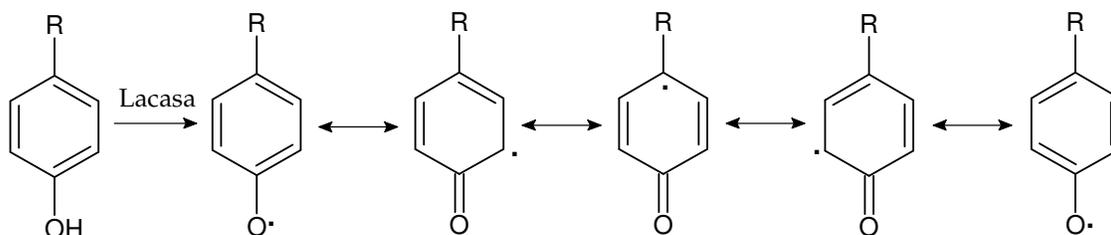


Figura 2.11. Resonancia de un radical fenólico.

Los grupos sustituyentes de los grupos aromáticos pueden dividirse en dos categorías dependiendo de la forma en que influyen en la reactividad del anillo. Aquellos grupos donadores de electrones que hacen que el anillo sea más reactivo que el benceno mismo se llaman *grupos activadores*. Por el contrario, aquellos sustituyentes que actúan como atractores de electrones, provocan que el anillo sea menos reactivo que el benceno y se llaman *grupos inhibidores* (Solomons, 1990). En la tabla 2.3 se incluyen los efectos de estos sustituyentes sobre la reactividad del anillo aromático.

Tabla 2.3. Efectos de los sustituyentes sobre la reactividad de un anillo aromático (Solomons, 1990)

GRUPOS DONADORES DE ELECTRONES	GRUPOS ATRACTORES DE ELECTRONES
<i>Activadores potentes</i>	<i>Inhibidores potentes</i>
- NH ₂ - NHR - OH - NR ₂ - O -	- NO ₂ - NR ₃ ⁺ - NH ₃ ⁺ - CF ₃ - SO ₃ H - CCl ₃ - C≡N
<i>Activadores moderados</i>	<i>Inhibidores moderados</i>
- NHCOCH ₃ - NHCOR - OR - OCH ₃	- COOR - CHO - COOH - COCl - COR
<i>Activadores débiles</i>	<i>Inhibidores débiles</i>
- CH ₃ - C ₂ H ₅ - C ₆ H ₅ - R	- F - Cl - I - Br

3. JUSTIFICACIÓN

Como se mencionó anteriormente, el radical libre producido por las lacasas puede sufrir posteriormente reacciones no enzimáticas, como acoplamiento o polimerización (figura 3.1), particularmente en agua, debido a que son compuestos altamente reactivos y electrofílicos (Gianfreda *et al.*, 1999; Burton, 2003; Kobayashi y Higashimura, 2003). Las reacciones de polimerización encuentran aplicación en la detoxificación de efluentes contaminados (Aktaş *et al.*, 2000) o en la síntesis de polímeros con nuevas propiedades (Karamyshev *et al.*, 2003).

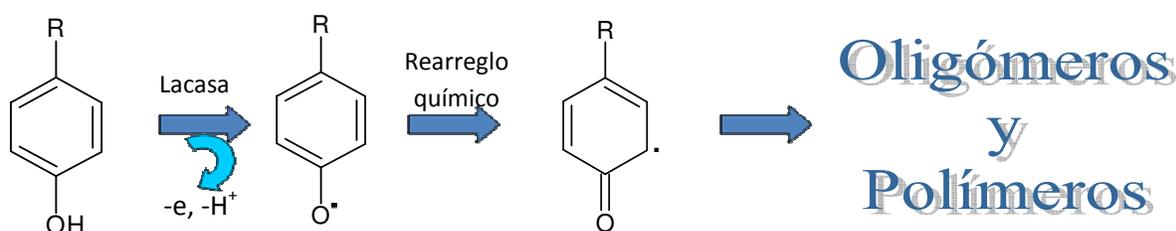


Figura 3.1. Formación de estructuras poliméricas mediante el acoplamiento de radicales libres originados por la lacasa.

Sin embargo, los radicales libres producidos por la lacasa a partir de monofenoles podrían convertirse en compuestos más estables, como derivados hidroxilados o quinonas; esta alternativa no ha sido estudiada a la fecha. Un número de aplicaciones de lacasas pueden ser sugeridas con base en estas reacciones, sin embargo, debe ser eliminada o desfavorecida la reacción de polimerización de los radicales libres.

Así también, mediante una reacción de activación del fenol, utilizando la lacasa, seguida de una reacción química de derivatización del radical libre, se podrían obtener compuestos oxidados de interés en diferentes áreas. Esta estrategia ha sido probada con difenoles (Mikolasch *et al.*, 2002; Niedermeyer *et al.*, 2005; Manda *et al.*, 2005); sin embargo, no se ha probado la factibilidad de realizar este tipo de derivatizaciones con monofenoles (figura 3.2).

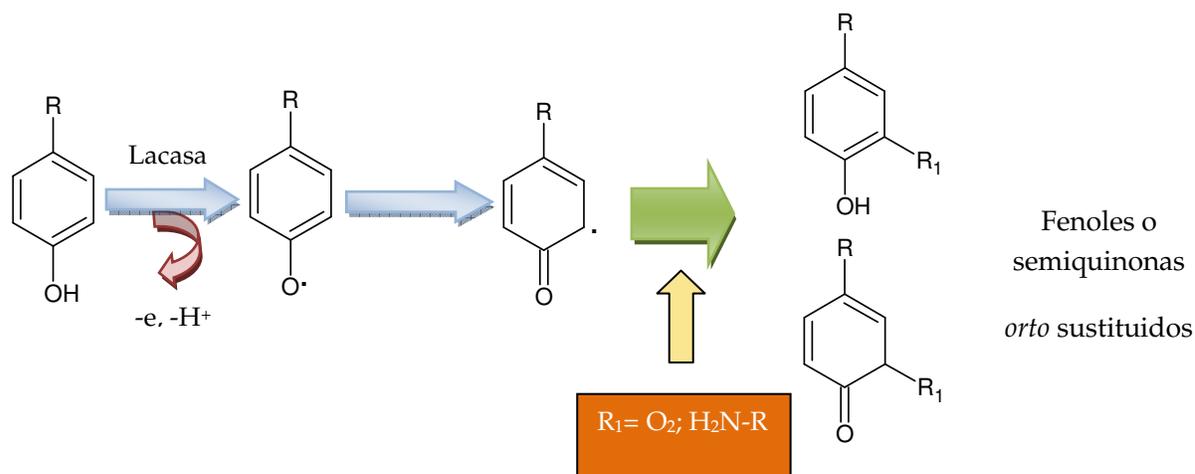


Figura 3.2. Formación hipotética de derivados oxidados a partir de monofenoles.

Considerando que la lacasa es una alternativa interesante para la catálisis de reacciones redox, que no consume cofactores y que únicamente utiliza al oxígeno, ambientalmente amigable en comparación con los agresivos oxidantes químicos, este trabajo pretende utilizar un sistema quimioenzimático basado en una lacasa de origen fúngico para obtener derivados de monofenoles que pueden tener importancia en el área farmacéutica (vitaminas, antibióticos, antivirales, antitumorales, analgésicos) y en la industria química (fungicidas, fragancias, semiconductores, colorantes con aplicación óptica). La síntesis de este tipo de compuestos requerirá utilizar un medio de reacción que evite o reduzca la polimerización de los radicales libres y favorezca la reacción de éstos con moléculas derivatizantes.

4. HIPÓTESIS

Con el empleo de agentes derivatizantes se puede disminuir la reacción de polimerización de radicales libres, para obtener compuestos derivados de monofenoles, utilizando una lacasa de origen fúngico.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general:

- ❖ Oxidar compuestos monofenólicos para la síntesis de derivados utilizando a la lacasa de *Coriolopsis gallica* UAMH 8260.

5.2. Objetivos particulares:

- ❖ Manipular las condiciones de reacción para favorecer la derivatización de radicales monofenólicos con oxígeno.
- ❖ Ensayar la derivatización de radicales monofenólicos con moléculas nucleofílicas.
- ❖ Identificar y caracterizar los productos de oxidación.
- ❖ Explicar el mecanismo de la derivatización.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Para estudiar las condiciones bajo las cuales se puede favorecer la formación de compuestos monofenólicos derivatizados se analizó el efecto del sustituyente del monofenol (p. e. con grupos atractores o donadores de electrones), agentes derivatizantes (p. e. oxígeno y nucleófilos) y reductores (p. e. ácido ascórbico). La estrategia experimental general se muestra en la Figura 6.1.

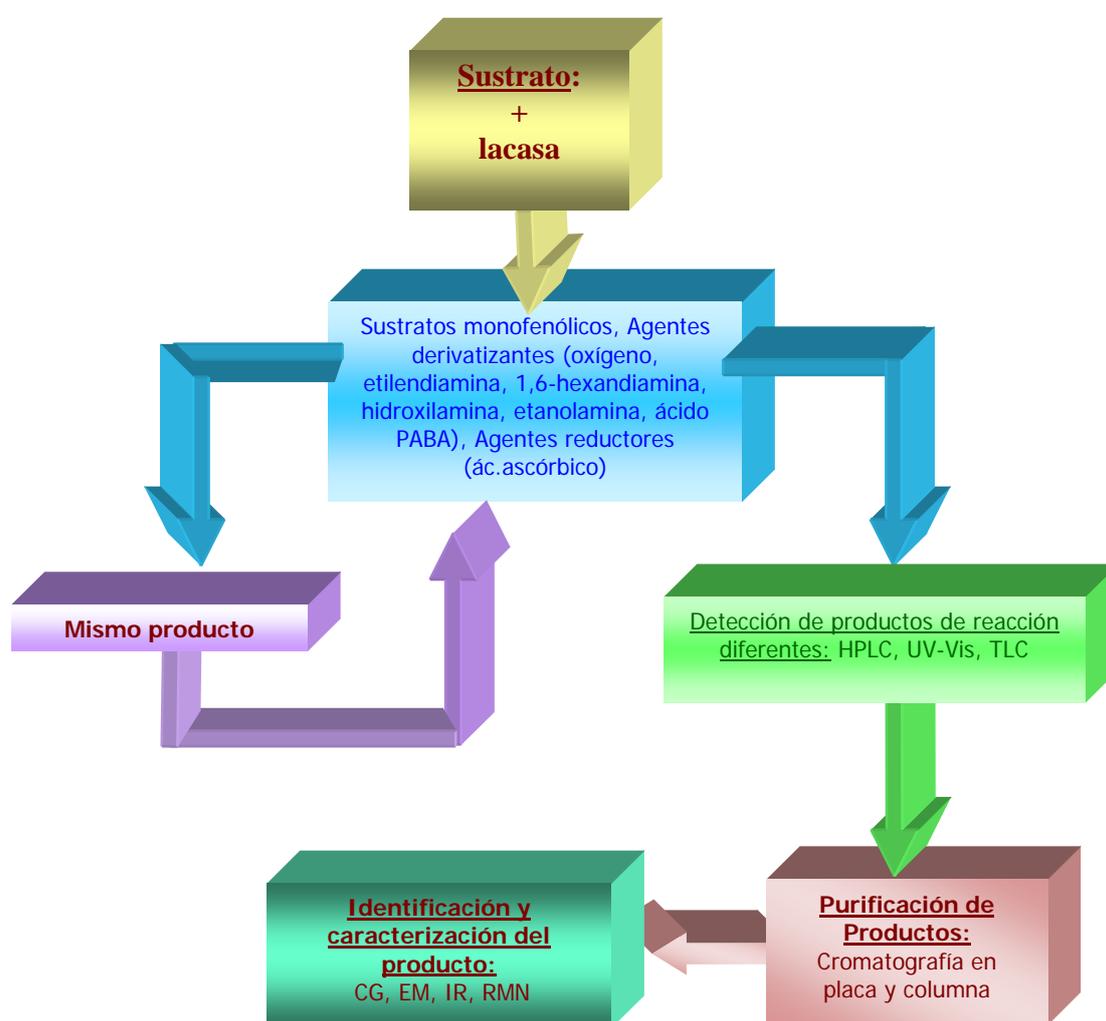


Figura 6.1. Estrategia experimental planteada para el desarrollo de este proyecto.

6.1. Reactivos y solventes

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y se obtuvieron de Sigma-Aldrich Co. Los solventes orgánicos utilizados fueron grado HPLC y fueron obtenidos de Fisher Scientific.

6.2. Preparación de la enzima

La lacasa utilizada en este proyecto es la proveniente del hongo basidiomiceto *Coriolopsis gallica* UAMH 8269. Esta enzima posee un peso molecular de 66,000 Da (Vandertol-Vanier *et al.*, 2002) y fue previamente purificada de acuerdo a lo reportado por Pickard *et al.* (1999).

6.3. Derivatización de radicales fenólicos

6.3.1. Sistema oxígeno/ácido ascórbico

Las reacciones se realizaron en 1 ml, con burbujeo de aire, a temperatura ambiente y en amortiguador de acetatos 100 mM pH 4.5. Se utilizaron como sustratos modelo a la 1-naftilamina y 1-naftol a una concentración de 0.2 mM. La mezcla de reacción contenía ácido ascórbico 1 mM. Las reacciones iniciaron al agregar enzima y fueron detenidas con la adición de HCl diluído, para disminuir el pH hasta 2. El seguimiento de las reacciones se realizó por HPLC a una longitud de onda de 225 nm, utilizando una columna de fase reversa LC-18 (Hypersil ODS 5 μ m, 2.1 x 100 mm), empleando como eluyente un gradiente escalonado de acetonitrilo:agua (80:20).

En algunos casos, se adicionó el ácido ascórbico en pulsos a una concentración equivalente a la del fenol remanente en la reacción, con el fin de mantener en todo momento una relación molar de 1:5 fenol:ácido ascórbico.

Los experimentos controles se realizaron sin adición de ácido ascórbico. Las reacciones se realizaron por duplicado.

6.3.2. Sistema con moléculas nucleofílicas

Se probó una selección de fenoles sustituidos para generar radicales libres y demostrar su reacción con diferentes nucleófilos. Los nucleófilos empleados fueron: ácido *p*-aminobenzoico (PABA), hidroxilamina, etilendiamina, etanolamina y 1,6-hexandiamina.

Se utilizaron varias concentraciones molares nucleófilo:sustrato (1:1, 5:1, 10:1 y 25:1) manteniendo la concentración de sustrato en 0.2 mM. Las reacciones se realizaron en 10 ml de amortiguador de acetatos 100 mM pH 4.5, a temperatura ambiente y con burbujeo de aire. Se realizaron controles de cada nucleófilo, para demostrar que no eran sustratos de la enzima.

Las longitudes de onda para monitorear la desaparición del sustrato fueron determinadas espectrofotométricamente mediante la realización de espectros de absorbancia UV-Vis de 200-400 nm. Las reacciones se iniciaron con la adición de enzima y fueron monitoreadas por HPLC (a una longitud de onda que permitiera observar al sustrato y al nucleófilo), utilizando una columna de fase reversa LC-18 (Hypersil ODS 5 μ m, 2.1 x 100 mm) y empleando como eluyente un gradiente escalonado de acetonitrilo:agua (80:20). En la tabla 6.1 se indican las longitudes de onda utilizadas para cada ensayo.

Tabla 6.1. Longitudes de onda utilizadas para el monitoreo de reacciones con nucleófilos

SUSTRATO	NUCLEÓFILO	LONGITUD DE ONDA (nm)	NUCLEÓFILO	LONGITUD DE ONDA (nm)
4-Etoxifenol	PABA	225	Etanolamina, etilendiamina, hidroxilamina, 1,6- hexandiamina	285
4-Metoxifenol		225		285
4-Aminofenol		225		285
1-Naftilamina		225		220
1-Naftol		225		220
Tirosol		260		225
Anilina		230		225
Alcohol 2-hidroxibencílico		225		225
Ácido 4-hidroxibenzoico		260		250
4-Nitrofenol		320		320
4-Hidroxibenzonitrilo		245		245
4-Hidroxiacetofenona		285		285

6.4. Extracción de productos de reacción

La extracción de productos de reacción se realizó mediante la adición de diclorometano y acetato de etilo al medio de reacción, recuperando los productos que se encontraban en la fase orgánica. Inmediatamente después, el contenido se depositó sobre una columna de vidrio con sulfato de sodio anhidro, recibiendo el filtrado en viales y eliminando el solvente con nitrógeno. Una vez que se secó el contenido del vial, éste se tapó y guardó a 4 °C para análisis posteriores.

6.5. Purificación e identificación del producto

6.5.1. Purificación

Los productos de la reacción de 4-metoxifenol con PABA fueron separados por cromatografía en columna. Se utilizó sílica gel de J. T. Baker con un tamaño de malla de 60-200 micras. Las dimensiones de la columna utilizada fueron 53 cm x 1.5 cm aproximadamente. Para eluir y separar a los productos se utilizó un gradiente de isopropanol-metanol-agua suministrado por una bomba peristáltica utilizada para cromatografía de intercambio iónico. La fracción de interés se eluyó con una mezcla de isopropanol:metanol (60:40). Esta fracción fue secada a alto vacío (aproximadamente 700 mm Hg) a máximo 35°C y almacenada a -20°C.

Así también fue posible purificar el producto de interés con cromatografía en placa preparativa utilizando como eluyente una mezcla de diclorometano:metanol (90:10).

6.5.2. Identificación

6.5.2.1. Espectroscopia infrarroja

Los productos de interés de la reacción de 4-metoxifenol con/sin PABA fueron purificados por HPLC utilizando una columna de fase reversa LC-18 (Hypersil ODS 5µm, 2.1 x 100 mm) y se analizaron por espectroscopia infrarroja (FTIR). Se formó una película depositando gotas de la muestra disuelta en acetato de etilo y se esperó a que el solvente se evaporara. El espectro de infrarrojo se leyó en la región de 650 a 4000 cm^{-1} . Esta determinación se realizó en el Instituto Mexicano del Petróleo (IMP).

6.5.2.2. Resonancia Magnética Nuclear

Se realizaron análisis de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C al producto puro obtenido de la reacción de 4-metoxifenol y PABA, en el Centro de Investigaciones Químicas (CIQ) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) con el apoyo técnico de la M. en C. Silvia Marquina. Los análisis se efectuaron utilizando como solventes metanol y cloroformo deuterados y utilizando una frecuencia de 400 MHz.

6.6. Determinación de concentración de proteína

La cuantificación de proteína se realizó espectrofotométricamente por el método de Bradford y utilizando una curva estándar para albúmina de suero bovino (BSA).

6.7. Determinación de actividad específica de la lacasa

El ensayo estándar para determinar la actividad específica de la enzima con siringaldazina consistió en medir espectrofotométricamente la aparición de producto a 530 nm ($\epsilon = 64,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Para el caso de los fenoles, la actividad específica se determinó por HPLC, a la longitud de onda máxima para cada compuesto, utilizando una columna de fase reversa LC-18 (Supelco 5 μ m, 150 mm x 3.9 mm) y empleando como eluyente un gradiente escalonado de acetonitrilo:agua (80:20).

La actividad específica fue obtenida midiendo la disminución en el área de las bandas después de 10 minutos de reacción y está expresada como moles de sustrato transformado por mol de lacasa por minuto (min^{-1}). Las determinaciones se hicieron por triplicado.

6.8. Efecto de la temperatura sobre la actividad específica de la lacasa

Se determinó el efecto de la temperatura sobre la actividad específica de la enzima a 29, 20, 10 y 0 °C. El experimento se realizó utilizando un baño de temperatura equilibrado a las temperaturas deseadas, midiendo la actividad específica presente en las diferentes temperaturas de reacción. La actividad específica de la lacasa se determinó midiendo la desaparición del ácido ascórbico a 265 nm ($\epsilon = 13,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), a una concentración de 0.1 mM en la reacción y en amortiguador de acetatos 100 mM pH 4.5, previamente saturado con oxígeno. Las reacciones comenzaron con la adición de enzima y se monitorearon cada minuto. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La hipótesis de este trabajo propone que se puede evitar o disminuir la polimerización de radicales libres generados en presencia de la lacasa; el objetivo es convertir estos radicales en derivados oxidados de interés. El radical podría reaccionar con especies como oxígeno y nucleófilos para obtener compuestos hidroxilados y aductos, respectivamente (figura 7.1).

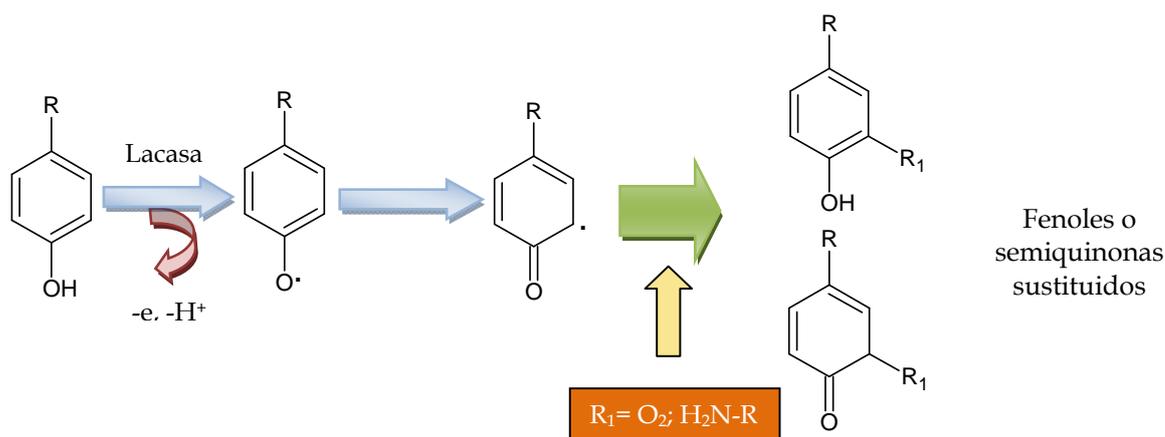


Figura 7.1. Reacción hipotética entre compuestos derivatizantes y los radicales libres producidos por la lacasa.

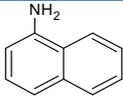
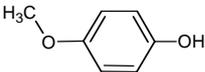
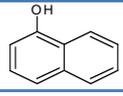
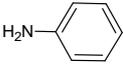
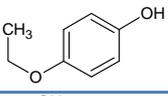
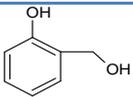
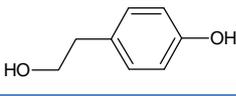
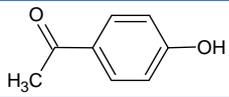
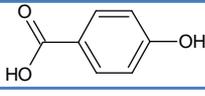
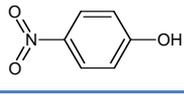
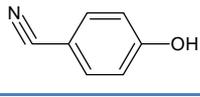
Como primera estrategia se planteó que el radical libre producido por la enzima reaccionaría con el oxígeno, como ha sido sugerido por Kawai *et al.* (1988), y Schäfer *et al.* (2001), para formar un radical peroxilo. Este radical peroxilo en presencia de un agente reductor podría formar un compuesto hidroxilado. La segunda estrategia propone que otra manera de obtener un derivado de los radicales fenólicos es mediante el empleo de un compuesto nucleofílico bifuncional, con el cual se podría formar un aducto.

7.3. Oxidación de monofenoles sustituidos

Se seleccionaron diferentes compuestos que tuvieran solamente un grupo reactivo en presencia de la lacasa (fenol o anilina). Estos compuestos cuentan con diferentes sustituyentes atractores o donadores de electrones.

Así mismo, se incluyeron dos compuestos diaromáticos, cuya derivatización podría resultar de interés en el área farmacéutica y alimentaria. Se realizaron ensayos de oxidación con estos compuestos para determinar si eran sustratos de la lacasa de *Corioloopsis gallica*. Los compuestos utilizados se muestran en la Tabla 7.1. La actividad específica reportada se obtuvo a una concentración de sustrato de 2 mM, sin burbujeo de aire.

Tabla 7.1. Sustratos utilizados

SUSTRATO	ESTRUCTURA	EFEECTO DEL SUSTITUYENTE	ENERGÍA DE IONIZACIÓN (eV) ^a	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (min ⁻¹)
1-Naftilamina		-----	7.34	307 ± 42
4-Metoxifenol		Donador	7.72	182 ± 5
1-Naftol		-----	7.76	207 ± 27
Anilina		-----	7.77	19 ± 3
4-Etoxifenol		Donador	8.25	376 ± 21
Alcohol 2-hidroxibencílico		Donador	8.58	60 ± 4.5
Tirosol		Donador	N. R	252 ± 36
4-Hidroxi acetofenona		Atractor	8.7	N.E
Ácido 4-hidroxi benzoico		Atractor	9.2	N.E
4-Nitrofenol		Atractor	9.2	N.A
4-Hidroxi benzonitrilo		Atractor	9.4	N.A

N. R = No reportado; N. E= No evaluado; N. A = No actividad; ^a = datos tomados de NIST, 2007.

La tabla 7.1 muestra los datos de actividad específica de la lacasa de *C. gallica* a 2 mM de sustrato y la energía de ionización de los fenoles utilizados. Aparentemente, todos los compuestos ensayados fueron sustratos de la enzima, a excepción de aquellos con sustituyentes que se comportan como atractores de electrones y, por lo tanto, tienen una energía de ionización elevada.

El hecho de no poder oxidar compuestos con una elevada energía de ionización, llevó a pensar que, probablemente, la lacasa de *Corioloropsis gallica* no posee un potencial redox alto en el sitio CuT1. Se realizó una búsqueda bibliográfica del potencial redox de la lacasa de *C. gallica*, sin embargo, no ha sido reportado. No obstante, podría inferirse a partir de su secuencia, ya que existen motivos conservados en las secuencias de las lacasas con un alto potencial redox. Como se mencionó en la introducción, algunos autores (Piontek *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 1998; Ducros *et al.*, 1998; Garavaglia *et al.*, 2004) han observado que la histidina que coordina al cobre T1 es precedida por un tripéptido Leu-Glu-Ala; esta secuencia se encuentra conservada en las lacasas con alto potencial redox, así como el residuo Ser 113 que forma un puente de hidrógeno con el residuo glutámico en dicho péptido.

En las bases de datos se encuentra únicamente la secuencia para dos lacasas de *Corioloropsis gallica* (cepa IJFM A241 y SAH-12) (PubMed, 2007). La primera no cuenta con los motivos descritos, mientras que la segunda sí cuenta con ellos. La secuencia de la lacasa de *C. gallica* UAMH 8260, utilizada en este trabajo, no ha sido reportada. Sin embargo, en el grupo de investigación del Dr. Enrique Rudiño, del Instituto de Biotecnología de la UNAM, se ha cristalizado a la lacasa de esta cepa y se ha obtenido una secuencia probable (De la Mora y Rudiño, comunicación personal). Estos datos fueron extraídos de un mapa de densidad electrónica a 1.65 Å de resolución, junto con la sobreposición de todas las secuencias que encontraron de lacasas fúngicas. El alineamiento en la región del tripéptido conservado en las lacasas de alto potencial redox se muestra en la tabla 7.2.

Tabla 7.2. Secuencia de aminoácidos en donde podría encontrarse el tripéptido característico en lacasas con potencial redox alto (Xu *et al.*, 1998)

Lacasa	Alineación de secuencia	E° (V)
<i>Myceliophthora thermophila</i>	502 H C H I A W H V S G G L ⁵¹³	0.47
<i>Scytalidium thermophilum</i>	506 H C H I A W H V S G G L ⁵¹⁷	0.51
<i>Rhizoctonia solani</i>	459 H C H I D W H L E A G L ⁴⁷⁰	0.71
<i>Trametes villosa</i>	452 H C H I D F H L E A G F ⁴⁶³	0.78
<i>Trametes versicolor</i>	452 H C H I D F H L E A G F ⁴⁶³	0.79
<i>Coriolopsis gallica</i> ^a	453 H C H I D F H L E A G F ⁴⁶⁴	?

^a= De la Mora y Rudiño, comunicación personal

Como se puede observar, en la secuencia propuesta para la lacasa de *Coriolopsis gallica* se encuentra el tripéptido Leu-Glu-Ala característico de lacasas con altos potenciales redox (Piontek *et al.*, 2002). Adicionalmente, nuestro grupo ha reportado una comparación entre los parámetros cinéticos de diferentes lacasas, incluyendo la lacasa de *C. gallica* y *T. versicolor*, que es de alto potencial redox (Tinoco *et al.*, 2001). Al parecer, ambas lacasas son capaces de oxidar sustratos con potencial redox elevado, como siringaldazina, ABTS y guayacol, con parámetros cinéticos similares. Estas observaciones sustentan la posibilidad de que la lacasa de *C. gallica* UAMH 8260 sea de alto potencial redox.

Xu (1996) observó una tendencia semilogarítmica entre la eficiencia catalítica de las lacasas y el potencial redox (E^0) de los sustratos ensayados. En este trabajo se utilizaron lacasas fúngicas recombinantes de alto, medio y bajo potencial redox y se encontró que la lacasa del hongo *T. versicolor* (de alto potencial redox), fue capaz de oxidar compuestos con grupos atractores de electrones, aunque con una baja eficiencia catalítica. Lo anterior indica que, aún para las lacasas con un alto potencial redox, los compuestos con grupos atractores de electrones son malos sustratos para la enzima.

Con el objetivo de comprobar si para esta lacasa se observa la misma tendencia, en este trabajo se correlacionó la actividad específica con la energía de ionización de los fenoles medida en fase gaseosa por el método de impacto de electrones (NIST). La energía de ionización es la energía necesaria para desprender un electrón de una molécula y, por lo tanto, se encuentra relacionada con el potencial redox. Debido a que el potencial redox es medido en solución acuosa y algunos factores pueden afectar su interpretación (reacciones irreversibles o falta del alcance del equilibrio), se decidió hacer esta correlación con la energía de ionización. Además, se ha observado una relación semilogarítmica entre la actividad específica y la energía de ionización para algunas peroxidasas (Ayala *et al.*, 2000), que al igual que las lacasas, catalizan reacciones redox mediante la abstracción de un electrón del sustrato (Kersten *et al.*, 1990). En la figura 7.2 se grafica el logaritmo de la actividad específica de la lacasa hacia los sustratos utilizados, en función de la energía de ionización de los mismos.

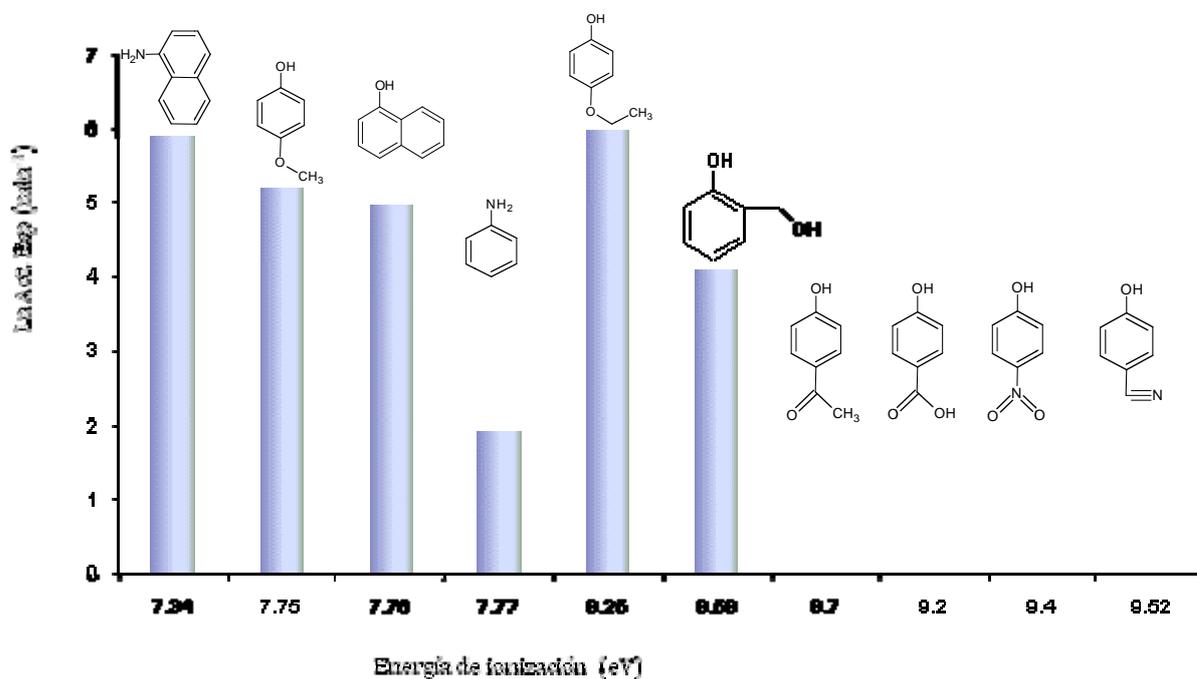


Figura 7.2. Actividad específica de la lacasa en función de la energía de ionización de los fenoles utilizados.

La tendencia esperada era que a menor energía de ionización del sustrato se obtuvieran actividades específicas mayores, sin embargo, en algunos casos (p. e. anilina) se obtuvieron actividades específicas muy bajas. Como puede observarse en la figura anterior, en el caso de la lacasa de *C. gallica* no existe una correlación evidente entre la energía de ionización de los sustratos utilizados y la actividad específica. Una posible explicación podría ser que tal vez las mediciones de actividad específica no se realizaron bajo condiciones de saturación. Por lo tanto, se realizaron las curvas de saturación para 1-naftilamina, 1-naftol, 4-metoxifenol, 4-etoxifenol y anilina con el fin de descartar esta hipótesis. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 7.3:

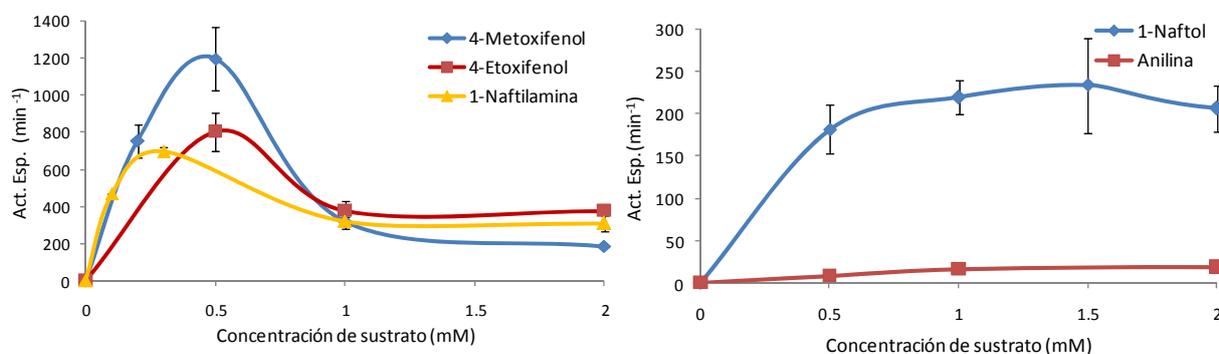


Figura 7.3. Actividad específica de la lacasa de *C. gallica* a diferentes concentraciones de sustrato.

En las curvas de saturación obtenidas puede apreciarse que las mayores actividades específicas se alcanzaron con 4-metoxifenol y 4-etoxifenol, lo cual está de acuerdo con lo ya reportado en la literatura (Baldrian, 2006), mientras que la anilina presenta las menores actividades específicas, independientemente de la concentración de sustrato utilizada. Es notable que para los tres sustratos que son oxidados rápidamente en presencia de la lacasa (4-metoxifenol, 4-etoxifenol y 1-naftilamina) hay un descenso abrupto de la actividad específica a concentraciones mayores a 0.5 mM.

Este comportamiento atípico sugiere que la enzima puede ser propensa a una rápida inactivación por radicales libres, lo cual ha sido observado también en otras óxido-reductasas, tales como las peroxidasas (Valderrama *et al.*, 2002) o bien, a la existencia de una limitación en la concentración de oxígeno presente en el medio de reacción. Con el fin de encontrar la causa de la caída de la actividad específica, se midió la actividad residual de la enzima al ser incubada con diferentes concentraciones de 4-metoxifenol (figura 7.4 a) y también, se midió la actividad específica con 4-metoxifenol en reacciones burbujeadas con aire (figura 7.4 b).

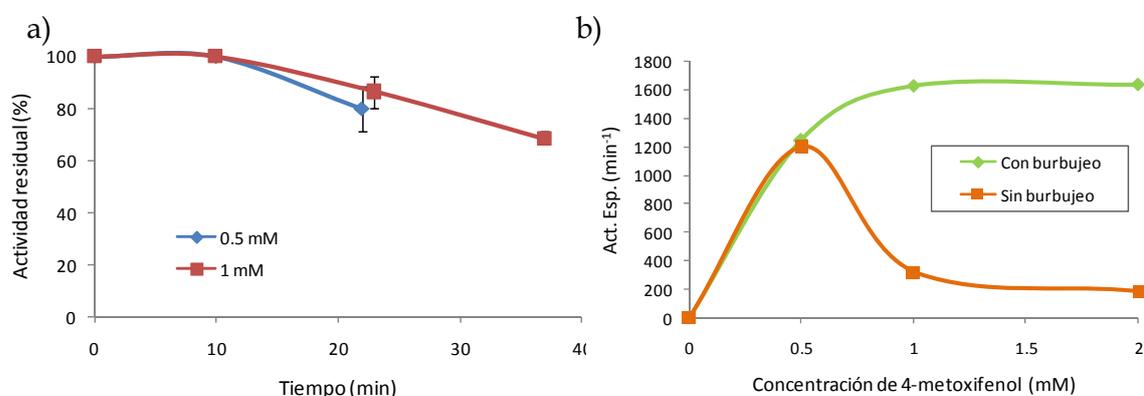


Figura 7.4. Experimentos adicionales para explicar la caída en la actividad específica de la lacasa. a) Actividad residual en presencia de 4-metoxifenol; b) Efecto del burbujeo de aire sobre la actividad específica.

La figura 7.4 (a) indica que la lacasa se inactiva lentamente en presencia de su sustrato. En el caso de la reacción con 1 mM de 4-metoxifenol, se puede observar que después de 30 minutos de incubación la enzima aún mantiene aproximadamente un 80% de actividad residual. Sin embargo, aunque la lacasa se inactiva en presencia de los radicales fenólicos, este hecho no explica la caída drástica de la actividad específica observada en la figura 7.3, pues a 10 minutos de reacción (tiempo de ensayo utilizado en la figura 7.3) todavía mantiene el 100% de actividad.

Por otra parte, al evaluar el efecto del burbujeo de aire es posible observar que no se repite el patrón obtenido en la figura 7.3. Por el contrario, se observa que bajo estas condiciones se alcanza la saturación de la enzima. Este resultado indica que, aún en volúmenes pequeños de reacción (1-5 ml), el oxígeno disuelto se consume lo suficiente para limitar la reacción, y la velocidad de disolución del oxígeno atmosférico no es suficientemente alta para mantener las velocidades de reacción en presencia de lacasa.

La limitación por oxígeno se puede estimar cuando se considera la estequiometría de la reacción para la reducción de oxígeno a agua (4 moles de sustrato/mol de oxígeno) (tabla 7.3):

Tabla 7.3. Datos obtenidos considerando la estequiometría de la reacción en 1 mL

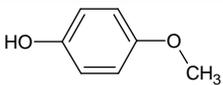
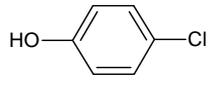
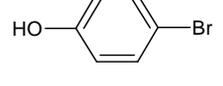
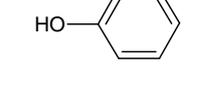
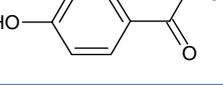
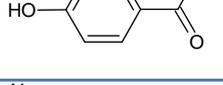
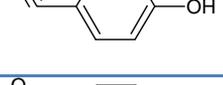
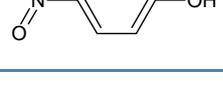
Conc. de sustrato (mM)	Moles de sustrato ($\times 10^{-9}$)	Moles de oxígeno ($\times 10^{-9}$) necesarios para convertir 100% de sustrato	Moles de O ₂ disponibles (1×10^{-9})
0.5	500	125	240
1	1000	250	240

Considerando que la concentración de saturación del oxígeno en agua corresponde a 0.24 mM a 29 °C y 760 mm Hg (Millero *et al.*, 2002), el oxígeno disponible en 1 mL de reacción es suficiente para la conversión total de 0.5 mM de 4-metoxifenol. Sin embargo, al realizar reacciones con 1 mM o más de sustrato, sin burbujeo de aire, la reacción se encuentra limitada por oxígeno. Estos datos ayudan a explicar la caída de actividad observada en la figura 7.3. Dicha pérdida de actividad puede en realidad ser una subestimación en los valores, puesto que es muy probable que la reacción terminara antes de los 10 minutos considerados para los cálculos, provocando la obtención de valores menores de actividad.

Con estas evidencias, puede decirse que probablemente la correlación entre la actividad específica y la energía de ionización no fue encontrada debido a que se subestimaron los valores reales de actividad específica, ya que la reacción estuvo limitada por oxígeno.

Durante el desarrollo de este trabajo, el grupo publicó un método para estimar el potencial redox de peroxidasas (Ayala *et al.*, 2007), basado en la teoría de Marcus y Sutin (1985). Esta teoría propone una correlación entre la velocidad de transferencia de electrones y el potencial redox de los sustratos y de la enzima. Por lo anterior, decidió hacerse un estudio similar para la lacasa de *C. gallica*, utilizando la actividad específica de la enzima obtenida al burbujear aire en el medio de reacción. Los resultados se muestran en la tabla 7.4 y en la figura 7.5:

Tabla 7.4. Monofenoles transformados por la lacasa con burbujeo de aire

Sustrato	Estructura	Potencial Redox (V)	Actividad Específica (min ⁻¹)
4-metoxifenol		0.72	1641 ± 23
4-metilfenol		0.87	241 ± 21
4-clorofenol		0.94	97.2 ± 11
4-bromofenol		0.96	68.2 ± 4
Fenol		0.97	12.3 ± 0.6
4-hidroxiacetofenona		0.98	1.21
Ácido 4-hidroxibenzoico		1.04	0.47 ± 0.08
4-hidroxibenzonitrilo		1.17	0.015
4-nitrofenol		1.23	0.04

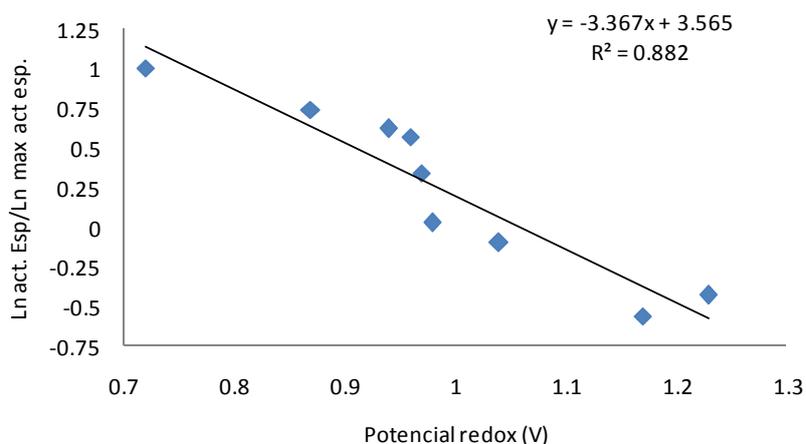


Figura 7.5. Correlación semilogarítmica entre la actividad específica de la lacasa y el potencial redox de una selección de fenoles utilizados por Ayala *et al.* (2007).

Los datos mostrados en la tabla 7.4 corroboran que la lacasa de *C. gallica* cataliza ineficientemente la oxidación de monofenoles con potencial redox elevado. Por otro lado, la figura 7.5 demuestra que también para esta lacasa existe una correlación semilogarítmica entre la actividad específica (medida en condiciones de saturación de oxígeno disuelto y sustrato) y el potencial redox del mismo, es decir, obedece a la teoría de transferencia de electrones en la esfera exterior propuesta por Marcus y Sutin (1985).

Esta teoría (Marcus y Sutin, 1985), propone una relación entre la velocidad de transferencia de un electrón del sustrato hacia la enzima; siendo regulada la velocidad o energía de activación por una diferencia de potencial redox (Ecuación 1).

$$\ln k_{ET} = \ln k_0 - \frac{\lambda}{4RT} + \frac{F\Delta E}{2RT} + \frac{F^2\Delta E^2}{4\lambda RT} \quad (1)$$

- k_{ET} = Velocidad de transferencia de un electrón
- k_0 = Velocidad de activación de la transferencia de un electrón en el complejo enzima-sustrato
- ΔE = Fuerza conductora de electrones
- λ = Energía de reorganización
- F = Constante de Faraday
- R = Constante general de los gases
- T = Temperatura absoluta

Así, éste enfoque fue utilizado para la determinación del potencial redox de peroxidasas (Ayala *et al.*, 2007), considerando que dicha correlación estaría reflejada por la velocidad inicial de la oxidación de un sustrato, es decir, la actividad específica obtenida en condiciones de saturación. Para encontrar el valor de potencial redox de las peroxidasas, estos autores asumieron que cuando el potencial redox del sustrato (E°_S) y el de la enzima (E°_E) poseen el mismo valor, la fuerza conductora de electrones es igual a cero ($\Delta E = 0$) (ecuación 2).

$$\ln k_{ET} = \ln k_0 - \frac{\lambda}{4RT} + \frac{F\Delta E}{2RT} + \frac{F^2\Delta E^2}{4\lambda RT} \quad (2)$$

Posteriormente, de datos obtenidos de Folkes y Candeias (1997), encontraron que la energía presente en la reacción con la peroxidasa de rábano blanco, correspondía al 8 % de la actividad obtenida en la oxidación de 4-metoxifenol, cuando el potencial redox del sustrato (E°_S) y el del compuesto I (E°_E) tenían el mismo valor ($\Delta E = 0$), (ecuación 3):

$$\ln k_{ET} = \ln k_0 - \frac{\lambda}{4RT} = \ln 0.08k_{ET \text{ 4-metoxifenol}} \quad (3)$$

De esta forma, utilizando los datos obtenidos de la ecuación de la recta, podría estimarse el potencial redox de las peroxidasas (ecuación 4).

Si de la recta $y = mx + b$, entonces $\ln k_{ET} = mE^{\circ}_S + b$, por lo tanto,

$$E^{\circ}_S = \frac{\ln k_{ET} - b}{m} \quad (4)$$

Si $\Delta E = E^{\circ}_E - E^{\circ}_S = 0$, entonces $E^{\circ}_E = E^{\circ}_S$

Sin embargo, no es posible aplicar este método para la determinación del potencial redox de lacasas, ya que el término correspondiente a la velocidad de transferencia de un electrón (k_{ET}), obtenido a partir de la energía de reorganización (λ) y la velocidad de activación de la transferencia de un electrón en el complejo enzima-sustrato (k_0), es desconocido para estas enzimas. No obstante, será interesante investigar si este estudio puede extenderse a otras lacasas, con el fin de caracterizar su poder oxidativo, como se hizo para las peroxidasas (Ayala *et al.*, 2007).

7.4. Formación de derivados en presencia de oxígeno y un agente reductor

Como se mencionó anteriormente, se hipotetiza que el radical fenoxilo formado por la enzima (paso 1, figura 7.6), se estabilizará por resonancia en el anillo aromático (paso 2, figura 7.6). Este radical podría reaccionar con el oxígeno presente en el medio de reacción para formar un radical peroxilo (paso 3, figura 7.6), el cual podría ser reducido en presencia de un reductor para formar un compuesto hidroxilado o una quinona (paso 4, figura 7.6).

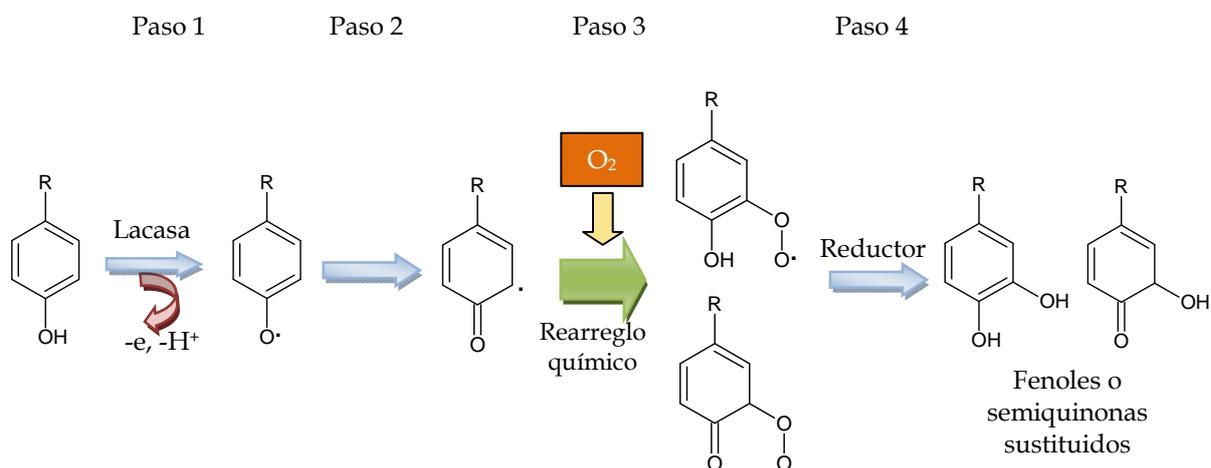


Figura 7.6. Reacción hipotética del radical libre en presencia de oxígeno y un reductor.

Con el fin de favorecer la reacción entre los radicales libres y el oxígeno, se decidió incrementar la concentración de éste en el medio de reacción. Una manera de hacerlo es disminuyendo la temperatura de reacción. Sin embargo, es necesario asegurarse de que la enzima sigue activa a temperaturas bajas. Por lo tanto, se midió la actividad específica de la lacasa a temperaturas menores a 30°C (Figura 7.7).

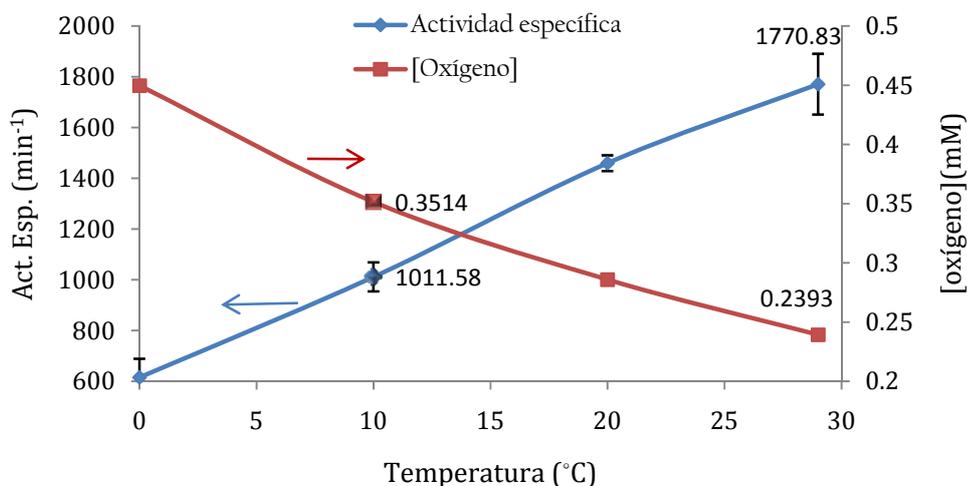


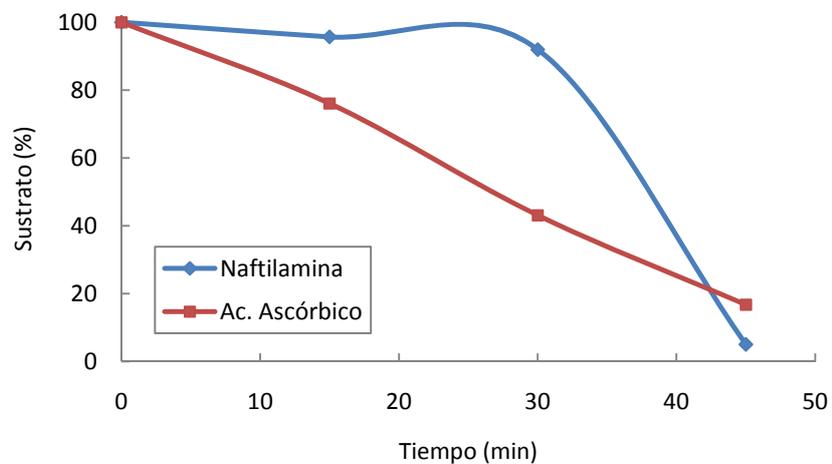
Figura 7.7. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la lacasa. Los datos de oxígeno disuelto fueron tomados de Millero *et al.* (2002).

Como se esperaba, los resultados muestran que la actividad específica es menor a medida que desciende la temperatura de la reacción. Sin embargo, esta disminución es gradual y a 10°C es posible tener más del 50% de la actividad que se tiene a 30°C. Bajo estas condiciones, se tiene un incremento de cerca de 50% en el oxígeno disuelto.

Se seleccionó ácido ascórbico como reductor, debido a su solubilidad y potencial redox bajo. Se realizaron reacciones en presencia de ácido ascórbico y a 10 °C con burbujeo de oxígeno puro, para favorecer la conversión del radical libre a radical peroxilo. Se utilizaron a la 1-naftilamina y 4-metoxifenol como sustratos modelo. Al monitorear las reacciones por HPLC, no se apreció la formación de productos diferentes a los obtenidos en la reacción sin reductor, lo cual podría indicar que aún bajo estas condiciones la velocidad de reacción entre el radical fenoxilo y el oxígeno es lenta en comparación con la reacción dada entre los radicales libres.

En cuanto a la presencia del agente reductor, se observó que la 1-naftilamina es transformada rápidamente en ausencia de ácido ascórbico (Figura 7.8). Sin embargo, la velocidad de transformación es menor cuando se adiciona ácido ascórbico a la reacción. El mismo comportamiento se presentó al utilizar 1-naftol.

a)



b)

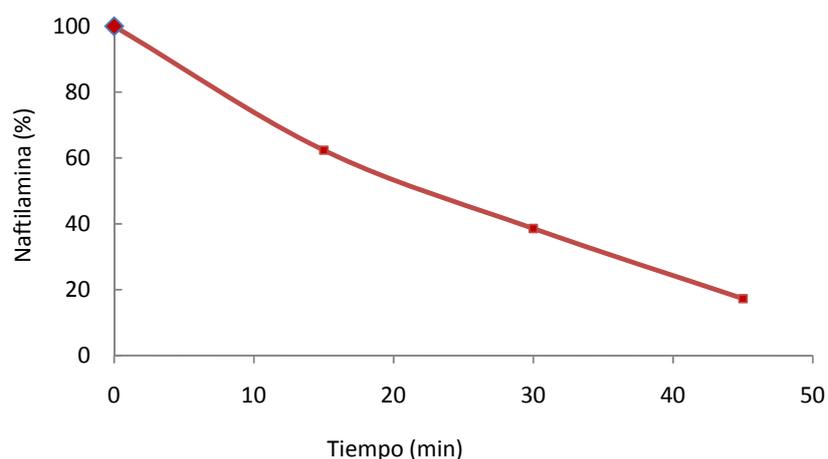


Figura 7.8. Desaparición de 1-naftilamina (a) en presencia de lacasa y ácido ascórbico; b) Consumo de naftilamina en ausencia del reductor.

Ya que el ácido ascórbico es sustrato para la enzima, es probable que exista una competencia con los sustratos de interés, ocasionando que cuando la enzima comience a oxidar a la 1-naftilamina o al 1-naftol no haya suficiente cantidad de agente reductor para reaccionar con el hipotético radical peroxilo (paso 4, figura 7.6).

Para limitar el consumo de ácido ascórbico por la enzima y promover que el reductor actuara sobre el hipotético radical peroxilo, se realizó un experimento adicionando ascórbico en pulsos. Los resultados obtenidos en este experimento se muestran en la figura 7.9.

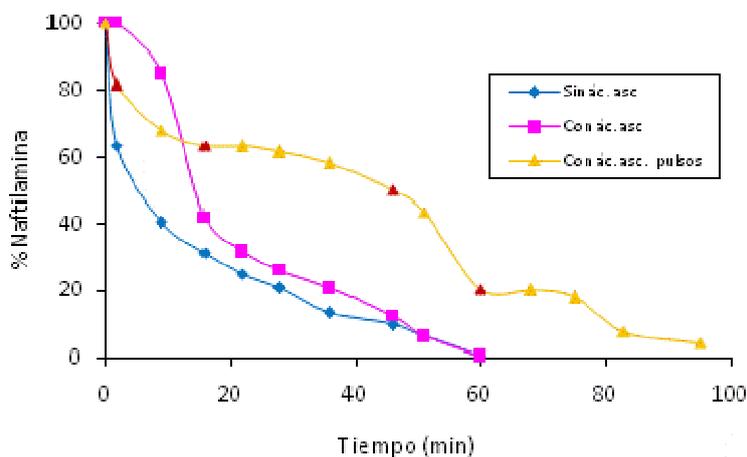


Figura 7.9. Efecto del ácido ascórbico adicionado en pulsos en la reacción de oxidación de 1-naftilamina. Los triángulos morados indican el tiempo de adición de ácido ascórbico.

Como puede observarse en la figura anterior, aún con la adición periódica de ácido ascórbico se retardó la desaparición de la 1-naftilamina y, al igual que en experimentos sin adición de agente reductor, esto tampoco ayudó a obtener los compuestos esperados. El mismo comportamiento se observó para el 1-naftol.

Los productos de estas reacciones se inyectaron en el cromatógrafo de gases para identificar su estructura, sin embargo, ni aun derivatizándolos para hacerlos más volátiles fue posible detectarlos. Es muy posible que los productos de estas reacciones sean polímeros de alto peso molecular que no son volátiles, por lo tanto, no pueden ser detectados de este modo.

Típicamente las velocidades de reacción entre radicales libres centrados en carbono se encuentra en el orden de $k \approx 10^8 - 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, excepto para especies con carga, para las que las velocidades de acoplamiento son menores debido al efecto de la repulsión electrostática (Ross *et al.*, 1995).

La velocidad de la reacción entre el oxígeno y los radicales libres centrados en carbono, varía de acuerdo a la estructura química del radical libre. Por ejemplo, en el caso de los radicales alifáticos la reacción está básicamente controlada por la difusión ($k \approx 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), formando en la mayoría de los casos radicales peroxilos por adición de oxígeno (Ross *et al.*, 1995).

Así mismo, los radicales bencílicos reaccionan extremadamente rápido ($k \approx 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) y de manera irreversible con oxígeno a temperatura ambiente (Maillard *et al.*, 1983). Por otro lado, para hidrocarburos formados por varios anillos aromáticos, las reacciones con oxígeno son más lentas ($k \approx 10^5 - 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Font-Sanchis *et al.*, 2003). En este tipo de moléculas, los factores que incrementan la estabilidad del radical libre y por tanto, disminuyen la velocidad de reacción con oxígeno son: deslocalización por resonancia y sobre heteroátomos, efectos estéricos y grupos sustituyentes que se comportan como donadores de electrones (Bejan *et al.*, 2001).

Con base en estos antecedentes y las observaciones realizadas en este trabajo, se puede concluir que es probable que no se esté formando el radical peroxilo a partir del radical fenólico, debido a que la reacción con el oxígeno es comparativamente lenta. Las estrategias utilizadas (disminuir la temperatura para incrementar la concentración de oxígeno, utilizar baja concentración de enzima y tiempos largos de reacción, añadir un reductor para convertir el radical peroxilo en un derivado hidroxilado) no funcionaron para favorecer la reacción entre el radical fenólico y el oxígeno, a pesar de que ha sido reportada con anterioridad (Kawai *et al.*, 1988; Schäfer *et al.*, 2001).

Los datos anteriores indican que, a pesar de la existencia de antecedentes bibliográficos que indican que el radical fenoxilo producido por la lacasa puede reaccionar con el oxígeno presente en el medio de reacción (Kawai *et al.*, 1988; Schäfer *et al.*, 2001), no fue posible lograr que se sintetizaran compuestos hidroxilados mediante la reacción entre oxígeno y el radical peroxilo y el efecto reductor del ácido ascórbico, utilizando a la lacasa de *C. gallica*.

7.5. Empleo de moléculas nucleofílicas

Otra de las estrategias propuestas para obtener compuestos monofenólicos derivatizados, consiste en introducir moléculas nucleofílicas pequeñas (figura 7.10). Se ha reportado que los radicales libres generados por la lacasa a partir de difenoles, reaccionan con nucleófilos presentes en el medio para formar aductos (Manda *et al.*, 2005; Mikolasch *et al.*, 2002; Niedermeyer *et al.*, 2005). Sin embargo, no se ha explorado la posibilidad de utilizar monofenoles.

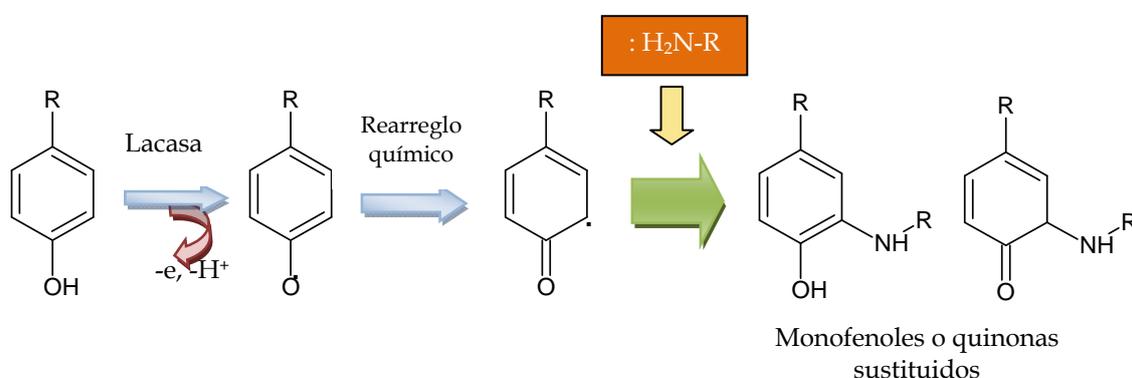


Figura 7.10. Estrategia para la obtención de derivados fenólicos con el empleo de moléculas nucleofílicas.

En este caso, se propone que una vez que el radical libre producido por la lacasa se estabilice por resonancia en el anillo, reaccionará con uno de los electrones disponibles en una molécula nucleófila, para llevar a la formación de un aducto por acoplamiento cruzado.

Los compuestos nucleofílicos utilizados fueron la hidroxilamina, etanolamina, etilediamina, 1,6-hexandiamina y ácido *p*-aminobenzoico (PABA) (tabla 7.5).

Tabla 7.5. Compuestos nucleófilos utilizados

NUCLEÓFILO	ESTRUCTURA
Etilendiamina	<chem>NCCN</chem>
Etanolamina	<chem>NCCO</chem>
1,6- Hexandiamina	<chem>NCCCCCCN</chem>
Hidroxilamina	<chem>NO</chem>
Ácido <i>p</i> -aminobenzoico (PABA)	<chem>NC(=O)c1ccc(O)cc1</chem>

Se realizaron diversos experimentos utilizando nucleófilos y sustratos, en los que se variaron la relación de concentraciones nucleófilo/sustrato (1:1, 5:1, 10:1 y 25:1), tiempos de reacción y concentraciones de enzima. Sin embargo, la mayoría de las reacciones realizadas en presencia de los nucleófilos no mostraron la aparición de productos diferentes a los obtenidos sin ellos, al ser analizadas por HPLC, espectros de absorbancia UV-Vis, o cromatografía en capa fina (TLC). Solamente en la reacción con 4-metoxifenol y PABA se observó en TLC y HPLC, la presencia de una especie diferente (Figura 7.11) al utilizar concentraciones equimolares de sustrato y nucleófilo.

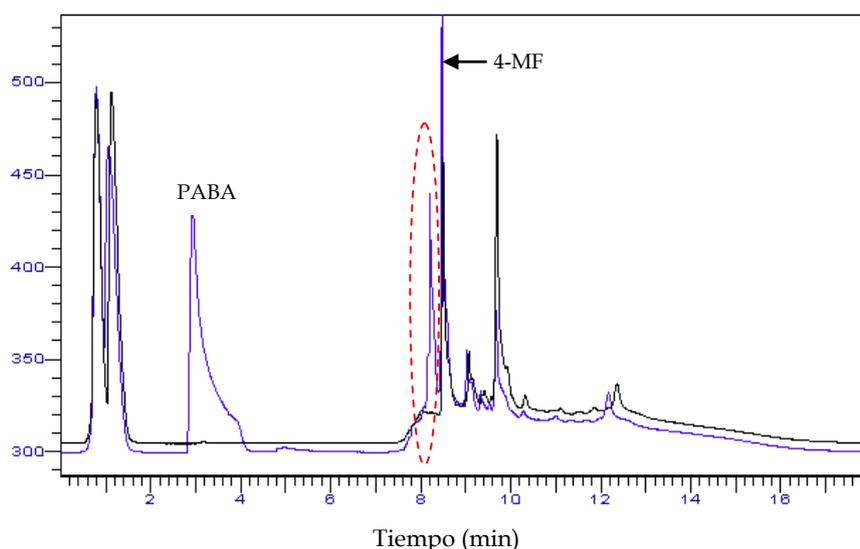


Figura 7.11. Cromatograma de HPLC de la reacción de 4-metoxifenol sin PABA (línea negra) y con PABA (línea azul). El óvalo rojo indica la banda correspondiente a la especie diferente formada en la reacción con PABA.

Como puede observarse en la figura 7.11, en el caso de la reacción con PABA aparece una banda única (alrededor de los 8 minutos); así también, aproximadamente a los 10 minutos se localiza una banda que indica la formación de una especie común en las dos reacciones; esta especie común se encuentra en menor cantidad en la reacción con PABA, indicando con ello que en presencia de este compuesto se favoreció la formación de un producto nuevo. En la Figura 7.12 se presentan las evidencias de la obtención de un producto diferente; estas evidencias incluyen al espectro de absorbancia de las bandas eluidas a los 8 minutos, en reacciones en presencia y ausencia de PABA (figura 7.12 a), así como el del producto eluido a los 10 minutos. En ellos, puede observarse como el espectro UV-Vis del producto nuevo (proveniente de la reacción con PABA), presenta un espectro distinto a lo que eluye al mismo tiempo en la reacción sin nucleófilo y al del producto común.

Adicionalmente, en una placa de TLC también se aprecia la presencia del compuesto obtenido en la reacción con PABA (figura 7.12 b).

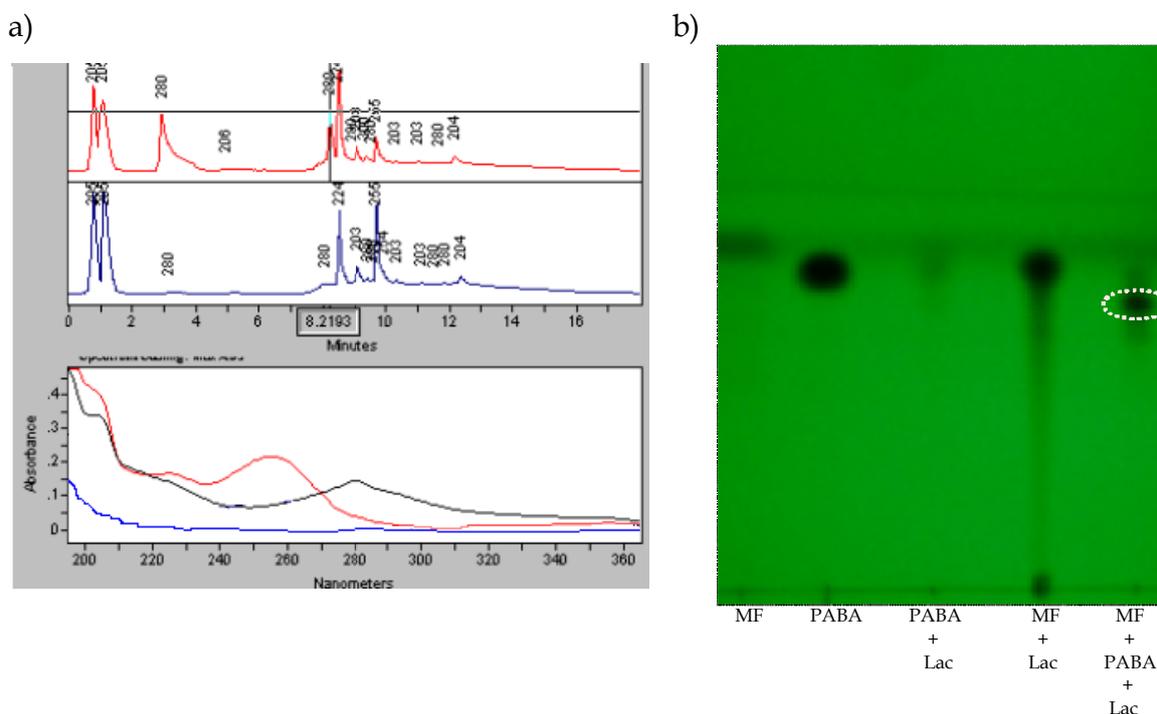


Figura 7.12 a) Espectro UV-Vis realizado a los productos de reacción. La línea negra corresponde al del producto eluido a los 8 minutos en la reacción con PABA; la línea roja es del producto eluido a los 10 minutos, en ambas reacciones; la línea azul representa al espectro de la región eluida a los 8 minutos, en la reacción sin PABA. b) Placa de TLC. Carril 1: Control de 4-metoxifenol; Carril 2: Control de PABA; Carril 3: Reacción de PABA; Carril 4: Reacción de metoxifenol sin PABA; Carril 5: Reacción de metoxifenol y PABA.

Se realizó una cinética para conocer el porcentaje de consumo de los compuestos al ser utilizados en reacciones individuales (figura 7.13 a), en presencia de ambos compuestos en relación molar 1:1 (figura 7.13 b) y en un exceso molar 10:1 de nucleófilo/sustrato (7.13 c). Los resultados se muestran a continuación:

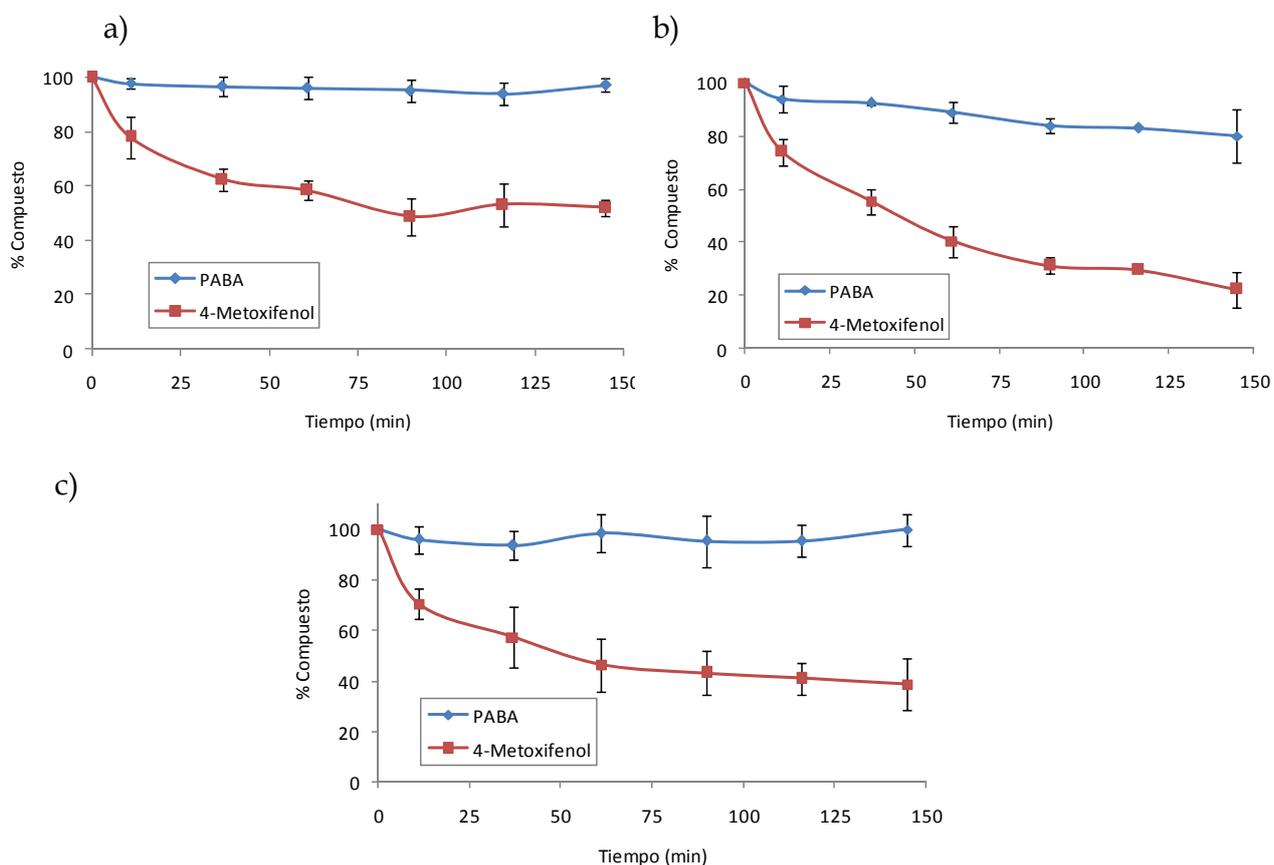


Figura 7.13. Cinéticas de consumo de compuestos. a) Reacciones individuales; b) Reacciones en presencia de dos sustratos en relación molar 1:1; c) Reacciones en presencia de nucleófilo/sustrato en relación molar 10:1.

La figura 7.13 muestra que después de 145 minutos de reacción, el 4-metoxifenol es consumido entre un 60 y 80% en las tres reacciones; además, puede observarse que las pendientes son muy similares, indicando una velocidad inicial parecida en ellas. En el caso del PABA, prácticamente no hay consumo en la reacción individual ni al encontrarse en un exceso molar de 10:1, en este último caso probablemente debido a que al haber una elevada cantidad de éste es difícil detectar cambios en su concentración. Sin embargo, bajo esta condición también fue posible observar la formación de este producto diferente, además, de otros subproductos.

Como puede observarse en la figura anterior, el PABA al encontrarse en presencia de 4-metoxifenol, en relación molar 1:1, fue consumido aproximadamente un 20%. Lo anterior indica que a pesar de que el PABA no es sustrato para la lacasa, se consume en presencia de 4-metoxifenol. Esto sugiere que en presencia de PABA pudo haberse formado un aducto entre el 4-metoxifenol y el PABA. Este tipo de reacciones ha sido reportada para el caso de difenoles oxidados por la lacasa (Mikolasch *et al.*, 2002; Manda *et al.*, 2005; Niedermeyer *et al.*, 2005). Sin embargo, es la primera vez que se observa este fenómeno para un monofenol.

Así también, al comparar los cromatogramas obtenidos a diferentes tiempos de reacción en relaciones equimolares (figura 7.14 a) y en exceso (figura 7.14 b) de PABA se observaron los siguientes comportamientos:

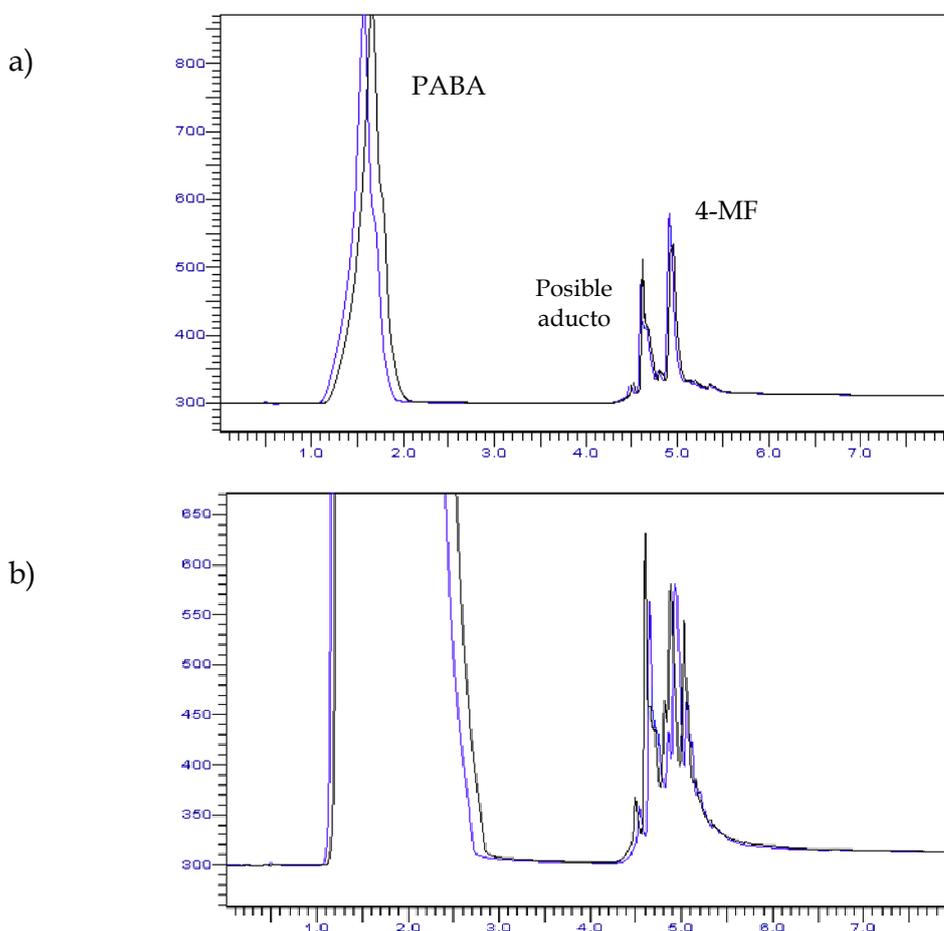


Figura 7.14. Cromatogramas de la reacción de 4-metoxifenol y PABA. a) En relación equimolar y b) en exceso de PABA. La línea azul corresponde a 61 minutos de reacción y la negra a 145 minutos de reacción. Los tiempos de retención no coinciden con los de la figura 7.11 por haber utilizado columnas diferentes en el HPLC.

Los cromatogramas presentados están en concordancia con los datos presentados en la figura 7.13, en cuanto al consumo de 4-metoxifenol y PABA en reacciones equimolares y en exceso de nucleófilo. Así también, se puede observar que al utilizar una relación equimolar, la formación del posible aducto se favorece con el transcurso del tiempo de reacción. Sin embargo, es notable que en la reacción con exceso de PABA la concentración del posible aducto disminuye con el tiempo y coincide con la aparición de un producto que no había sido observado en reacciones individuales ni en relación equimolar. No obstante, a 61 minutos de reacción, la concentración del posible aducto es mayor en la reacción que utiliza un exceso de nucleófilo. Esto indica que al incrementar la concentración de PABA se favorece la formación de éste posible aducto, así como de otros productos, los cuales podrían ser otros tipos de aductos o, bien, oligómeros de PABA, ya que no hay disminución en la concentración de 4-metoxifenol.

El posible aducto pudo haberse formado considerando el siguiente mecanismo de reacción (Figura 7.15):

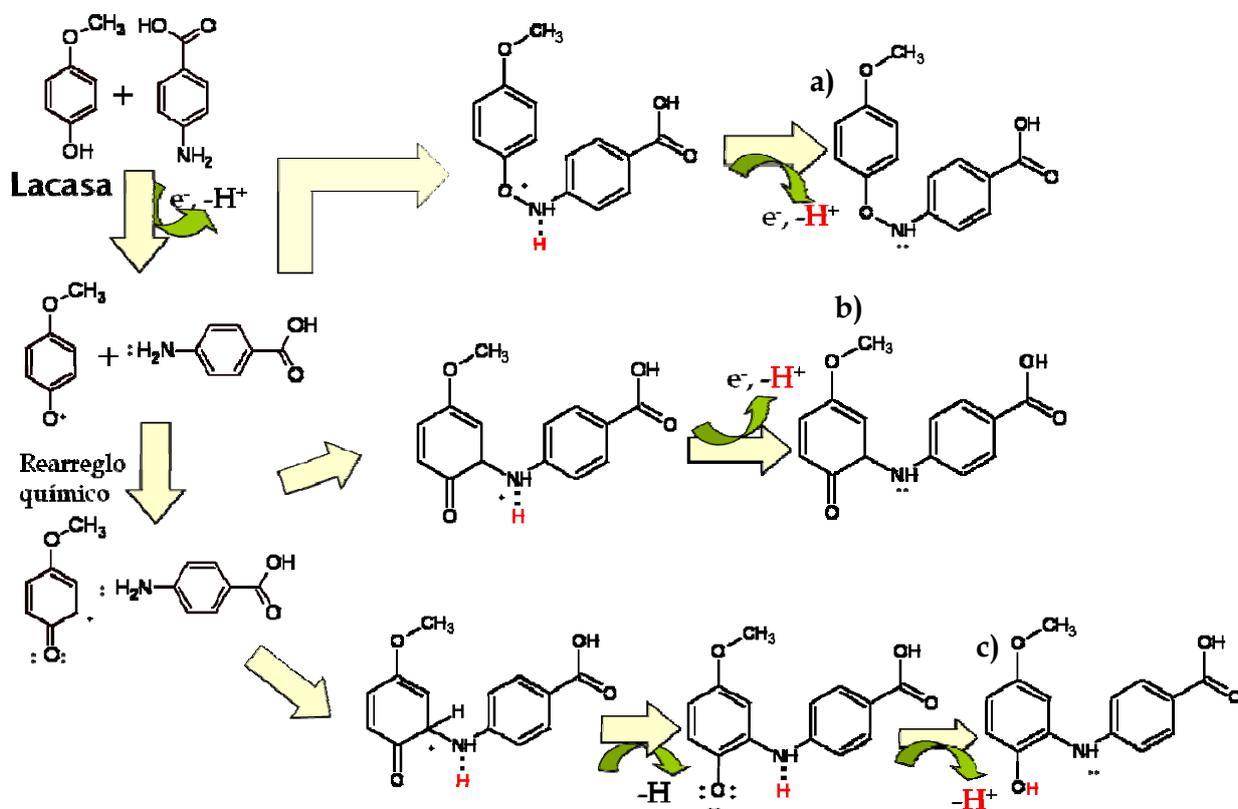


Figura 7.15. Mecanismo de reacción propuesto para la formación del posible aducto.

El mecanismo anterior propone que el radical libre producido por la lacasa reaccionará con uno de los electrones disponibles en el PABA. Para este acoplamiento se proponen tres alternativas: a) la formación de un compuesto con un enlace -ONH-asociada a la reacción entre el radical fenoxilo y el par de electrones solitarios del grupo amino; b) la obtención de una semiquinona asociada a una deslocalización del radical libre en el anillo y c) la formación de un compuesto hidroxilado, también causado por la deslocalización del radical libre y el rearrreglo de electrones y protones para recuperar la aromaticidad del anillo; todos los mecanismos involucran la pérdida de un electrón y una desprotonación (además de la ocasionada por la enzima). Cabe destacar que con los mecanismos de reacción propuestos no quedaría ningún radical libre en el producto, contrario al caso reportado por Mikolasch *et al.* (2002).

Con base en las estructuras mostradas en la figura 7.15 se trató de identificar al producto. Para ello, fue purificado por HPLC y analizado por espectrometría de masas, sin embargo, al parecer no es volátil y no se detectó mediante esta técnica. Considerando los grupos funcionales que deben estar presentes en el posible aducto, se realizaron espectros de infrarrojo (FTIR), utilizando película y pastilla de KBr. Los espectros se muestran en la figura 7.16:

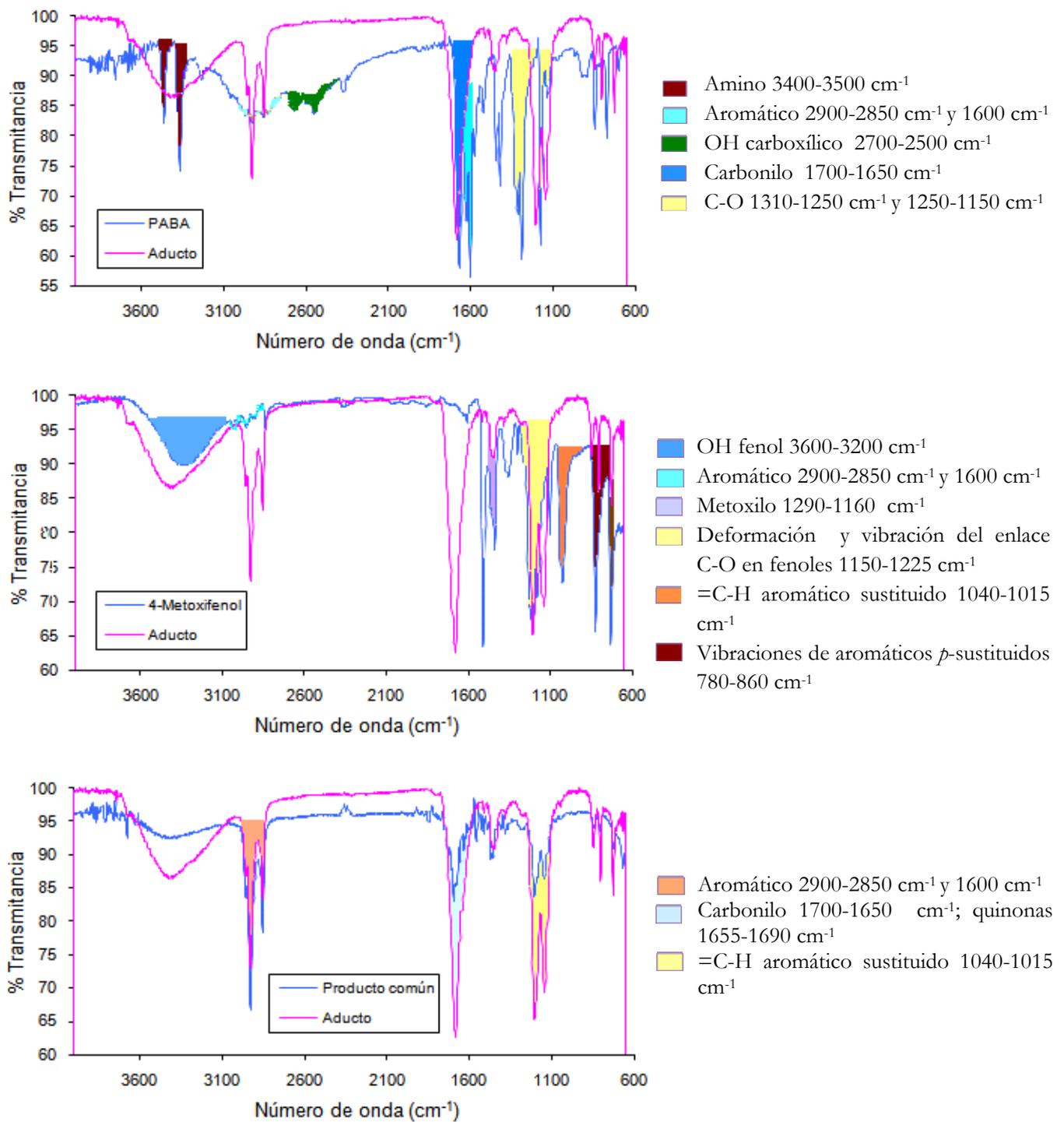


Figura 7.16. Espectros de FTIR de los productos obtenidos.

Las vibraciones de los diferentes enlaces se resumen en el Apéndice 11.1. Al comparar el espectro de FTIR del posible aducto y el PABA puede observarse que no presenta las bandas correspondientes a aminas ($3400-3500\text{ cm}^{-1}$) y esto podría deberse a un posible enmascaramiento ocasionado por la banda ancha correspondiente al OH de un fenol ($3600-3200\text{ cm}^{-1}$) o, bien, porque las aminas que están presentes en el PABA son primarias y en el caso del aducto secundarias. Así también, se encontró la señal del carbonilo del PABA ($1700-1650\text{ cm}^{-1}$), pero la banda presente en el posible aducto, que correspondería a ella, no se traslapa del todo en la región correspondiente. En cuanto a la comparación del posible aducto con el de 4-metoxifenol, fue posible observar que ambos presentan las bandas del grupo metoxilo ($1290-1160\text{ cm}^{-1}$) y que, además, se encuentra la banda ancha del OH fenólico ($3600-3200\text{ cm}^{-1}$). Además, en el espectro obtenido para el posible aducto están presentes las señales típicas para compuestos aromáticos ($2900-2850\text{ cm}^{-1}$ y 1600 cm^{-1}).

Así también, se realizó una comparación entre los espectros del posible aducto y el producto común de las dos reacciones. Se observa que son muy parecidos, sin embargo, pudo notarse que las señales pertenecientes a carbonilos de ácidos carboxílicos también podrían corresponder a quinonas y, por otro lado, las bandas para fenoles sustituidos son más intensas en el caso del posible aducto, indicando, probablemente, que existe más de una sustitución en un anillo aromático.

De lo anterior se puede concluir, que el posible aducto claramente es un derivado de 4-metoxifenol sustituido que podría poseer un grupo fenólico en su estructura y que por este medio no es posible encontrar indicios de la presencia de PABA en su estructura.

Durante el procedimiento de purificación y caracterización del posible aducto nos percatamos de que es inestable a temperaturas mayores de 35°C . Por esta razón se realizaron esfuerzos para tratar de evitar su degradación: control de temperatura, manejo de atmósfera de nitrógeno y almacenamiento a baja temperatura.

Con la finalidad de realizar una determinación más completa de la estructura química del probable aducto, se produjeron 2 litros de reacción para tener suficiente cantidad de producto (≈ 90 mg) y realizar análisis de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C . Para purificar el producto se utilizaron técnicas cromatográficas preparativas en placa y en columna. Para este último caso, se realizó un barrido de condiciones de elución para conseguir la mejor separación. Se utilizaron mezclas de solventes de diferente polaridad (p. e. acetato de etilo, isopropanol, metanol) y diferentes gradientes. Las mejores condiciones de elución se describen en la sección de materiales y métodos. En cuanto a la cromatografía en placa preparativa, fue posible aislar el compuesto en su totalidad al utilizar como eluyente una mezcla de diclorometano:metanol (90:10). La figura 7.17 muestra la fracción correspondiente al posible aducto.

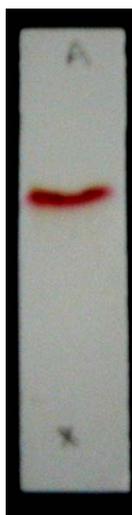


Figura 7.17. Purificación del posible aducto.

Se obtuvo el espectro de RMN de ^1H a 400 MHz (figura 7.18). En el Apéndice 11.2 se incluye un resumen de las señales relevantes para este caso. La interpretación de los espectros se realizó con asesoría de la M. en C. Silvia Marquina del CIQ de la UAEM.

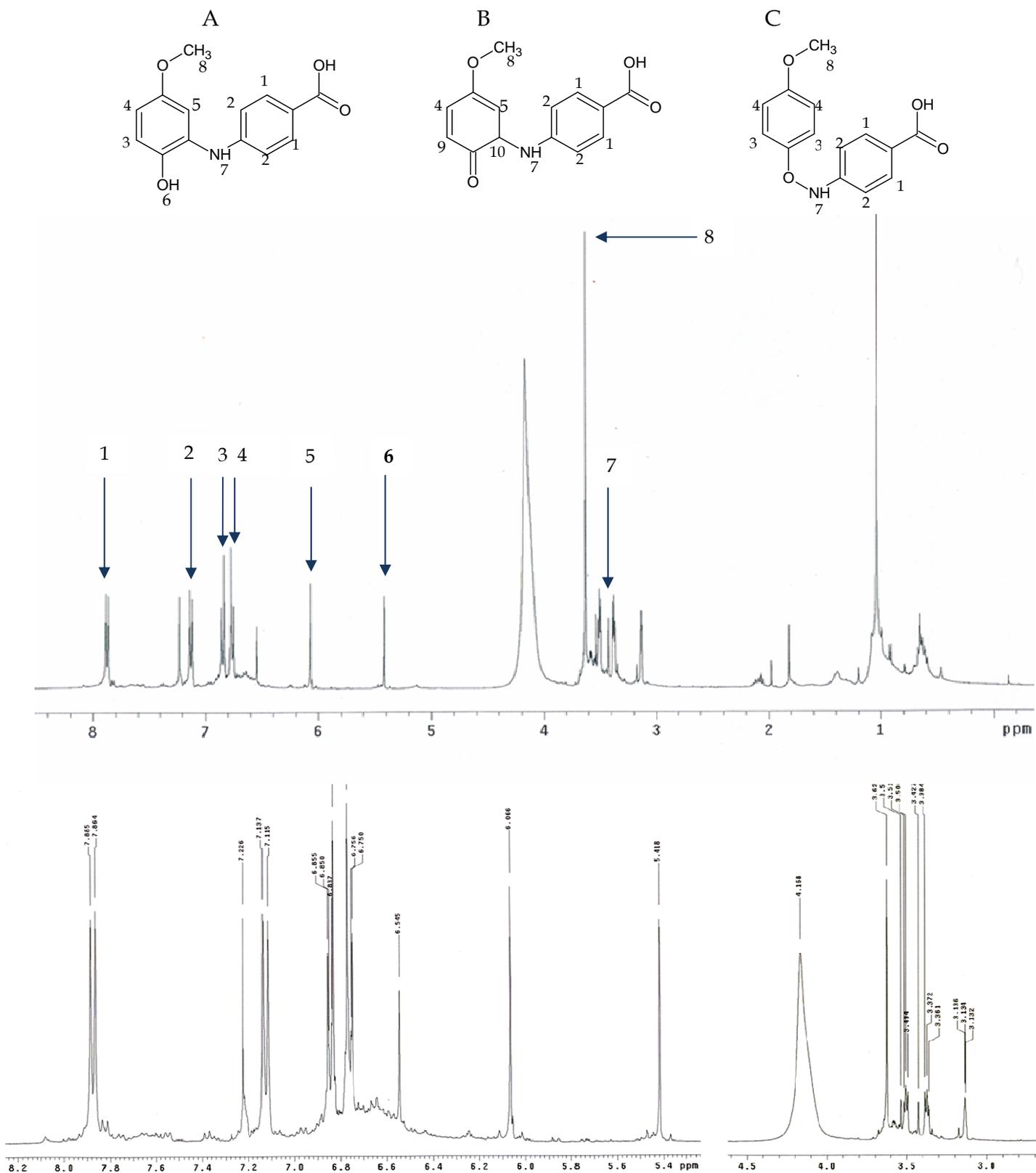


Figura 7.18. Espectro de RMN de ^1H .

En el espectro de RMN de ^1H puede observarse que hay señales de protones aromáticos entre 6 y 8 ppm. Entre estos desplazamientos pueden observarse dos dobletes en 7.87 y 7.12 ppm (flecha 1 y 2), con constantes de acoplamiento de 8.4 y 8.6 Hz, respectivamente, que corresponden a acoplamientos de tipo *orto*. El doblete de frecuencia más alta (flecha 1) corresponde a protones que se encuentran desprotegidos por el efecto electro atractor de un grupo carbonilo, como sería el caso de los protones aromáticos vecinos al ácido carboxílico del PABA. Así también, el doblete ubicado a una frecuencia menor (flecha 2) se debe al efecto electro protector que infiere un grupo amino al anillo aromático.

Por otra parte, las dos señales dobles a 6.85 y 6.75 ppm (flecha 3 y 4), con constantes de acoplamiento de 8.8 Hz, corresponden a protones vecinos a grupos electro protectores; de igual manera, se localizó una señal extra para un protón que corresponde a este tipo pero, que a su vez, difiere a los otros dos, tal como sería el caso del protón 5 (flecha 5). Gracias a lo anterior, fue posible asignar la señal ubicada a 5.4 ppm (flecha 6) a un protón del grupo hidroxilo, el cual se encontraría presente como sustituyente electro protector en un anillo aromático; además, se identificó el protón del grupo amino como singulete a un desplazamiento químico de 3.42 ppm (flecha 7), así como la señal de los protones del grupo metoxilo a 3.627 ppm (flecha 8).

Con la localización de estas señales se confirmó la hipótesis de la formación de un aducto entre el 4-metoxifenol y el PABA.

Además, con las señales encontradas, es posible pensar que el producto obtenido corresponde al compuesto A ó C, mostrados en la figura 7.18, ya que no fue posible localizar a los protones 9 y 10, que pertenecen a protones vecinos al grupo carbonilo, en la quinona propuesta en la figura 7.18 B.

De la misma forma en que se analizó el espectro de RMN de ^1H , se hizo el estudio del obtenido por ^{13}C . Este espectro se muestra en la figura 7.19.

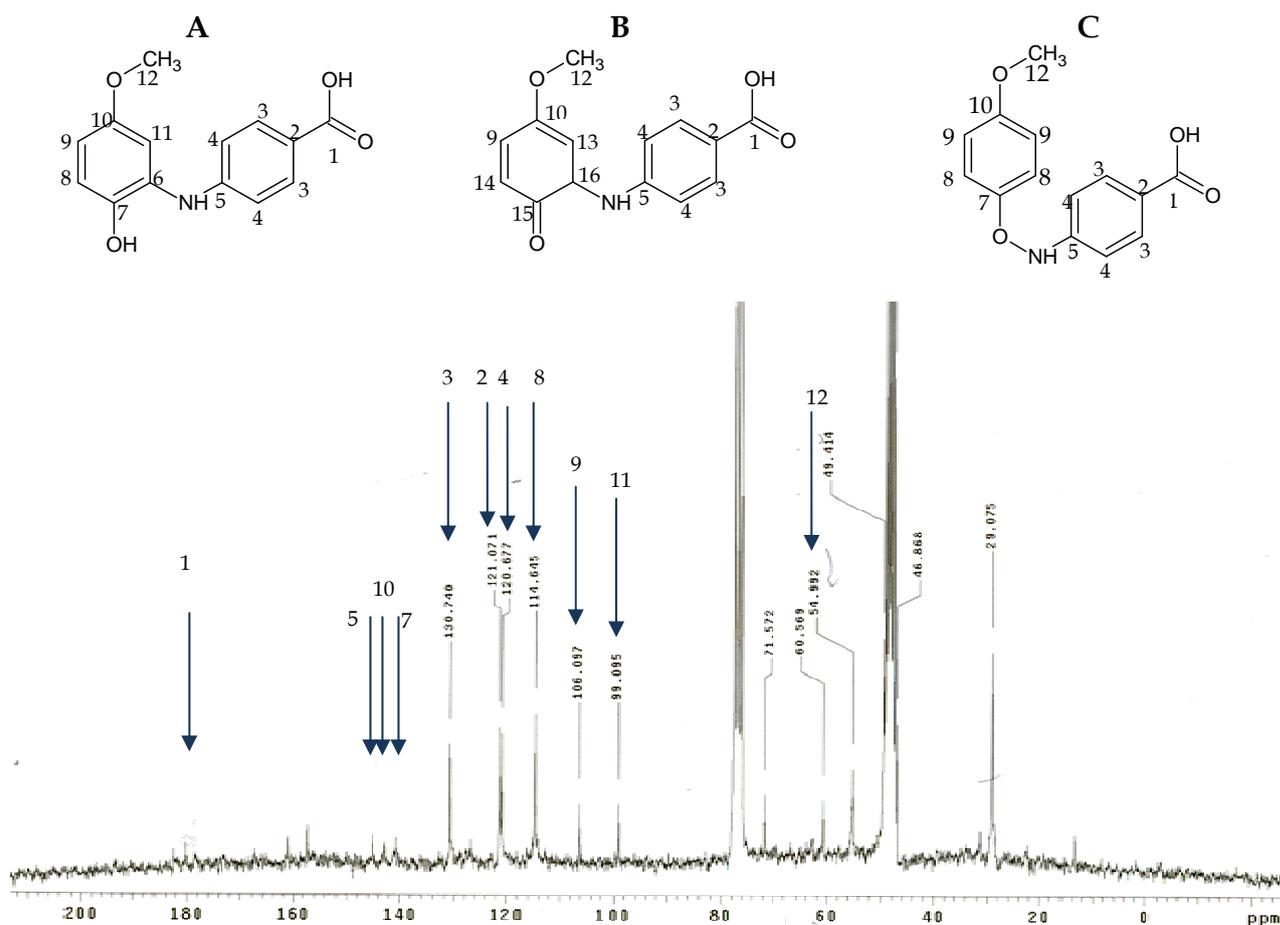


Figura 7.19. Espectro de RMN de ^{13}C .

Como se puede observar, es posible localizar la señal del grupo carbonilo del PABA a 180 ppm (flecha 1); esta señal es muy pequeña debido a que corresponde a carbonos cuaternarios. Así también, se encontraron señales características para carbonos aromáticos desprotegidos por efecto de grupos electro atractores (flecha 2 y 3), a un desplazamiento químico de 121.071 ppm y 180.74 ppm. Además, se localizaron señales para aquellos carbonos protegidos, cercanos a grupos electro donadores (flecha 4), a 120.677 ppm. Esto confirma la presencia de PABA en la estructura del producto obtenido. El carbono aromático unido a un grupo amino, desprotegido por la cercanía de un grupo electro atractor, se localizó a 145 ppm (flecha 5).

Así también, se encontraron las señales correspondientes a los carbonos aromáticos del 4-metoxifenol (flecha 7–flecha 11), entre 99-145 ppm. El carbono del grupo metoxilo se localizó a 54.992 ppm (flecha 12).

Sin embargo, al igual que con el espectro de RMN de ^1H es difícil concluir si el aducto obtenido es un compuesto hidroxilado (A) o un compuesto con un enlace $-\text{O}-\text{NH}-$ (C), pues a un desplazamiento químico de 140-150 ppm se encuentran señales que corresponderían a carbonos con base de oxígeno con una hibridación sp^2 , como sería en el caso de los carbonos 7 y 10.

Con base en las evidencias obtenidas por RMN de ^1H y ^{13}C , así como en los resultados obtenidos por FTIR, se pensaría que en realidad el aducto obtenido en la reacción del 4-metoxifenol y PABA es un compuesto hidroxilado (A), como ya ha sido reportado para reacciones similares utilizando difenoles como sustratos (Mikolasch *et al.*, 2002). De ser así, el producto obtenido correspondería al ácido 4-[(2-hidroxi-5-metoxifenol)amino]benzoico.

En el reporte de Mikolasch *et al.* (2002), se encontró que los productos hidroxilados, obtenidos por una reacción de acoplamiento entre el ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)-propiónico y PABA o n-hexilamina como nucleófilos, se formaron al reaccionar un radical catiónico del sustrato con el grupo amino de los nucleófilos, obteniendo los compuestos mencionados, pero detectando la presencia de un radical libre. En reportes bibliográficos posteriores (Niedermeyer *et al.*, 2004; Manda *et al.*, 2005) se realizaron reacciones similares a las de Mikolasch *et al.* (2002), pero encontraron quinoaminas como productos de reacción.

Niedermeyer *et al.* (2004), y Manda *et al.* (2005), concluyen que la reacción procedió por la formación de radicales libres sobre el difenol por la lacasa, para originar una quinona y una posterior aminación no enzimática mediante una adición de Michael. Así también, estos reportes argumentan que dadas las condiciones de reacción de la lacasa y los procedimientos utilizados para aislar los productos de reacción resultaría difícil obtener compuestos hidroxilados, pues son susceptibles a la oxidación.

Lo anterior sugiere que se esperaría obtener como producto de esta reacción a una quinona; sin embargo, aunque los espectros de RMN indican que se sintetizó un compuesto hidroxilado, también se encuentran señales que no es posible asignar a ninguno de los protones y carbonos propuestos para las estructuras de las figuras 7.18 y 7.19. Es muy probable que a pesar de obtener la banda del aducto aparentemente pura, en ella se encuentren por lo menos dos especies de polaridad similar, como sería el caso de un compuesto hidroxilado (A) y una quinona (B). Aunque por RMN de ^{13}C no fue posible encontrar la señal correspondiente al carbonilo de la quinona (carbono 15, figura 7.19 B), es posible que esto haya ocurrido debido a que los carbonilos de este tipo necesitan más tiempo de análisis para ser detectados; además, existe la posibilidad de que algunas de las señales que no fue posible asignar a ninguna de las estructuras propuestas corresponda a una quinona que presente una estructura diferente a la que se propone en este trabajo.

No obstante, tanto la síntesis de compuestos hidroxilados o semiquinonas resulta útil en el área farmacéutica, ya que ambos tipos de productos son encontrados en compuestos con efectos analgésicos, antimicrobianos o anticancerígenos.

Es sabida la dificultad que la síntesis química tradicional implica en este tipo de reacciones. Sin embargo, con el empleo de la lacasa puede simplificarse la vía de obtención de estos compuestos, ya sea con el uso de difenoles como ya ha sido reportado (Mikolasch *et al.*, 2002; Niedermeyer *et al.*, 2004; Manda *et al.*, 2005), o bien con monofenoles, como fue demostrado en el presente proyecto.

8. CONCLUSIONES

- ❖ La lacasa de *C. gallica* UAMH 8260 es capaz de catalizar eficientemente la oxidación de sustratos con energía de ionización menor a 8.7 eV ($\approx E^\circ=1.04$ V). Por otro lado, la oxidación de sustratos con una energía de ionización de hasta 9.4 eV ($\approx E^\circ=1.23$ V) es pobremente catalizada.
- ❖ Se observó una relación semilogarítmica entre la actividad específica de la lacasa y el potencial redox de sustratos monofenólicos, bajo condiciones de saturación de oxígeno disuelto y sustrato.
- ❖ Al parecer, la reacción entre los radicales fenólicos y el oxígeno es demasiado lenta para competir con la reacción de polimerización, por lo que no fue posible obtener derivados hidroxilados o quinonas por esta vía.
- ❖ En las reacciones entre monofenoles y nucleófilos, solamente en el caso del 4-metoxifenol y el ácido *p*-aminobenzoico (PABA) se observó la formación de un aducto.
- ❖ La caracterización espectroscópica del aducto obtenida por FTIR y RMN de ^1H y ^{13}C indican que el producto obtenido es un derivado hidroxilado (ácido 4-[(2-hidroxi-5-metoxifenol)amino]benzoico).

9. PERSPECTIVAS

Debido a que la síntesis química tradicional es una de las tareas más desafiantes en el campo de la química orgánica, la realización de este proyecto quimioenzimático ha probado ser una alternativa importante en esta área. La utilización de enzimas para reacciones de oxidación y, en este caso, de las lacasas promete obtener resultados importantes.

Como fue presentado a lo largo de este proyecto, la generación de radicales libres por la lacasa puede encontrar aplicación en diferentes áreas. Sin embargo, al final de este trabajo se permitió concluir que es posible derivatizar el radical libre producido por la lacasa sobre un monofenol y durante el desarrollo de éste fue posible formularse diversas preguntas que resultaría interesante averiguar.

Entre estas interrogantes se encuentra el caso de la derivatización del radical con oxígeno, en donde no fue posible obtener productos diferentes a polímeros. En este caso, sería importante saber si utilizando otro tipo de agente reductor podrían obtenerse los compuestos propuestos para este tipo de derivatización, o saber si es posible que se forme el radical peroxilo y que exista algún factor que impida su reacción con el agente reductor, lo cual podría conocerse con estudios de resonancia electro-paramagnética.

Por otro lado, también resulta interesante realizar una caracterización detallada del aducto obtenido con la reacción de 4-metoxifenol y PABA. Esto podría lograrse con la realización de experimentos que incluyan la aplicación de Espectroscopia bidimensional. Una vez teniendo un completo conocimiento de este aducto, sería importante averiguar si posee alguna función importante (farmacológica) presente en derivados de su tipo o si puede servir de precursor para la síntesis de compuestos importantes en el área química o farmacéutica.

En vista de los resultados interesantes obtenidos para la obtención de aductos con monofenoles la idea de probar otros nucleófilos como derivatizantes y otros sustratos también es atractiva.

Para estos estudios, la investigación sobre oxidaciones regioselectivas cobraría gran importancia ya que podría evaluarse influencia de sustituyentes que pudieran dirigir o estabilizar el radical libre sobre diferentes posiciones en el anillo aromático y posteriormente, su derivatización con nucleófilos. Sin embargo, en vista de que los compuestos que podrían comprobar esta hipótesis tienen un alto potencial redox serían malos sustratos para la enzima. No obstante, esta limitante podría verse superada con el empleo de peroxidasas ya que al igual que las lacasas realizan reacciones de oxidación de un electrón y además, poseen un potencial redox mayor que ellas, confiriéndoles un mayor poder oxidante.

Sin duda alguna, el empleo de sistemas quimioenzimáticos resulta de mucha utilidad en reacciones de oxidación. Las herramientas otorgadas por la química, así como las ventajas que implica el trabajar con enzimas, facilita la obtención de resultados importantes e interesantes en la investigación.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Agematu, H., Tsuchida, T., Kominato, K., Shibamoto, N. Yoshioka, T., Nishida, H., Okamoto, R., Shin, T. and Murao, S. (1993). Enzymatic dimerization of penicillin X. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **46**: 141-148.
- Aktaş, N., Kibarar, G. and Tanyolaç, A. (2000). Effects of reaction conditions on laccase-catalyzed α -naphthol polymerization. *J. Chem. Technol. Biot.* **75**: 840-846.
- Ayala, M., Robledo, N., López-Munguía, A. and Vazquez-Duhalt, R. (2000). Substrate specificity and ionization potential in chloroperoxidase-catalyzed oxidation of diesel fuel. *Environ. Sci. Technol.* **34**: 2804-2809.
- Ayala, M., Roman, R. and Vazquez-Duhalt, R. (2007). A catalytic approach to estimate the redox potential of heme-peroxidases. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **357**: 804-808.
- Baldrian, P. (2006). Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS. Microbiol. Rev.* **30**: 215-242.
- Bejan, E.V., Font-Sanchis, E. and Scaiano, J.C. (2001). Lactone-Derived Carbon-Centered Radicals: Formation and Reactivity with Oxygen. *Org. Lett.* **3**: 4059-4062.
- Bukh, C., Lund, M. and Bjerrum, M. J. (2006). Kinetic studies on the reaction between *Trametes villosa* laccase and dioxygen. *J. Inorg. Biochem.* **100**: 1547-1557.
- Burton, S. (2003). Laccases and Phenol oxidases in organic synthesis- a Review. *Curr. Org. Chem.* **7**: 1317-1331.
- Claus, H. (2003). Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Arch. Microbiol.* **179**: 145-150.
- Ducros V., Brzozowski, A. M., Wilson, K. S., Brown, S. H., Østergaard, P., Schneider, P., Yaver, D. S., Pedersen, A. H. and Davies, G. J. (1998). Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2-Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **5**: 310-316.
- Faber, K. (1997). Oxidation Reactions. En: *Biotransformations in Organic Chemistry*. 3rd Edition. Germany. p. 201.

- Farver, O., Skov, L. K., Pascher, T., Karlsson, B. G., Nordling, M., Lundberg, L. G., Vanngard, T. and Pecht, I. (1993). Intramolecular electron transfer in single-site-mutated azurins. *Biochemistry-US*. **32**: 7317-7322.
- Folkes, L. M. and Candeias, L. P. (1997). Interpretation of the reactivity of peroxidase compounds I and II with phenols by the Marcus equation. *FEBS Lett.* **412**: 305-308.
- Font-Sanchis E, Aliaga C, Bejan EV, Cornejo R, Scaiano JC. (2003). Generation and reactivity toward oxygen of carbo-centered radicals containing indane, indene and fluorenyl moieties. *J. Org. Chem.* **68**: 3199-3204.
- Fossey, J., Lefort, D. And Sorba, J. (1995). Functionalization of the C-H bond. En: *Free radicals in organic chemistry*. John Wiley and Sons. p.217-220.
- Garavaglia, S., Cambria, M. T., Miglio, M., Ragusa, S., Lacobazzi, V., Palmieri, F., D'Ambrosio, Ch., Scaloni, A. and Rizzi, M. (2004). The structure of *Rigidosporus lignosus* Laccase containing a full complement of copper ions, reveals an asymmetrical arrangement for the T3 copper pair. *J. Mol. Biol.* **342**: 1519-1531.
- Gianfreda, L., Xu, F. and Bollag J-M. (1999). Laccases: A useful group of oxidoreductive Enzymes. *Bioremediation J.* **3** (1): 1-25.
- Karamyshev, A., Shleev, S., Koroleva, O., Yaropolov, A. and Sakharov, I. (2003). Laccase-catalyzed synthesis of conducting polyaniline. *Enzyme Microb. Tech.* **33**: 556-564.
- Kawai, S., Umezawa, T., Shimada, M. and Higuchi. T. (1988). Aromatic ring cleavage of 4,6-di(*tert*-butyl)guaiacol, a phenolic lignin model compound, by laccase of *Coriolus versicolor*. *FEBS Lett.* **236** (2): 309-311.
- Kersten, P.J., Kalyanaram, B., Hammel, K. E., Reinhammar, B. and Kirk, T. K. (1990). Comparison of lignin peroxidase, horseradish peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes. *Biochem. J.* **268**: 475-480.
- Kobayashi, S. and Higashimura, H. (2003). Oxidative polymerization of phenols revisited. *Prog. Polym. Sci.* **28**: 1015-1048.
- Leontievsky, A. A., Myasoedova, N. M., Baskunov, B. P., Golovleva, L. A., Bucke, C. and Evans, C. S. (2001). Transformation of 2,4,6-trichlorophenol by free and immobilized fungal laccase. *Appl. Microbiol. Biot.* **57**: 85-91.

- Maillard, B, Ingold, K.U, Scaiano, J.C. (1983). Rate constants for the reactions of free radicals with oxygen in solution. *J. Am. Chem. Soc.* **105**: 5095-5099.
- Manda, K., Hammer, E., Mikolasch, A., Niedermeyer, T., Dec, J., Jones, A.D., Benesi, A. J., Shauer, F. and Bollag, J-M. (2005). Laccase-induced cross-coupling of 4-aminobenzoic acid with *para*-dihydroxylated compounds 2,5-dihidroxi-*N*-(2-hidroxyethyl)-benzamide and 2,5-dihidroxybenzoic acid methyl ester. *J. Mol. Catal. B:Enzym.* **35**:86-92.
- Marcus, R. A. and Sutin, N. (1985). Electron transfers in chemistry and biology. *Biochim. Biophys. Acta.* **811**: 265-322.
- Martins, L. O., Soares, C. M., Pereira, M. M., Teixeira, M., Costa, T., Jones, G. H. and Henriques, A. O. (2002). Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *J. Biol. Chem.* **277**:18849-18859.
- Mayer, A. M. and Staples, R. C. (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry.* **60**: 551-565.
- McGuirl, M. A. and Dooley, D. M. (1999). Cooper-containing oxidases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**: 138-144.
- Messerschmidt, A. and Huber, R. (1990). The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. Modelling and structural relationships. *Eur. J. Biochem.* **187**: 341-352.
- Mikolasch, A., Hammer, E., Jonas, U., Popowski, K., Stielow, A. and Schauer, F. (2002). Synthesis of 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-propionic acid derivatives by N-coupling of amines using laccase. *Tetrahedron.* **58**: 7589-7593.
- Millero, F. J., Huang, F. and Laferiere, A. L. (2002). Solubility of oxygen in the major sea salts as a function of concentration and temperature. *Mar. Chem.* **78**: 217-230.
- Nicotra, S., Intra, A., Ottolina, G., Riva, S. And Danieli, B. (2004). Laccase- mediated oxidation of the esteroid hormone 17 β -estradiol in organic solvents. *Tetrahedron-Asymmetr.* **15**: 2927-2931.

- Nicotra, S., Cramarossa, M. R., Mucci, A., Pagnoni, U. M., Riva, S. and Forti, L. (2004). Biotransformation of resveratrol: synthesis of *trans*-dehydrodimers catalyzed by laccases from *Myceliophthora thermophyla* and from *Trametes pubescens*. *Tetrahedron*. **60**: 595-600.
- Niedermeyer, T. H. J., Mikolasch, A. and Lalk, M. (2005). Nuclear amination catalyzed by fungal laccases: reaction products of *p*-hydroquinones and primary aromatic amines. *J. Org. Chem.* **70**: 2002-2008.
- NIST. Webbook.nist.gov. Fecha de último acceso: 30 de abril de 2007.
- Osiadacz, J., Abdulkareem J.H., Bajraszewska, D., Fischer, P. and Peczyńska-Czoch. (1999). On the use of *Trametes versicolor* laccase for the conversion of 4-methyl-3-hydroxyanthranilic acid to actinocin chromophore. *J. Biotechnol.* **72**: 141-149.
- Pickard, M. A., Roman, R., Tinoco, R. and Vazquez-Duhalt, R. (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by White Rot Fungi and oxidation by *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 Laccase. *Appl. Environ. Microb.* **65**: 3805-3809.
- Piontek, K., Antorini, M. and Choinowski, T. (2002). Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *J. Biol. Chem.* **277** (40): 37663-37669.
- Pita, M., Shleev, S., Ruzgas, T., Fernández, V. M., Yaropolov, A. I. and Gorton, L. (2006). Direct heterogeneous electron transfer reactions of fungal laccases at bare and thiol-modified gold electrodes. *Electrochem. Commun.* **8**: 747-753.
- Potthast, A., Rosenau, T., Chen, C. L. and Gratzl, J.S. (1996). A novel method for the conversion of benzyl alcohols to benzaldehydes by laccase-catalyzed oxidation. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **108**: 5-9.
- Pretsch, E., Bühlmann, P. and Affolter, C. (2000). ¹³C NMR Spectroscopy. Aromatic Hydrocarbons. En: *Structure Determination of Organic Compounds, Tables of Spectral Data*. 3rd. edition. Edit: Springer. Pp 97-99, 102-103, 180-183.
- PROMISE Database: The Prosthetic groups and Metal ions in protein active Sites Database, Version 2.0. <http://metallo.scripps.edu/PROMISE/MAIN.html>. Fecha de último acceso: 28 de mayo de 2007.
- PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>. Fecha de último acceso: 30 de abril de 2007.

- Riva, S. (2006). Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends Biotechnol.* **24**: 219-226.
- Rodríguez, E., Pickard, M. and Vazquez-Duhalt, R. (1999). Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Curr. Microbiol.* **38**:27-32.
- Ross, A.B., Mallard, W.G., Helman, W.P., Buxton, G.V., Huie, R.E. and Neta P. NDRL/NIST Solution Kinetics Database: Ver. 3.0, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD (1995).
- Schäfer, A., Specht, M., Hetzheim, A., Francke, W. and Schauer, F. (2001). Synthesis of substituted imidazoles and dimerization products using cells and laccase from *Trametes versicolor*. *Tetrahedron.* **57**: 7693-7699.
- Shiba, T., Xiao, L., Miyakoshi, T. and Chen, C.L. (2000). Oxidation of isoeugenol and coniferyl alcohol catalyzed by laccase isolated from *Rhus vernicifera* Stokes and *Pycnoporus coccineus*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **10**: 605-615.
- Shin, K. S. and Lee, Y. J. (2000). Purification and characterization of a new member of the laccase family from the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **384**: 109-115.
- Shleev, S. V., Morozova, O. V., Nikitina, O. V., Gorshina, E. S., Rusinova, T. V., Serezhenkov, V. A., Burbaev, D. S., Gazaryan, I. G. and Yaropolov, A. I. (2004). Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes. *Biochimie.* **86**: 693-703.
- Solomon, E. I., Sundaram, V. M. and Machonkin, T. E. (1996). Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* **96**: 2563-2605.
- Solomons, T.W. G. (1990). Compuestos aromáticos II: Reacciones de los compuestos aromáticos con electrófilos. En: *Química orgánica*. Editorial Limusa. **13**: 490-526.
- Straathof, Aa., Panke, S., and Schmid, A. (2002). The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr. Opin. Biotech.* **13**: 548-556.
- Thurston, C. F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology UK.* **140** (1): 19-26.

- Tinoco, R., Pickard, M. A. and Vazquez-Duhalt, R. (2001). Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Lett. Appl. Microbiol.* **32**: 331-335.
- Torres, E., Bustos-Jaimes, I. and Le Borgne, S. (2003). Potencial use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Appl. Catal. B:Environ.* **46**: 1-15.
- Uchida, H., Fukuda, T., Miyamoto, H., Kawabata, T., Suzuki, M. and Uwajima, T. (2001). Polymerization of bisphenol A by purified laccase from *Trametes villosa*. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **287**: 355-358.
- Ullrich, R. and Hofrichter, M. (2007). Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds. *Cell. Mol. Life Sci.* **64** (24): 271-293.
- Valderrama, B., Ayala, M and Vazquez-Duhalt, R. (2002). Suicide inactivation and peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes. *Chem. Biol.* **9**: 555-565.
- Vandertol-Vanier H. A., Vazquez-Duhalt R., Tinoco, R. and Pickard, M. A. (2002). Enhanced activity by poly(ethylene glycol) modification of *Coriolopsis gallica* laccase. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 214-220.
- Xu, F. (1996). Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by Fungal Laccases: Correlation between activity and redox potentials as well as Halide Inhibition. *Biochemistry.* **35**: 7608-7614.
- Xu, F. (2005). Applications of oxidoreductases: Recent progress. *Industrial Biotechnol.* **1**: 38-50.
- Xu, F., Berka, R. M., Wahleithner, J. A., Nelson, B., Schuster, J. R., Brown, S. H., Palmer, A. E. and Solomon, E. I. (1998). Site directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile. *Biochem. J.* **334**: 63-70.
- Yaropolov A. I., Skorobogat'ko, O. V., Vartanov, S. S. and Varfolomeyev, S. D. (1994). Laccase. Properties, catalytic mechanism, and applicability. *Appl. Biochem. Biotech.* **49**: 257-280.

11. APÉNDICES

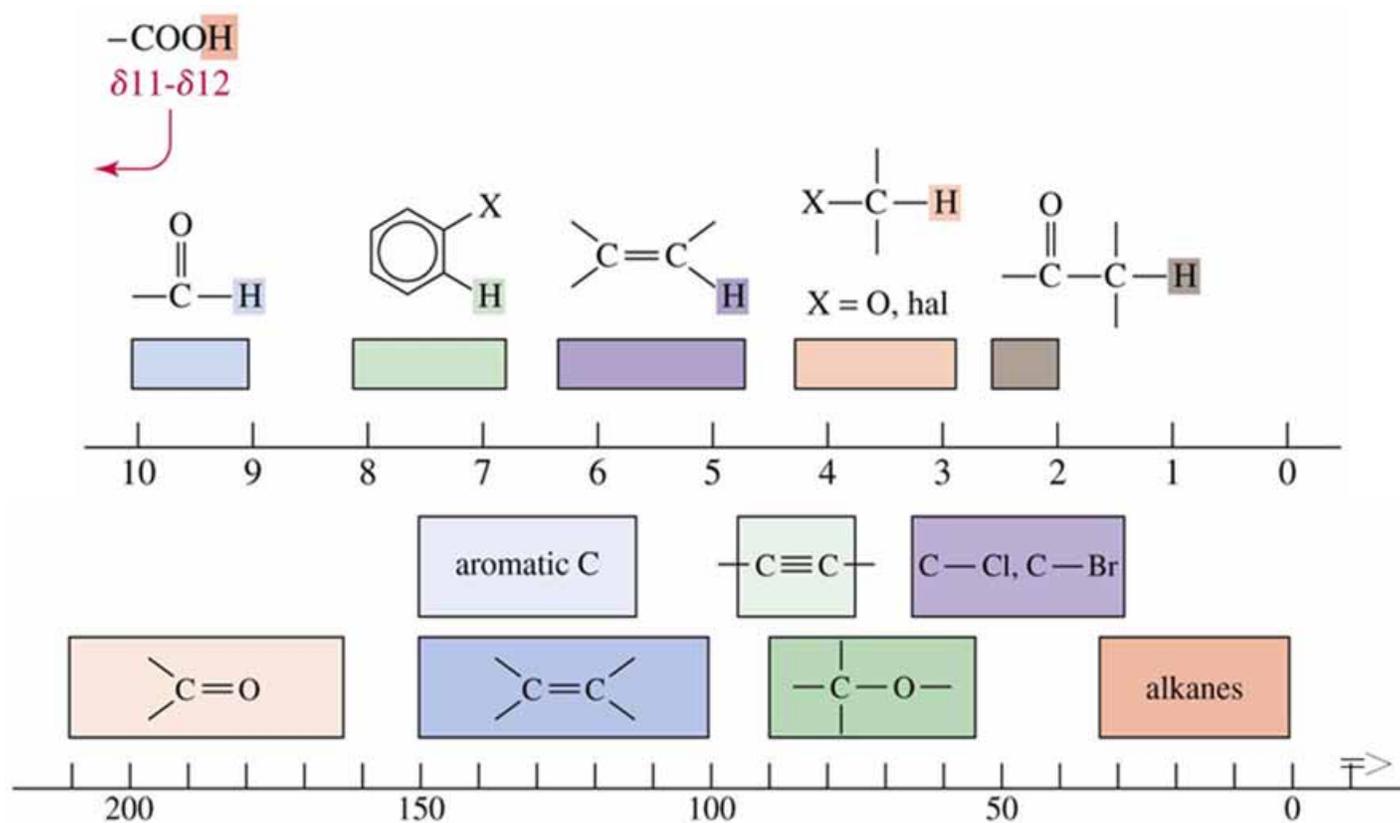
11.1. Señales de infrarrojo

Enlace	Tipo de enlace	Tipo específico de enlace	Intervalo e intensidad de absorción	
C-H	alquilo	metilo	1380 cm ⁻¹ (débil), 1260 cm ⁻¹ (fuerte) y 2870, 2960 cm ⁻¹ (ambos, de fuerte a medio)	
		metileno	1470 cm ⁻¹ (fuerte) y 2850, 2925 cm ⁻¹ (ambos, de fuerte a medio)	
		metino	2890 cm ⁻¹ (débil)	
		metil éteres, CH ₃ -O	2850-2815 cm ⁻¹	
	vinilo	C=CH ₂	900 cm ⁻¹ (fuerte) y 2975, 3080 cm ⁻¹ (medio)	
		C=CH	3020 cm ⁻¹ (medio)	
		alqueno monosustituido	900, 990 cm ⁻¹ (ambos fuerte)	
		alqueno cis-disustituido	670-700 cm ⁻¹ (fuerte)	
		alqueno trans-disustituido	965 cm ⁻¹ (fuerte)	
		alqueno trisustituido	800-840 cm ⁻¹ (fuerte a medio)	
	aromático	benceno/benceno sustituido	3070 cm ⁻¹ (débil), 3040	
		benceno monosustituido	700-750 cm ⁻¹ (fuerte) y 700±10 cm ⁻¹ (fuerte)	
		benceno orto-disustituido	750 cm ⁻¹ (fuerte)	
		benceno meta-disustituido	750-800 cm ⁻¹ (fuerte) y 860-900 cm ⁻¹ (fuerte)	
		benceno para-disustituido	800-860 cm ⁻¹ (fuerte)	
	alquino		3300 cm ⁻¹ (medio)	
	aldehído		2720, 2820 cm ⁻¹ (medio)	
	C-C	C-C acíclico	alqueno monosustituido	1645 cm ⁻¹ (medio)
			alqueno 1,1-disustituido	1655 cm ⁻¹ (medio)
			alqueno cis-1,2-disustituido	1660 cm ⁻¹ (medio)
alqueno trans-1,2-disustituido			1675 cm ⁻¹ (medio)	
alqueno tri y tetrasustituido			1670 cm ⁻¹ (débil)	

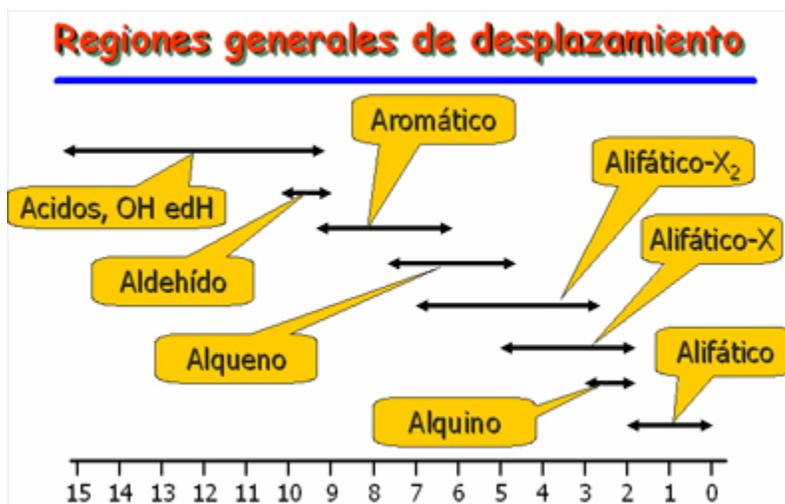
	C-C conjugado	dienos	1600, 1650 cm ⁻¹ (fuerte)	
		con anillo de benceno	1625 cm ⁻¹ (fuerte)	
		con C=O	1600 cm ⁻¹ (fuerte)	
	C=C aromático		1450, 1500, 1580, 1600 cm ⁻¹ (fuerte a débil) - siempre los 4	
	C≡C	alquino terminal	2100-2140 cm ⁻¹ (débil)	
		alquino disustituido	2190-2260 cm ⁻¹ (muy débil, a veces no visible)	
C=O	cetona/aldehído	alifáticos saturados/ciclos de 6 miembros	1720 cm ⁻¹	
		α,β-insaturado	1685 cm ⁻¹ (también va para cetonas aromáticas)	
		ciclo de 5 miembros	1750 cm ⁻¹	
		ciclo de 4 miembros	1775 cm ⁻¹	
		aldehído	1725 cm ⁻¹ (influencia de la conjugación como en las cetonas)	
	derivados de ácido carboxílico	ácido carboxílico saturado	1710 cm ⁻¹	
		ácido carboxílico insaturado/aromático	1680-1690 cm ⁻¹	
		ésteres y lactonas	1735 cm ⁻¹ (influencia de la conjugación y el tamaño del anillo como en las cetonas)	
		anhídridos	1760 y 1820 cm ⁻¹ (ambos)	
		halogenuros	1800 cm ⁻¹	
		amidas	1650 cm ⁻¹ (amidas asociadas)	
		sales de carboxilatos	1550-1610 cm ⁻¹ (también va para zwitteriones aminoácidos)	
	O-H	alcoholes, fenoles		3610-3670 cm ⁻¹ (la concentración de la muestra ensancha la absorción y la mueve a 3200-3400 cm ⁻¹)
		ácidos carboxílicos		3500-3560 cm ⁻¹ (la concentración de la muestra ensancha la absorción y la mueve a 3000 cm ⁻¹)
N-H	aminas primarias		doblete entre 3400-3500 cm ⁻¹ y 1560-1640 cm ⁻¹ (fuerte)	
	aminas secundarias		sobre 3000 cm ⁻¹ (medio a débil)	
	iones amonio		se ensancha con múltiples picos entre 2400-3200 cm ⁻¹	

C-O	alcoholes	primarios	1050±10 cm ⁻¹
		secundarios	alrededor de 1100 cm ⁻¹
		terciarios	1150-1200 cm ⁻¹
	fenoles		1200 cm ⁻¹
	éteres	alifáticos	1120 cm ⁻¹
		aromáticos	1220-1260 cm ⁻¹
	ácidos carboxílicos		1250-1300 cm ⁻¹
ésteres		1100-1300 cm ⁻¹	
C-N	aminas alifáticas		1020-1220 cm ⁻¹ (frecuentemente sobrepuestas)
	C=N		1615-1700 cm ⁻¹ (efectos de conjugación similares a C=O)
	nitrilos (enlace triple C-N)		2210-2260 cm ⁻¹ (no conjugado 2250, conjugado 2230 cm ⁻¹)
	isonitrilos (enlace R-N-C)		2165-2110 cm ⁻¹ (2140 - 1990 cm ⁻¹ para R-N=C=S)
C-X (X=F, Cl, Br, I)	fluoroalcanos	ordinarios	1000-1100 cm ⁻¹
		trifluorometilo	dos fuertes, se ensancha entre 1100-1200 cm ⁻¹
	cloroalcanos		540-760 cm ⁻¹ (medio to débil)
	bromoalcanos		below 600 cm ⁻¹
iodoalcanos		below 600 cm ⁻¹	
N-O	compuestos nitro	alifático	1540 cm ⁻¹ (más fuerte) y 1380 cm ⁻¹ (más débil) - Siempre ambas.
		aromático	1520, 1350 cm ⁻¹ (la conjugación usualmente baja el número de onda)

11.2. Desplazamientos químicos en Resonancia Magnética Nuclear



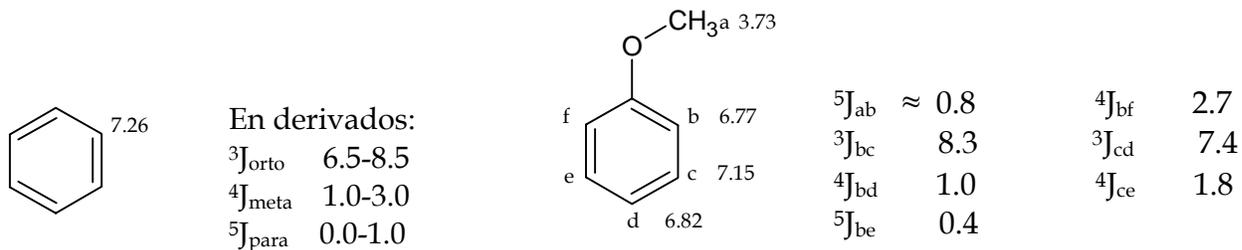
11.2.1. Desplazamientos químicos (δ) en Resonancia Magnética Nuclear de ^1H (Pretsch *et al.*, 2000)



Relativo a TMS	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0	-1
H ₃ C-Alquilo														■
H ₃ C-C-Hal												■		
H ₃ C-C=C												■		
H ₃ C-CC												■		
H ₃ C-Aril, -Hetero aril											■			
H ₃ C-CO												■		
H ₃ C-S-											■			
H ₃ C-SO ₂ -										■	■			
H ₃ C-N										■	■			
H ₃ C-O-Alquilo										■				
H ₃ C-O-Aril, -O-CO-										■				

Relativo a TMS	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0	-1
CO-CH-C=C										■	■			
CH-Aril, -NR-, -O-							■	■	■	■				
-CCH Alquino										■				
CH=C-						■	■	■	■					
Ar-H					■	■	■							
Alquilo-, Aril-CHO			■	■										
Alquilo-OH										■	■	■		
Aril-OH						■	■	■	■	■				
R-COOH	■	■	■	■										
Alquilo-SH										■	■	■		
Aril-SH									■	■				
Alkyl-NH ₂ , Alkyl ₂ -NH											■	■		
Aryl-NH ₂ , Aryl ₂ -NH								■	■	■				
R-CO-NH-				■	■	■	■							
-CO-NH-CO			■	■										
Relativo a TMS	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0	-1

11.2.1.1. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento de hidrocarburos aromáticos (δ en ppm relativo a TMS, J en Hz):

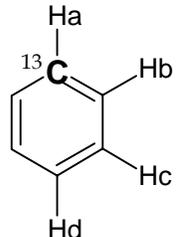


11.2.2. Desplazamientos químicos en Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C (Pretsch *et al.*, 2000)

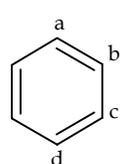
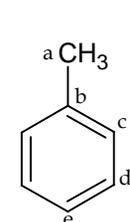
Relativo a TMS	220	200	180	160	140	120	100	80	60	40	20	0	-10
-CN					■	■							
-NC			■	■									
$(-\text{CO})_2\text{O}$ Anhídridos			■	■									
-COOR			■	■									
-CONHR			■	■									
$(-\text{CO})_2\text{NR}$ Imidas			■										
-COOH		■	■										
-CHO	■	■	■	■									
$>\text{C}=\text{O}$	■	■											
Relativo a TMS	220	200	180	160	140	120	100	80	60	40	20	0	-10

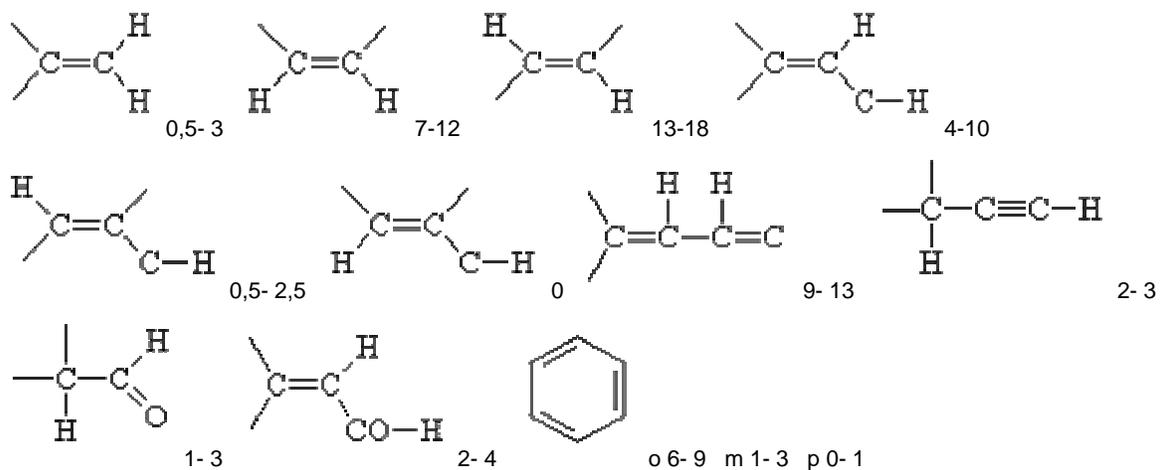
Relativo a TMS	220	200	180	160	140	120	100	80	60	40	20	0	-10
$\text{H}_3\text{C}-\text{C}$ - primario										■	■		
$\text{H}_3\text{C}-\text{S}$ -										■	■		
$\text{H}_3\text{C}-\text{N}$									■	■			
$\text{H}_3\text{C}-\text{O}$ -									■				
$-\text{H}_2\text{C}-\text{C}$ secundario									■	■			
$\text{C}-\text{C}$ cuaternario								■	■	■			
$\text{C}-\text{N}$								■	■				
$\text{C}-\text{O}$ -							■	■					
Alquinos							■	■					
$\text{C}=\text{C}$ Alquenos				■	■	■	■						
Compuestos aromáticos				■	■	■							
Relativo a TMS	220	200	180	160	140	120	100	80	60	40	20	0	-10

11.2.2.1. Constantes de acoplamiento de $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ ($|J|$ en Hz)

		En benceno:	En derivados:
	$^1J_{\text{CaHa}}$	159.0	
	$^2J_{\text{CaHb}}$	1.0	1-4
	$^3J_{\text{CaHc}}$	7.6	7-10
	$^4J_{\text{CaHd}}$	-1.3	

11.2.2.2. Constantes de acoplamiento $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$ ($|^1J_{\text{CC}}|$ en Hz)

	$^1J_{\text{ab}}$	57.0		$^1J_{\text{ab}}$	44.2
	$^2J_{\text{ac}}$	2.5		$^2J_{\text{ac}}$	3.1
	$^3J_{\text{ad}}$	10.0		$^3J_{\text{ad}}$	3.8
			$^4J_{\text{ae}}$	0.9	



LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Definición
ABTS	Ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolona-6-sulfónico)
BSA	Albúmina de suero bovino
Cu T1	Sitio de cobre T1
Cu T2	Sitio de cobre T2
Cu T3	Sitio de cobre T3
Cu T2/T3	<i>Cluster</i> de cobre trinuclear
ϵ	Coefficiente de extinción molar
E°_E	Potencial redox de la enzima
E°_S	Potencial redox del sustrato
FAD	Flavin Adenín Dinucleótido
FMN	Flavin Mono Nucleótido
FTIR	Espectroscopia de infrarrojo
HBr	Ácido bromhídrico
HCl	Ácido clorhídrico
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
PABA	ácido <i>p</i> -aminobenzoico
PPQ	Pirroloquinolina quinona
REP	Resonancia electro-paramagnética
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
TLC	Cromatografía en capa fina
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visible