

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

**DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DEL ABTS Y LA
LACASA PARA LA OXIDACIÓN DE COMPUESTOS
ORGÁNICOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

MARIA MYRNA SOLIS OBA

**DIRECTOR DE TESIS
DR. GUSTAVO VINIEGRA GONZALEZ**

México, D. F.

2005.

Junio del

ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCION DEL ABTS Y LA LACASA PARA LA OXIDACION DE COMPUESTOS ORGANICOS

Comité Tutorial

Director de tesis

Doctor Gustavo Viniegra González
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

Asesor: Doctor Mariano García Garibay
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesor: Doctor Eduardo Bázana García
Universidad Nacional Autónoma de México

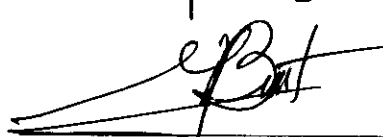
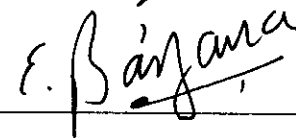
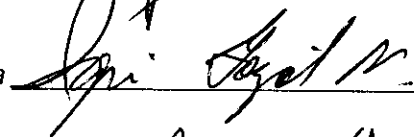
Comité de Evaluación

Presidente:
Dr. Mariano García Garibay
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Secretario:
Dr. Ignacio González Martínez
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Vocal:
Dr. Eduardo Bázana García
Universidad Nacional Autónoma de México

Vocal:
Dr. Germán Buitrón Méndez
Universidad Nacional Autónoma de México



El doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma
Metropolitana

está inscrito en el PIFOP, en el marco del PFPN SEP-
CONACYT

ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCION DEL ABTS Y LA LACASA PARA LA OXIDACION DE COMPUESTOS ORGANICOS

Comité Tutorial

Director de tesis

Doctor Gustavo Viniegra González
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

Asesor: Doctor Mariano García Garibay
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesor: Doctor Eduardo Bázana García
Universidad Nacional Autónoma de México

Comité de Evaluación

Presidente:

Dr. Mariano García Garibay
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa _____

Secretario:

Dr. Ignacio González Martínez
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa _____

Vocal:

Dr. Eduardo Bázana García
Universidad Nacional Autónoma de México _____

Vocal:

Dr. Germán Buitrón Méndez
Universidad Nacional Autónoma de México _____

*A mis tres grandes tesoros Jorge, Irene
y Daniel.*

*Gracias por el amor, apoyo y bríos que
siempre me han dado*

Agradecimientos

A Dios

Por las bendiciones de que me ha colmado.

A mis padres

Por todo lo que me dieron y enseñaron

A mi familia

Por todo su apoyo para culminar mis proyectos

Al Dr. Gustavo Viniegra

Por aceptarme en su grupo de trabajo y por todo lo que me enseñó y apoyó

Al Dr. Ignacio González

Por permitirme realizar una parte muy importante de mi trabajo en las instalaciones de su laboratorio, por todo lo que me enseñó y por sus valiosos comentarios a mi tesis

Al Dr. Victor Ugalde y al Dr. Francisco Villaseñor

Por todo lo que me enseñaron

Al Dr. Eduardo Bárzana y al Dr. Mariano García

Por los comentarios y sugerencias que me realizaron cada trimestre.

Al Dr. Germán Buitrón

Por su comentarios que ayudaron a enriquecer mi tesis

.Al Dr. Octavio Loera

Por su apoyo en todos sentidos.

A mis sobrinas

Por los ánimos que me brindaron

A Lupita, Marisol, Olivia y Rocío

Por su amistad y los ánimos que me brindaron

A mis compañeros y amigos

Gracias por su amistad.

INDICE

Resumen	1
Capítulo I. Introducción	4
Capítulo II. Antecedentes	
2.1 Lacasa	6
2.2 Mediadores.....	8
2.3 Electroquímica.....	10
2.4 Uso ambiental de las enzimas.....	11
2.4.1 Colorantes.....	11
2.4.2 Mezclilla.....	13
2.4.3 Fenólicos.....	14
2.5 Inmovilización de enzimas	14
Capítulo III. Hipótesis y Objetivos	
Hipótesis.....	16
Objetivo General.....	17
Objetivo Específico.....	17
Capítulo IV. Materiales y Desarrollo Experimental	
4.1 Caracterización de la enzima.....	18
4.1.1 Purificación de la enzima.....	18
4.1.2 Determinación de la actividad de la lacasa.....	19
4.1.3 Determinación del contenido de proteína.....	19
4.1.4 Cálculo de los parámetros cinéticos de la lacasa.....	20
4.1.5 Efecto de los disolventes sobre la actividad enzimática.....	21
4.2 Inmovilización de la enzima	21
4.2.1 Sistema de inmovilización I según Ho y Liao.....	21
4.2.2 Sistema de inmovilización II según Villaseñor.....	22

4.3 ABTS ^{I +} libre de enzima.....	22
4.4 Estudio electroquímico del ABTS.....	22
4.4.1 Caracterización electroquímica de ABTS/ABTS ^{I +} /ABTS ⁺⁺	22
4.4.2 Caracterización electroquímica del ABTS oxidado con lacasa Inmovilizada	23
4.5 Producción electroquímica de ABTS ^{I +} y ABTS ⁺⁺	23
4.6 Estabilidad del ABTS ⁺	24
4.7 Decoloración de índigo en solución usando lacasa y ABTS.....	25
4.7.1 Reacción entre el azul índigo y el ABTS ⁺	25
4.7.2 Cálculo de la concentración de índigo y ABTS ⁺ durante la reacción de oxidación del índigo	25
4.7.3 Relación estequiométrica de la reacción entre el ABTS ⁺ y el índigo.....	26
4.7.4 Cinética.....	26
4.7.5. Reciclamiento del ABTS con lacasa y azul índigo.....	27
4.8 Decoloración de índigo en mezclilla usando lacasa y ABTS.....	27
4.8.1 Análisis colorimétrico.....	27
4.8.2 Biodegradabilidad del agua residual	28
4.8.3. Metanogénesis	29
4.9 Reacción de oxidación del ABTS ⁺ con otros sustratos.....	30
4.10 Reacción entre el ABTS ⁺ y el Sudán II.....	31
4.10.1 Variación de coeficientes de partición.....	31
4.10.2 Cinética	32
4.10.3 Cromatografía en placa fina	32
4.10.4 Cromatografía de gases y espectroscopia de masas.....	33
4.11 Reacción entre ABTS ⁺ libre de enzima y p-cresol.....	34
4.11.1 Comprobación de la reacción entre ABTS ⁺ y p-cresol.....	34
4.11.2 Producto de reacción del p-cresol oxidado con ABTS.....	34

4.11.3 Estequiometría de la reacción entre p-cresol y ABTS ¹⁺	35
4.11.4 Cinética.....	36
4.12 Reacción entre el ABTS ¹⁺ y otros compuestos.....	37
4.12.1 Reciclamiento del ABTS entre la lacasa y diferentes sustratos...	37
Capítulo V. Resultados y Discusión	38
5.1 Caracterización de la enzima	38
5.1.1 Caracterización de la lacasa.....	38
5.1.2. Efecto de disolventes sobre la actividad enzimática.....	39
5.2 Sistemas de inmovilización.....	40
5.3 Estudio electroquímico del ABTS oxidado.....	41
5.3.1 Caracterización electroquímica de ABTS.....	41
5.3.2 Caracterización electroquímica de la solución obtenida al oxidar al ABTS con la lacasa inmovilizada.....	43
5.4 Producción electroquímica de ABTS ²⁺ y ABTS ²⁺	45
5.4.1 Electrólisis del ABTS	46
5.4.2 Electrólisis del ABTS ²⁺	47
5.5 Estabilidad del ABTS ¹⁺	49
5.6 Reacción entre el ABTS ¹⁺ y el azul índigo.....	51
5.6.1 Comprobación de la reacción entre el azul índigo y el ABTS ¹⁺	52
5.6.2 Relación estequiométrica de la reacción entre el ABTS ¹⁺ y el índigo.....	53
5.6.3 Cinética.....	56
5.6.4 Reacción de oxidación de índigo con ABTS ²⁺ con y sin lacasa	57
5.6.5 Reciclado del ABTS entre la lacasa y el índigo.....	58
5.7 Decoloración de mezclilla usando lacasa y ABTS.....	60
5.7.1 Decoloración de mezclilla.....	60
5.7.2 Análisis colorimétrico.....	61
5.7.3 Biodegradabilidad del agua residual.....	64

5.7.6 Metanogénesis.....	66
5.8 Reacción de oxidación con el ABTS ⁺	68
5.9 Reacción entre el ABTS ⁺ y el Sudán II	71
5.9.1 Variación de coeficientes de partición.....	71
5.9.2 Cinética	73
5.9.3 Análisis de pureza del sudan II	74
5.10 Reacción entre el ABTS ⁺ y el p-cresol.....	77
5.10.1 Cromatografía en capa fina	77
5.10.2. Identificación del p-cresol oxidado.....	78
5.10.3 Estequiometría.....	78
5.10.4 Cinética.....	79
5.10.5 Reciclado del ABTS entre la lacasa y diferentes Sustratos.....	80
Conclusiones	81
Nomenclatura	83
Indice de tablas	85
Indice de figuras	86
Apéndice 1	90
Apéndice 2	92
Apéndice 3	93
Apéndice 4	94
Bibliografía	96

RESUMEN

Los mediadores son sustancias de bajo peso molecular que amplían la gama de sustratos naturales de las enzimas, extendiendo así el uso de las enzimas a múltiples campos de aplicación. A pesar de la importancia de los mediadores, existen pocos estudios donde se explique su mecanismo de acción.

En este trabajo se realizó un estudio del mediador de la lacasa, el ABTS (ácido 2,2'-(3-etil benzotiazolin-6-sulfónico)) en cuanto a los siguientes aspectos:

- Estabilidad a:

- a) Diferentes temperaturas
- b) pH
- c) Mezclado con 20 % en volumen con diversos disolventes.

- Efecto del ABTS previamente oxidado con lacasa, como agente oxidante de diferentes compuestos fenólicos y no fenólicos, incluyendo al azul índigo.

- Caracterización electroquímica de la forma oxidada del ABTS que se produce con la lacasa inmovilizada obtenida de *Myceliophthora thermophila*.

- Eficiencia del reciclamiento del ABTS.

- Uso de la enzima lacasa y el ABTS para la decoloración de telas teñidas con azul índigo y el tratamiento del agua residual proveniente de la decoloración de las telas de mezclilla.

Se demostró que al usar la lacasa inmovilizada, el ABTS se oxida parcialmente, mediante la abstracción de un electrón, dando como producto el catión radical (ABTS^{•+}). Asimismo se demostró que dicho radical (ABTS^{•+}) es una especie química muy estable, incluso bajo condiciones desnaturalizantes para la lacasa, como al usarla en presencias de disolventes orgánicos.

El ABTS¹⁺ tiene 4 máximos de absorción espectrofotométrica en la región de luz visible a $\lambda=394$ nm, $\lambda=414$ nm, $\lambda=646$ nm y $\lambda=728$ nm. La cuantificación del ABTS monocatión se realiza a longitudes de onda cercanas a 414 nm, sin embargo a esa longitud de onda hay interferencia con la señal del ABTS en su estado reducido, por lo que las determinaciones de [ABTS¹⁺] se deben realizar a $\lambda=728$ nm. El ABTS dicatión absorbe en la región de luz ultravioleta.

Se aportó evidencia de que el ABTS una vez oxidado por intermediación enzimática es capaz, por si solo, de reaccionar con una gama de compuestos orgánicos sin requerir la presencia de la enzima. El radical catión ABTS al realizar la oxidación de estos compuestos capta un electrón, regresando así a su estado reducido y permitiendo su reciclado entre el sustrato y la lacasa, de tal forma que la velocidad de oxidación de los diversos sustratos aquí probados, es mayor en presencia de enzima que sin ésta. Por ejemplo, en el caso del azul índigo, la mezcla ABTS-enzima incrementó la velocidad de oxidación en un orden de magnitud; así, un mol de ABTS oxidó 800 moles de azul índigo en presencia de 4 unidades de lacasa, en 30 minutos, siendo que la relación estequiométrica es 4 moles de ABTS¹⁺ por mol de índigo, en ausencia de la enzima.

También se determinó que el ABTS junto con la lacasa, además de que oxidaron y decoloraron al azul índigo presente en solución, también decoloraron directamente telas de algodón teñidas con azul índigo. Además, el agua de desecho de decoloración de la tela se pudo tratar bajo un proceso con lodos activados en forma aeróbica y en forma anaeróbica; en comparación con una solución de índigo cuya biodegradación fue lenta en el proceso aeróbico y no sufrió ningún cambio en el proceso anaeróbico.

Esta tesis tiene tres conclusiones principales:

1.- El $ABTS^{I+}$ es un radical muy estable que oxida a diversos compuestos sin requerir la presencia de la lacasa y se puede usar en condiciones desnaturalizantes de la enzima, como es en presencia de disolventes. Este radical tiene máximos de absorción en la región UV-visible en $\lambda=394$ nm, $\lambda=414$ nm, $\lambda=646$ nm y $\lambda=728$ nm. En la región cercana a $\lambda=414$ nm, donde generalmente se reporta la determinación de concentraciones de $ABTS^{I+}$ ocurre un traslapamiento con el ABTS en su forma reducida, por lo cual las mediciones no son precisas en el intervalo $390 \text{ nm} \leq \lambda \leq 420$ nm. La mejor longitud de onda para cuantificar al $ABTS^{I+}$ es en $\lambda=728$ nm. El ABTS dicatión es incoloro ya que absorbe en la región ultravioleta, sus máximos de absorción son en $\lambda = 214$, $\lambda = 256$ y $\lambda = 298$ nm.

2.- El ABTS se puede reciclar entre el sustrato final y la enzima, de tal forma que permite su uso industrial a pesar de su alto precio. Esto abre un nuevo campo en el desarrollo de reactores con enzima inmovilizada, donde se efectúen oxidaciones de diversos compuestos fenólicos y no fenólicos.

3.- El sistema ABTS-lacasa puede usarse para tratar efluentes contaminados con sustancias peligrosas, como es el caso del azul índigo, que lo convierten en ácido antranílico (sustancia biodegradable), o el *p*-cresol que al oxidarlo con ABTS-lacasa se polimeriza, permitiendo así su fácil separación de los efluentes..

CAPÍTULO I

INTRODUCCION

En los últimos años se ha sugerido el uso de las enzimas en diversos campos, debido a las múltiples ventajas que ofrecen, tales como: operan a condiciones de presión y temperatura moderadas; al ser producidas por hongos, plantas y microorganismos su costo generalmente es bajo, son selectivas y se ha reconocido que catalizan diversas reacciones que químicamente son muy difíciles y costosas de efectuarse. Además, el uso de mediadores puede ampliar la gama de sustratos de las enzimas.

Hay diversas teorías que explican el mecanismo de acción de los mediadores con la enzima, como la que indica que el mediador actúa como un "disparador de electrones": una vez que éste se oxida por la enzima, difunde al medio y oxida al sustrato que, debido a su tamaño no puede interactuar directamente con la enzima (Fabrini, et al 2002). Pottash citado por Bourbonnais et al (1998), indica que el mediador actúa como un activador de la enzima transfiriendo el primer electrón y habilitando así a la lacasa para empezar el ciclo catalítico de transferencia de un electrón al compuesto no fenólico.

La lacasa es una fenol oxidasa que puede actuar principalmente sobre compuestos fenólicos y aminas aromáticas (D´Acunzo et al, 2002). Bourbonnais y Paice (1990) demostraron que la lacasa puede oxidar al ABTS (ácido 2,2 azino bis (3-etilbenzotizoline 6 sulfónico) obteniéndose el monocatión y el dicatión, donde la primer forma oxidada del mediador es capaz de oxidar compuestos fenólicos, mientras que el dicatión en presencia de la lacasa, es necesario para la oxidación de compuestos no fenólicos. Desde entonces se han descrito más de 100 mediadores, entre los cuales el ABTS es uno de los más usados (Johannes y Majcherczyk, a 2000).

El catión radical ABTS es usado frecuentemente para evaluar si un compuesto tiene capacidad antioxidante, determinando si decolora o no al ABTS'⁺ (Aliaga y Lissi, 2000). Sin embargo las mediciones de absorbancia del ABTS se realizan a diferentes valores de longitud de onda, considerados según diferentes autores, como máximos, por ejemplo Kim et al (2002) indican $\epsilon=35000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a $\lambda=405 \text{ nm}$; mientras que D'Acunzo et al (2002) proponen $\epsilon=31500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a $\lambda=414 \text{ nm}$; Gouka et al (2001) asignan un $\epsilon=35000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a $\lambda=414 \text{ nm}$; mientras que Tiller et al (1999) denotan $\epsilon=36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a $\lambda=414 \text{ nm}$; por otro lado Bourbonnais et al (1998) proponen un $\epsilon=36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a $\lambda=420 \text{ nm}$ y Muñoz et al (1997), indican $\epsilon=29300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a $\lambda=436 \text{ nm}$.

En cuanto al color de las especies oxidadas del ABTS, todos los autores coinciden en que la especie monocación del ABTS es verde. Sin embargo, hay reportes indicando diferencias en la coloración del ABTS dicación: Bourbonnais et al (1998) indican que es púrpura, mientras que Barreca et al (2003) reportan que éste es rojo.

Debido a la importancia que tiene el ABTS como mediador de la lacasa y a las discrepancias existentes entre los diferentes reportes, es necesario realizar un estudio del mediador ABTS y la lacasa para determinar: que estructura oxidada del ABTS se obtiene con la lacasa, cuál es la reactividad el ABTS previamente oxidado con la enzima y cuales son las características espectrofotométricas UV-visible del ABTS oxidado, además de explicar el mecanismo de reacción que se sigue entre el ABTS previamente oxidado con la lacasa y los diversos sustratos aquí estudiados.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

2.1 Lacasa

La lacasa es una de las enzimas, que en los años recientes, han sido de las más ampliamente estudiadas. Fue descubierta en exudados del árbol japonés *Rhus vernicifera* y posteriormente se encontró en hongos como: *Pleurotus ostreatus*, *Pholiota subacida*, *Trametes versicolor*, *Rhisoctonia practicola*, *Aspergillus nidulans* y *Phanerochaete chrysosporium*, entre otros. Sólo hay una bacteria, *Azospirillum lipoferum* en la que se ha encontrado esta enzima (Thurston, 1994). La lacasa es una oxidasa multicobre (EC 1.10.3.1) que reduce el oxígeno formando dos moléculas de agua y simultáneamente oxida a varios compuestos aromáticos mediante la abstracción de cuatro electrones (Bourbonnais et al, 1997). Cataliza la oxidación de sustancias orgánicas e inorgánicas (Xu, 1996), entre ellas están los mono, di y polifenoles y aminas aromáticas. Se cree que participa también en la biosíntesis de la lignina, pero el mecanismo se desconoce (Lonergan et al, 1997).

Basado en estudios de EPR y NMR se encontró que los átomos de cobre de la lacasa se dividen en tres tipos. El Tipo I, es un cobre azul mononuclear de baja energía, absorbe a 605 nm y da un espectro EPR con una muy pequeña señal en la región de campo bajo. Puede ser removido de la enzima con una gran pérdida de actividad. El tipo II es paramagnético tiene parámetros normales de EPR que indican la presencia de alrededores tetragonales, no tiene absorción significativa en el visible. Es fácil de eliminar con la pérdida de actividad de la enzima. El tipo III es un cobre ferromagnético bi-nuclear que absorbe a 330 nm, no es detectable por EPR debido a una fuerte interacción antiferromagnética Cu-Cu (Yaropolov et al, 1994, Sima, 1989). Las lacasas generalmente tiene cuatro átomos de cobre, uno tipo I, uno tipo II y dos tipo III, pero hay excepciones pues algunas lacasas poseen 2, 3 ó 6 átomos de cobre (Sima, 1989).

El sitio activo de la lacasa es trinuclear formado por los cobres tipo II y tipo III; el tipo I transfiere los electrones al sitio trinuclear, donde el oxígeno se reduce a agua (McGuirl y Dooley 1999). El mecanismo de acción puede ser: la transferencia de dos electrones del sustrato al cobre tipo III para formar el O_2^{2-} . Esto es seguido por la transferencia de un electrón del cobre tipo I al oxígeno intermediario para formar agua y un radical O^{\cdot} . El cuarto electrón pasa del cobre tipo II al O^{\cdot} para formar la segunda molécula de agua. El cobre tipo I juega un papel central en la transferencia de al menos un electrón al cobre tipo III, aunque otros trabajos indican que todos los electrones pasan por el cobre tipo I (Yaropolov et al, 1994). Uno de los ligandos del cobre tipo I puede ser cisteína o metionina. El átomo de cobre tipo II está enlazado a tres átomos de nitrógeno y el cuarto ligando del cobre tipo II es agua. Los átomos de cobre tipo II y tipo III tienen una alta afinidad por el N^{3-} , O_2^{2-} y F^- . El cobre tipo II juega un papel importante en la estabilización del cobre tipo III en el sitio activo. Es posible que los átomos del tipo II y III estén unidos vía nitrógeno (Yaropolov et al, 1994). Uno de los cobres tipo III está con número de coordinación tres y el otro con número de coordinación cinco y ligado por un residuo de histidina. La geometría del cobre tipo II es muy sensible a los cambios de pH, temperatura y sales del amortiguador de pH (McGuirl y Dooley, 1999).

Las lacasas pueden ser inducibles o constitutivas y pueden ser extra o intracelulares (Sima, 1989). Algunos fenoles substituidos, aminas y ácido benzoico pueden inducir la síntesis de lacasa en organismos que no la producen bajo otras condiciones (Yaropolov et al, 1994). El intervalo de pesos moleculares de la lacasa varía entre 65 000 y 140 000 Da, las diferencias son por la cantidad de carbohidratos que contengan (Sima, 1989). Los carbohidratos pueden constituir entre el 10 y el 45 %, los cuales incluyen hexosaminas, glucosa, manosa, galactosa, fructosa y arabinosa. Su potencial redox es entre 0.3 a 0.8 V/NHE dependiendo de la fuente de lacasa, Xu (1996). La lacasa se ha usado principalmente para la deslignificación, el blanqueo de la pulpa de papel, clarificación de jugos, elaboración de sensores y para decoloración de efluentes contaminados con colorantes textiles (Durán y Esposito, 2000 y Fernández-Sánchez et al, 2002).

2.2 Mediadores

El intervalo de sustratos de la lacasa puede ser ampliado con la ayuda de compuestos de bajo peso molecular llamados mediadores. Bourbonnais y Paice (1997) indican que la lacasa solamente oxida derivados fenólicos de la lignina, pero puede oxidar a los no fenólicos en presencia del ABTS (ácido 2,2 azino bis (3-etilbenzotizoline 6 sulfónico). Según Johannes y Majcherczyk (2000) todos los radicales que se obtienen de la oxidación con la lacasa podrían actuar como mediadores. La elección del mediador juega un papel muy importante en la efectividad del sistema enzima-mediador. Se han descrito más de 100 mediadores y se ha probado su aplicación en muchos campos, como es en la oxidación de hidrocarburos poli-aromáticos y en la decoloración de colorantes textiles, entre otros. Su desventaja es su alto precio y posible toxicidad (Johannes y Majcherczyk, 2000).

A pesar de la importancia que tiene el uso de los mediadores, se conoce poco acerca de su mecanismo. Algunas teorías han sido planteadas, pero falta conocer mejor su forma de acción para aumentar y mejorar su aplicación a campos todavía no desarrollados. Entre las teorías están la de Potthast, referido por Collins et al (1998) quien sugiere que el ABTS actúa como un activador o co-oxidante de la enzima, por lo que debe haber un mecanismo para su reciclamiento regresando a su forma reducida y quedando así disponible para un subsecuente ciclo catalítico. Además proponen que el ABTS actúa como un donador de un electrón y activador de la lacasa, pero no funciona como oxidante del sustrato y que una vez activada la lacasa por el ABTS ésta puede oxidar compuestos no fenólicos. Vandertol-Vanier et al (2002) indican que la velocidad de oxidación de varios hidrocarburos poliaromáticos puede incrementarse por la adición del co-oxidante ABTS. Bourbonnais y Paice (1997), que explican que el ABTS funciona como un agente de oxidación de la lignina, ya que por su tamaño puede difundir mejor entre las fibras de la lignina que la lacasa. Bourbonnais et al, citado por Li et al (1998) indican además que el catión de la clorpromazina y del ABTS no pueden oxidar la rotenona o el alcohol veratrílico en ausencia de la lacasa. El catión radical ABTS es frecuentemente usado para evaluar si un compuesto tiene capacidad antioxidante.

Para ello se determina si decolora o no al ABTS'^+ (Aliaga y Lissi, 2000). Sin embargo las mediciones de absorbancia del ABTS se realizan a diferentes valores de longitud de onda donde ocurren máximos de absorción, según diferentes autores, por ejemplo Kim et al (2002) indican $\epsilon=35000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a $\lambda=405 \text{ nm}$; mientras que D'Acunzo et al (2002) proponen $\epsilon=31500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a $\lambda=414 \text{ nm}$; Gouka et al (2001) asignan un $\epsilon=35000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a $\lambda=414 \text{ nm}$; mientras que Tiller et al (1999) denotan $\epsilon=36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a $\lambda=414 \text{ nm}$; por otro lado Bourbonnais et al (1998) proponen un $\epsilon=36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a $\lambda=420 \text{ nm}$ y Muñoz et al (1997), indican $\epsilon=29300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a $\lambda=436 \text{ nm}$. Sin embargo existen pocos estudios respecto al mecanismo y cinética de la reacción, Henriquez et al (1998) evaluaron la cinética del ABTS con fenoles, hidroperóxidos y aminoácidos y encontraron una cinética compleja entre las velocidades iniciales de reacción y la concentración de reactivos, así como un paso reversible del ABTS'^+ a ABTS seguido por reacciones radical-radical.

En la figura 1 se muestran las estructuras redox de a) ABTS, b) ABTS'^+ y c) ABTS^{++}

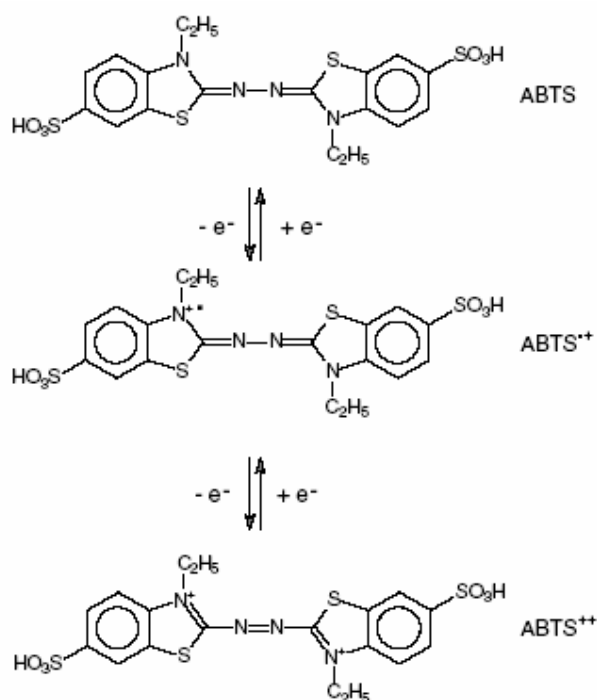


Figura 1. Estructuras redox de a) ABTS en su estado reducido, b) Monocación ABTS'^+ y c) dicación ABTS^{++}

Según Scott et al (1993) la primer estructura corresponde al ABTS en su estado dianión, la segunda, al ABTS anión y la tercera al ABTS en estado reducido. Otros autores como Bourbonnais et al (1998) y Johannes y Majcherczyk (2000) asignan a la primera estructura el estado reducido, a la segunda como el monocatiión y a la tercera estructura como el dicatiión. Como los reportes de trabajos que se tomaron como referencia y para comparación, a lo largo de la presente, consideran la segunda notación, esa es la que aquí se usó: asignando a la primera estructura de la figura 1 como el estado reducido (ABTS), a la segunda como el monocatiión (ABTS⁺) y a la tercera como el dicatiión (ABTS⁺⁺).

2.3 Electroquímica

Los sistemas electroquímicos permiten convertir la energía suministrada a través de una fuente de poder externa en cambios químicos en una celda. Estos cambios son inducidos eléctricamente en los conductores electrónicos y la conversión de una sustancia en otra ocurre en la interfase con el conductor electroquímico (electrolito).

Un sistema electroquímico consta de una celda, de tres electrodos y una solución (electrolito) donde se lleva a cabo la conducción de carga por iones. Los tres electrodos necesarios son: A) Electrodo de trabajo (ET) es aquél en el que tiene lugar la reacción electroquímica de interés. B) Para cerrar el circuito y permitir el paso de corriente eléctrica se necesita otro electrodo que se denomina electrodo auxiliar o contra-electrodo (EA). Finalmente, para conocer cada uno de los procesos anódico y catódico por separado, se utiliza un tercer electrodo, el electrodo de referencia (ER) que permite la medida del potencial del ET utilizando un voltímetro electrónico de alta impedancia.

Todas las transformaciones químicas implican ganancia o pérdida de electrones originándose un flujo de corriente distinta de cero. El resultado para la celda de electrólisis es de dos reacciones, una de electro-oxidación y una de electro-reducción, las cuales mantienen la neutralidad eléctrica en el circuito global

Partiendo de la celda inicialmente en equilibrio, situación en la que no existen reacciones netas de oxidación o reducción, se aumenta poco a poco la diferencia de potencial entre ambos electrodos utilizando un generador de potencial. A partir de una diferencia de potencial dada E empiezan a producirse corrientes eléctricas netas (I) que circulan por ambos electrodos. Cuando no existe un campo eléctrico exterior aplicado a la interfase, la misma se encuentra bajo un equilibrio dinámico, que implica el paso de cargas en uno y otro sentido a igual velocidad, en este caso la densidad de corriente en uno y otro sentido es la misma y se llama densidad de corriente de intercambio, j_0 . La densidad de corriente neta vale cero y la diferencia de potencial en la interfase tiene entonces su valor de equilibrio $E_{i=0}$. (potencial de corriente nulo) (Zinola, 1999),

El flujo de una corriente está determinado por dos magnitudes relacionadas entre sí. La primera es la diferencia de potencial en el circuito. La segunda es la intensidad de corriente, esta magnitud se mide en amperios; 1 amperio corresponde al paso de unos 6.250.000.000.000.000 electrones por segundo por una sección determinada del circuito (Bockris, 1970)

2.4 Uso ambiental de las enzimas

2.4.1 Colorantes

Muchas de las actividades industriales producen grandes cantidades de compuestos xenobióticos que en gran proporción son enviados al medio ambiente (agua, aire y suelo), ocasionando graves problemas a las comunidades acuáticas y terrestres (Colombo et al, 1996). Entre las industrias más contaminantes con colorantes se pueden citar a la textilera y la papelera. Recientemente se ha centrado la atención en microorganismos y hongos que tienen capacidad para biodegradar compuestos recalcitrantes, incluyendo hidrocarburos, clorobenzenos, bifenilos clorinados (Colombo et al, 1996) y diversos colorantes (Greca et al, 2002). Las enzimas representan una opción muy atractiva para el tratamiento de desechos debido a su biocompatibilidad y sencillo control de los procesos (Soares et al, 2001).

Los colorantes azo constituyen la clase de colorantes más ampliamente utilizados, siendo empleados en las industrias textil, de cosméticos, pinturas, medicamentos y de alimentos, principalmente (Wariishi et al, 2002). Los colorantes azo son de los primeros compuestos químicos fabricados por el hombre (Muralikrishna y Renganathan, 1995). Su producción anual se estima en 7×10^5 toneladas (Tan et al, b1999). De esta cantidad aproximadamente del 10 al 15 % se desechan al medio ambiente durante su manufactura y uso (Chen et al, 2003). El color es usualmente el primer contaminante reconocido en el agua de desecho, donde una cantidad de sólo 10–50 mg/L es visible y afecta la transparencia del agua y la solubilidad de gases (Rodríguez et al, 1999). Muchos colorantes azo son resistentes a la luz, temperatura y ataque microbiano haciéndolos compuestos recalcitrantes (Wesenbeg et al, 2003). El problema es grave puesto que aproximadamente el 50 % de los colorantes producidos en el mundo son compuestos tipo azo.

Los colorantes azo no son biodegradables en tratamientos aeróbicos convencionales (Pereira y Durran, 2001). En algunos casos estos colorantes pueden transformarse en el medio ambiente en aminas y otros productos tóxicos y cancerígenos (Tan et al, a1999). Otros reportes indican que tampoco son biodegradables con lodos activados ya que el colorante se queda adsorbido en la biomasa (Balan y Monteir, 2001), de allí que los colorantes sean considerados como contaminantes peligrosos. Se estima que el 90 % de los colorantes usados en la industria textil no sufren ningún cambio en las plantas de tratamiento con lodos activados ó por métodos físico-químicos y así son descargado en los ríos (Abadulla et al, 2000).

Se ha demostrado que varios hongos decoloran diversos colorantes (Gandolfi et al, 2004). Generalmente el proceso es lento y requiere de varios días (Greca et al, b2001). Entre los hongos que se han usado favorablemente para biodegradar compuestos azo están *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus sp.*, *Bjerkandera sp.* (Greca et al, b2002). La estructura química del colorante es importante para que pueda ser atacada por las enzimas, ya que hay una preferencia por anillos aromáticos ricos en electrones.

Los sustituyentes metil y metoxi son los principales, ubicados en las posiciones orto y para en los anillos bencénicos, mientras que en las posiciones meta en los anillos bencénicos no son sustratos de la lacasa, según lo reportado por Muralikrishna y Renganathan (1995).

2.4.2 Mezclilla

Por otro lado, el mercado de la mezclilla es muy grande y una buena parte es para artículos decolorados y con aspecto de usados. Esta apariencia se produce con el llamado "stone wash", que consiste en usar piedras pómez dentro de una máquina giratoria para gastar la superficie de la tela y remover partículas de índigo. Este proceso causa daño en la maquinaria y en la tela y al final del proceso es muy caro remover de la tela las partículas de piedra residuales (Olson et al, 1993). Otro proceso involucra el uso de agentes oxidantes como el hipoclorito de sodio o el permanganato de potasio con o sin uso de piedra pómez (Express Textile India's, 2003). Este proceso es difícil de controlar ya que el blanqueo continúa aún después de haber extraído la tela del licor, además de que ocasiona daño en las fibras y genera compuestos clorados tóxicos (Ota et al, 1994).

Durante estos procesos el índigo es removido de la tela y desechado en el agua. El índigo no se puede biodegradar o remover fácilmente con tratamientos físicos ó químicos. Además, el índigo es ambientalmente peligroso por su alto potencial para formar aminas tóxicas (Campos y Cavaco, 2001).

Se ha iniciado el estudio de la aplicación de enzimas a la decoloración de mezclilla debido a que superan las desventajas de los procesos convencionales arriba descritos, además de que ayudan a conservar el agua, hay ahorro de energía y disminuye el desgaste de la maquinaria. Las enzimas que más se han usado desde la década pasada para decorar telas de algodón teñidas con índigo son las celulasas, las cuales decoloran el índigo sin ocasionar daños severos a las fibras, pero pueden producir que el índigo retorne a la tela quedando manchada (Tzanov et al, 2003).

2.4.3 Compuestos fenólicos

Los contaminantes fenólicos se producen en diferentes procesos como son: degradación parcial de herbicidas, preservativos para la madera e industrias relacionadas con el petróleo. Dichos compuestos tienen diferentes grados de toxicidad y su remoción del ambiente es importante debido a que algunos de ellos pueden transformarse en compuestos con mayor toxicidad (Bollag et al, 1988).

Además, la oxidación de compuestos fenólicos es importante en el blanqueo de jugos de frutas y en vinos, deslignificación de pulpa de papel, blanqueo de textiles y descontaminación de agua y suelo (Xu, 1996).

Se han estudiado diversos procesos para la oxidación de compuestos fenólicos, como son: oxidación química, tratamientos electroquímicos, oxidación fotocatalítica y procesos a condiciones supercríticas, estos últimos son muy caros ya que se requieren condiciones extremas, como son temperaturas de 500 a 700 °K y presiones de 70 a 200 bar con un alto consumo de energía, por lo que no son factibles para aplicarse industrialmente (Medina et al, 2004). Se ha probado que las lacasas y peroxidases convierten los fenoles a radicales aril-oxi, que polimerizan y forman complejos insolubles que pueden ser removidos fácilmente por filtración (Davis, 1990).

2.5 Inmovilización de enzimas

Para las enzimas se han encontrado múltiples campos de aplicación, pero presentan algunos inconvenientes: al ser solubles en agua es muy fácil que se vuelvan inestables o disminuyan su actividad al variar la cantidad de agua en el medio (Rohrbach, 1981). Usualmente son caras y su recuperación para reusarlas es muy difícil o imposible; incluso en algunos casos el proceso de separación ocasiona daños a la enzima. Para salvar estas dificultades, así como disminuir el costo del uso de enzima por su reemplazo constante, se ha sugerido su inmovilización.

La inmovilización de enzimas se define como la confinación de enzimas en ciertas regiones o espacios con la retención de su actividad catalítica y con la ventaja de poder usar la enzima repetida y continuamente (Wang et al, 1979)

Las principales variables a considerar en un sistema de inmovilización son: la enzima, el soporte, el modo de interacción de la enzima con el soporte y el contenido de agua, ya que una enzima completamente deshidratada no es activa catalíticamente (Adlercreutz, 1991).

Las principales características que debe tener un buen soporte son: gran área superficial, permeabilidad, características hidráulicas, insolubilidad, estabilidad química, mecánica y térmica, alta rigidez, tamaño y forma de partícula, resistencia al ataque microbiano, regenerabilidad y capacidad del soporte para absorber agua (Wang, 1979). Las enzimas se pueden fijar a muchos tipos de soportes: materiales inorgánicos como la sílica, alúmina, vidrio y zeolita; orgánicos como polisacáridos y polímeros sintéticos como poli-acrilamidas y resinas fenol formaldehído (Baohong, 1997).

Entre las formas de interacción de la enzima con el soporte se encuentran: por adsorción física, por enlace iónico, por enlace covalente, por entrecruzamiento y por atrapamiento, entre otras (Wang, 1979).

CAPÍTULO III

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS

El ABTS no es un activador de la enzima sino que es un sustrato de la misma y al ser oxidado por la lacasa se produce el monocatión. Este radical es muy estable y tiene la capacidad de:

- 1) Actuar como agente oxidante de varios compuestos sin requerir la presencia de la enzima.
- 2) Aumenta la velocidad de oxidación en presencia de la enzima, ya que el ABTS se puede reciclar varias veces entre el sustrato y la lacasa.
- 3) Oxida a compuestos tales como el índigo a formas y estructuras de fácil biodegradación.

OBJETIVO GENERAL

Comparar la velocidad de reacción del ABTS con diversos compuestos químicos, en presencia y ausencia de lacasa, para explicar el mecanismo de acción del ABTS con la lacasa.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Caracterizar el $ABTS^{I+}$ que se produce con la lacasa de *Myceliophthora thermophila* clonada en *Aspergillus oryzae* (EC 1.10.3.1).

Demostrar que el ABTS al oxidarse con la lacasa produce el ABTS monocatión.

Encontrar diversos sustratos que se pueden oxidar con el $ABTS^{I+}$ sin requerir la presencia de la lacasa.

Calcular las velocidades de reacción del sistema: sustrato- $ABTS^{I+}$

Calcular las velocidades de reacción del sistema: sustrato-ABTS-lacasa.

Establecer el sistema de reciclamiento del ABTS entre la lacasa y el sustrato.

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 Caracterización de la enzima

4.1.1 Purificación de la enzima

La lacasa se obtuvo del producto comercial Deni Lite II S de Novozymes México. Este producto está formulado para decolorar azul índigo. Greca et al (2001) lo caracterizaron e indican que tiene lacasa, ácido fenotiazin-10 propiónico como mediador y un surfactante no-iónico en amortiguador de pH de fosfatos.

Para eliminar todos los demás componentes de la formulación comercial y dejar solamente la enzima, se hizo el siguiente proceso de purificación:

- Se disolvieron 15 g de Deni Lite II S en 150 mL de agua destilada y se mantuvieron en agitación continua por 2 horas.
- Se centrifugó la mezcla a 10 000 rpm a 10 °C por 20 minutos.
- El sobrenadante se filtró primero con papel filtro Whatman No. 1 y posteriormente con filtro millipore de 0.45 µm.
- Se agregaron 150 mL del filtrado en 500 mL de acetona a 5 °C.
- La mezcla se dejó en baño de hielo por 3 horas
- Posteriormente se centrifugó a 10 000 rpm a -10 °C por 20 minutos usando una centrífuga Beckman J2-HS
- Se descartó el sobrenadante y se recolectó el sólido.
- El sólido se lavó tres veces con acetona a 0°C.
- Después se colocó en una caja petri de 5 cm de diámetro y se puso en un desecador por 1 día para eliminar la acetona remanente.

Se disolvieron 3 g del sólido en 10 mL de amortiguador de pH de acetatos 0.1 M a pH 5 y se conservó en refrigeración para su uso posterior.

4.1.2. Determinación de la actividad de la lacasa

La actividad de la solución de enzima se midió como sigue:

- Se preparó una solución de enzima 1:100 V/V con amortiguador de pH de acetatos 0.1 M a pH 5 y se incubaron a 25 °C.
- Se preparó una solución de ABTS 5 mM e incubó a 25 °C.
- El testigo se hizo mezclando 0.1 mL de solución de lacasa, 0.1 mL de amortiguador de pH de acetatos 1M a pH 5 y 0.8 mL de agua destilada.
- Las muestras se prepararon con 0.1 mL de solución de lacasa, 0.1 mL de amortiguador de pH de acetatos 1 M a pH 5, 0.7 mL de agua destilada y 0.1 mL de ABTS 5 mM.
- Las muestras se mezclaron perfectamente y se leyó el cambio de absorbancia a 414 nm cada 15 segundos, por 3 minutos, usando un espectrofotómetro UV-Visible Beckman DU 640.
- Se graficó el cambio de absorbancia contra el tiempo.
- La pendiente correspondió a la velocidad inicial (V_0) de oxidación del ABTS con lacasa.
- Se calculó la actividad tomando en cuenta el coeficiente de extinción molar del ABTS ($36\ 000\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$) (Tiller et al, 1999) y la dilución de la lacasa.

4.1.3 Determinación de contenido de proteína

La proteína presente se cuantificó por el método de Bradford (García y Vázquez-Duhalt, 1998).

- Se prepararon soluciones con 2, 4, 6, 8 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de albúmina en NaCl 0.15 M.
- El blanco se preparó con 0.2 mL de NaCl 0.15 M y 0.8 mL de reactivo de Bradford.
- Se colocaron 0.2 mL de solución de albúmina con 0.8 mL de reactivo de Bradford, se agitó con un vortex y después de 10 minutos se leyó la absorbancia a $\lambda=595\ \text{nm}$. Se repitió para todas las soluciones de albúmina.

- La curva de calibración se hizo graficando la concentración de proteína contra la absorbancia.

- A 0.2 mL de la solución de lacasa se añadieron 0.8 mL de reactivo de Bradford, se mezcló usando un vortex, después de 10 minutos se leyó la absorbancia a $\lambda=595$ nm y se calculó la cantidad presente de proteína usando la curva de calibración.

4.1.4. Cálculo de los parámetros cinéticos de la lacasa

- Se prepararon las mezclas indicadas en la tabla 1.
- Se calculó la velocidad inicial (V_0) para cada solución de ABTS, según lo descrito en 4.1.2

- Se graficaron las V_0 de oxidación de ABTS con lacasa contra la concentración de ABTS.

- Se ajustaron los datos obtenidos al modelo de Michaelis Menten por mínimos cuadrados. Del ajuste se obtuvo V_{max} y K_m

Se calculó la k_{cat} con la ecuación: $k_{cat} = V_{max}/[Enzima]$

Tabla 1. Mezclas de reacción para determinar los parámetros cinéticos de la lacasa con el ABTS medidos a 25 °C

ABTS 5 mM	Amortiguador de acetatos a pH 5	Lacasa 1:100 V/V
0.001 mL	0.1 mL	0.1 mL
0.005 mL	0.1 mL	0.1 mL
0.01 mL	0.1 mL	0.1 mL
0.02 mL	0.1 mL	0.1 mL
0.05 mL	0.1 mL	0.1 mL
0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL
0.2 mL	0.1 mL	0.1 mL

4.1.5. Efecto de disolventes sobre la actividad enzimática.

Se mezcló la lacasa con 10, 20, 30, 40, 50 y 60 % en volumen de etanol y acetonitrilo y se le determinó su actividad según 4.1.2

4.2. Inmovilización de la enzima

Se probaron dos sistemas de inmovilización de la lacasa:

4.2.1 Sistema I preparado según Ho y Liao (1983):

- Se mezclaron 5 g de sílica gel con 50 mL de solución de NaOH al 2%, se calentaron por 2 horas a 80 – 90 °C manteniendo agitación suave. Esto permitió formar grupos SiONa en la sílica.

- La sílica tratada se decantó y lavó con agua destilada.

- Posteriormente se le adicionaron 50 mL de HNO₃ al 20 %, y se dejaron reaccionar por 30 minutos con agitación constante a temperatura ambiente. Con este tratamiento ácido se desplazó el Na quedando grupos hidroxilo terminales.

- La sílica se decantó y lavó con agua destilada.

- Después la sílica se hizo reaccionar con 50 mL de 3 aminopropiltriétoxilano al 4% por 2 horas a 80 – 90 °C con agitación suave. Esto permitió introducir grupos aminos unidos al hidroxilo.

- Se decantó y lavó la sílica con agua destilada.

- Se agregaron 25 mL de glutaraldehído 0.3% y se dejaron por 3 horas con agitación suave a 60 - 70 °C. En esta etapa se forman bases de Schiff entre los grupos amino y los aldehído.

- La sílica se decantó y lavó con agua destilada.

- Se adicionó la enzima en amortiguador acetatos de pH 5 y se dejó toda la noche en contacto con la sílica, la cual se unió covalentemente con los grupos aldehído introducidos previamente.

- Finalmente la sílica nuevamente se decantó y lavó con agua destilada.

4.2.2 Sistema II preparado según Villaseñor (2004)

- Se mezclaron 15 mL de agua con 15 mL de etanol. Gota a gota y con agitación constante se agregan 15 mL de tetraetil orto silicato, se agitó la mezcla 30 minutos mas después de haber adicionado todo el silicato.

- Se dejó la mezcla en un cristizador a temperatura ambiente por 7 días aproximadamente, para formar cristales.

- Los cristales de sílica se fraccionaron y cribaron al tamaño deseado

- El proceso de inmovilización se continuó según Ho y Liao (1983)

4.3 ABTS¹⁺ libre de enzima.

A 10 g de cristales con enzima inmovilizada se le agregaron 50 mL de ABTS 5 mM y se dejaron a temperatura ambiente, aproximadamente 7 días. Diariamente se leyó su absorbancia a 414 nm. Cuando se registró la máxima absorbancia a 414 nm, el ABTS¹⁺ se separó de la enzima mediante filtración con papel y se guardó en el refrigerador para su uso posterior.

4.4 Estudio electroquímico del ABTS

Para determinar la forma oxidada del ABTS que se obtuvo con la lacasa inmovilizada, se efectuó un estudio electroquímico.

4.4.1 Caracterización electroquímica de ABTS/ABTS¹⁺/ABTS²⁺

Todas las mediciones fueron realizadas en un potenciostato galvanostato Autolab modelo PGstat 30, con un sistema de tres electrodos en una solución reguladora de acetatos 0.2 M a pH 5, como electrolito de soporte. Como electrodos de trabajo se usaron un disco de carbón vítreo (0.0706 cm²) y un disco de platino (0.0314 cm²). Como electrodo auxiliar un alambre de platino y como electrodo de referencia KCl_(sat)-AgCl_(s)-Ag.

Los electrodos de trabajo (C y Pt) fueron pulidos con alúmina para garantizar la ausencia de residuos en la superficie. Todos los voltamperogramas fueron iniciados en el potencial de circuito abierto ($E_{j=0}$) y los barridos de potencial fueron realizados en ambas direcciones, positiva y negativa usando diferentes concentraciones de ABTS y varias velocidades de barrido de potencial.

4.4.2 Caracterización electroquímica del ABTS oxidado con lacasa inmovilizada

La solución de ABTS oxidado producida con la lacasa inmovilizada se sometió a un análisis electroquímico en las mismas condiciones descritas en la sección anterior y se compararon los voltamperogramas del ABTS oxidado enzimáticamente con los voltamperogramas del ABTS obtenidos como se indicó en la sección anterior.

4.5 Producción electroquímica de $ABTS'^+$ y $ABTS^{++}$

Para conocer el espectro de absorción del ABTS monocatión y dicatión, se produjeron electroquímicamente y simultáneamente se registraron sus barridos espectrofotométricos. El estudio espectro-electroquímico se realizó con un electrodo óptico transparente de capa delgada OTTLE (por sus siglas en inglés) construido con una malla de platino dentro de una celda de cuarzo de 0.1 cm de paso óptico. Para ambas oxidaciones se usó ABTS 0.05 mM en una solución reguladora de acetatos 0.1 M a pH 5 y se monitoreó espectrofotométricamente cada 30 segundos.

Para la formación de $ABTS'^+$ se realizó un barrido de potencial muy lento, a una velocidad de 0.05 mV/s, iniciando en $E = 0.5$ V hasta llegar a $E = 0.70$ V y regresando a 0.5 V. Para formar el $ABTS^{++}$ el barrido de potencial fue de 0.05 mV/s iniciando en $E = 0.9$ V hasta 1.10 V y regresando a 0.9 V.

4.6 Estabilidad del ABTS⁺

Al ABTS⁺ previamente oxidado con la lacasa inmovilizada se le midió la estabilidad a la temperatura, al pH y el efecto de su mezclado con diversos disolventes polares.

a) Estabilidad a cambios de Temperatura. Tres matraces conteniendo 10 mL de ABTS⁺ libre de enzima se mantuvieron durante un mes a las siguientes temperaturas: 4, 25 y 60 °C y se monitorearon periódicamente leyendo la absorbancia a $\lambda=414$ nm para determinar la cantidad remanente de ABTS⁺ en la solución.

b) Estabilidad a distintos valores de pH, Tres matraces con 10 mL de ABTS⁺ libre de enzima se ajustaron a los siguientes valores de pH: 1.3, 6.5 y 8.2 y después de una hora se les determinó su espectro espectrofotómetro en el intervalo de $\lambda=320$ a $\lambda=500$ nm

c) Estabilidad con distintos disolventes. Cuatro matraces cada uno con 8 mL de ABTS⁺ libre de enzima se mezclaron con 2 mL de disolvente: metanol, etanol, isopropanol y acetonitrilo, en cada caso se midió la absorbancia a 414 nm después de 1 y de 7 horas de haberse mezclado con los disolventes.

4.7 Decoloración de índigo en solución usando lacasa y ABTS^{I+}

4.7.1 Reacción entre el azul índigo y el ABTS^{I+}

Para verificar que el ABTS^{I+} reaccionó con el azul índigo sin requerir la presencia de la lacasa, se preparó una mezcla equi-molar de ambos reactivos y se separaron por cromatografía en capa fina, usando como controles lacasa, índigo y ABTS^{I+}

4.7.2 Cálculo de la concentración de índigo y ABTS^{I+} durante la reacción de oxidación del índigo

El ABTS^{I+} tiene máximos de absorción a $\lambda=394$ nm, $\lambda=414$ nm, $\lambda=646$ nm y $\lambda=728$ nm (según el estudio espectro-electroquímico) y el azul índigo a 610 nm; por lo que hay interferencia en la absorbancia de ambos compuestos a 610 nm, por lo que fue necesario entonces resolver el sistema de ecuaciones siguiente para calcular en cada momento la cantidad de azul índigo y de ABTS^{I+} presente.

$$A_{414} = \varepsilon_{414}^A C_A + \varepsilon_{414}^I C_I \dots\dots\dots (1)$$

$$A_{610} = \varepsilon_{610}^A C_A + \varepsilon_{610}^I C_I \dots\dots\dots (2)$$

Donde C_A es [ABTS^{I+}], C_I es [Índigo] y el coeficiente de extinción molar ε_{λ}^J ($J = A$ para ABTS^{I+} · I para azul índigo).

Los valores de C_A y C_I se calcularon usando la fórmula convencional de álgebra de matrices $C = \varepsilon^{-1}A$

Donde C es el vector columna de incógnitas, ε^{-1} , la matriz inversa de ε , y A el vector columna de absorbancia.

Los ε_{λ}^J calculados para el ABTS^{I+} y el índigo se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Coeficientes de extinción molar calculados para el ABTS^{I+} (ϵ^A) a 414 y 620 nm y para el azul índigo (ϵ^I) a 414 y 620 nm

$\epsilon^A_{414} = 36.06 \pm 0.73 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\epsilon^I_{414} = 1.22 \pm 4 \times 10^{-4} \text{ mM}^{-1}$
$\epsilon^A_{610} = 9.78 \pm 0.42 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\epsilon^I_{610} = 20.42 \pm 0.61 \text{ mM}^{-1}$

4.7.3. Relación estequiométrica de la reacción entre el ABTS^{I+} y el índigo

Para determinar la relación estequiométrica de la reacción entre el índigo y el ABTS^{I+} libre de enzima, en la celda de cuarzo del espectrofotómetro conteniendo 2 mL de solución de ABTS^{I+} 43.7 μM se le adicionaron alícuotas de 0.03 mL de azul índigo 50 μM . Se obtuvieron los espectros espectrofotómetro UV-visible a 4 minutos de cada adición de índigo. Se midieron los cambios de absorbancia a 414 y 610 nm y se graficaron contra la cantidad de índigo adicionada para encontrar el punto de titulación y cuantificar la cantidad de azul índigo necesaria para reaccionar con todo el ABTS^{I+}.

4.7.4 Cinética

Se realizó el ajuste de la reacción entre el ABTS^{I+} y el índigo al modelo cinético de pseudo primer orden, manteniendo el ABTS^{I+} constante (0.05 mM) y el índigo se varió en 0.02, 0.013, 0.01, 0.008, 0.0075 y 0.005 mM.

Se calcularon las velocidades de reacción de 200 nmoles de índigo en cada uno de los siguientes sistemas:

- Con 2 nmoles de ABTS^{I+}
- Con 4 U de lacasa
- Con 2 nmoles de ABTS^{I+} y 4 U de lacasa.

4.7.5. *Reciclamiento del ABTS con lacasa y azul índigo*

Para determinar si el ABTS oxidado por la lacasa se recicla entre el azul índigo y la enzima lacasa, se hizo el siguiente experimento: dentro de una celda de cuarzo del espectrofotómetro se colocaron 2 mL de solución conteniendo 2.5 nmoles de ABTS y 4 unidades de lacasa libre; se le fueron haciendo adiciones cada 3 minutos de 200 nmoles de azul índigo, el proceso se repitió 10 veces. Cada minuto se midieron los cambios de absorbancia a $\lambda=414$ y $\lambda=610$ nm. Con el sistema de ecuaciones anteriormente descrito se calcularon las cantidades de ambos reactivos presentes en la mezcla de reacción después de cada adición de índigo.

4.8 Decoloración de índigo en mezclilla usando lacasa y ABTS

Para verificar que la reacción de decoloración del índigo usando lacasa y ABTS se puede efectuar directamente sobre la tela teñida con índigo, se prepararon tres series de siete trozos de 8 x 8 cm de mezclilla comercial y se sometieron por triplicado a los siguientes tratamientos:

La serie 1 a 40 μ moles de ABTS, la serie 2 a 40 U de lacasa y la serie 3 a 40 μ moles de ABTS y 40 U de lacasa, en los tres casos el volumen final se ajustó con agua destilada a 200 mL. Se sacó un trozo de tela de cada tratamiento a los siguientes tiempos 2, 6, 12, 20, 30, 36 y 48 horas, se lavó con agua destilada y se dejó secar.

4.8.1 Análisis colorimétrico

La decoloración de cada trozo de tela se midió con un colorímetro Hunter Lab D25-PC2. Según la escala de Musell: el parámetro Ligthness "L" indica, en una escala de 0 a 100, que tan blanca es la muestra, donde 0 corresponde a negro y 100 a blanco. El parámetro Hue "H" indica el color propio de la sustancia considerando un círculo

dividido en 100 colores, y el parámetro Chroma "C" indica la opacidad que presenta la tonalidad del color.

Los parámetros leídos "lightness", "chroma" y "hue" se graficaron contra tiempo para cada una de las series de trozos de mezclilla, para cuantificar la decoloración.

4.8.2 Biodegradabilidad del agua residual

Al agua de desecho de la decoloración de mezclilla usando lacasa y ABTS se le realizó una prueba de biodegradabilidad con lodos activados midiendo la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO), comparando contra una solución de índigo (con la misma DQO inicial que el agua de desecho de 1000 mg/L) y con una solución de lacasa-ABTS como sigue:

Un frasco de inhibidor de nitrificación y uno de POLYSEED (de Hach) se adicionaron con 500 mL de agua, la mezcla se ajustó a 18 -22 °C, pH 6-8 y se airearon por 1 hora. En una botella Hach se preparó la siguiente mezcla: 14.4 mL de muestra, 145.6 mL de agua aireada con inhibidor y POLYSEED y una botella de nutriente en amortiguador de pH (de Hach). El blanco se preparó de forma similar pero usando agua en lugar de muestra. Hidróxido de litio fue usado como trampa de CO₂ y las botellas se sellaron con silicón. La reacción se dejó por 5 días a 20 °C controlando la temperatura con una incubadora Lab Line AMBI HO-LO. Se leyó todos los días la cantidad de oxígeno disuelto para calcular la DBO con la ecuación:

$$\text{DBO muestra} = [\text{DBO medido} - (0.1 \times \text{DBO blanco})] / 0.9 \dots \dots \dots (2)$$

El mismo procedimiento se siguió con una solución de indigo y una mezcla de ABTS y lacasa a las mismas concentraciones usadas en el experimento anterior.

4.8.3. *Metanogénesis*

Para determinar si el agua de decoloración de mezclilla usando lacasa y ABTS es biodegradable en condiciones anaeróbicas, se trató: (a) una muestra de agua de decoloración, (b) una solución de índigo, (c) una solución de acetato de sodio (como control positivo ya que la biomasa floculada consume este reactivo casi en su totalidad), (d) una solución de lacasa y (e) una solución de ABTS. Todas las soluciones se ajustaron a una DQO inicial de 1000mg/L y se trataron anaeróbicamente usando biomasa floculada.

Las pruebas de actividad metanogénica se llevaron a cabo en botellas serológicas de 60 mL con un volumen de medio de 40 mL. Las botellas se inocularon con la biomasa floculada a una concentración de 2 gSSV/L. Las botellas se sellaron y se les intercambia la atmósfera con una mezcla de nitrógeno: CO₂ (80:20) por tres minutos, posteriormente se incubaron a 35 °C.. El medio mineral se preparó mezclando los siguientes reactivos (g/L): 0.703 g NaH₂PO₄·H₂O, 0.6 g K₂HPO₄, 0.28 g NH₄Cl, 0.111 g MgSO₄·7H₂O, 0.006 g CaCl₂·2H₂O, 0.02 g extracto de levadura 1 mL de solución de elementos traza. Donde la solución de elementos traza se preparó mezclando (g/L) 2 g FeCl₂·4H₂O, 0.5 g MnCl₂, 500 g resarzurina, 0.5 g EDTA, 0.1 g Na₂SeO₃, 0.05 g H₃BO₃, 0.05 g ZnCl₂, 0.05 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 0.05 g AlCl₃, 0.05 g NiCl₂·6H₂O, 0.05 g CaCl₂·2H₂O, 0.05 g CuCl₂·2H₂O y 1 mL HCl. El metano se determinó por el volumen desplazado de una solución de NaOH al 3%, durante 72 horas.

Después de 72 horas, se midió la DQO a todas las muestras: (a) agua de decoloración, (b) solución de índigo, (c) solución de acetato de sodio, (d) solución de lacasa y (e) solución de ABTS, para calcular el % de materia orgánica consumida en el tratamiento anaerobio. La DQO se mide oxidando químicamente la materia orgánica contenida en la solución problema, mediante la adición de H₂SO₄ y K₂Cr₂O₇ usando Ag₂SO₄ como catalizador. La mezcla se hace reaccionar por 2 horas a ebullición y finalmente se calcula la cantidad remanente de K₂Cr₂O₇ espectrofotométricamente con el cambio de absorbancia, que es proporcional a la cantidad de materia orgánica.

En la tabla 3 se presentan las condiciones usadas en la metanogénesis

Tabla 3. Composición en las botellas serológicas para realizar la cuantificación de la producción de metano.

Volumen de medio (mL)	40
gDQO/L	1
gDQO en botella	0.04
Metano teorico (mL)	13.6
gSSV/L	2
gSSV en botella	0.08
gDQO/gSSV	0.5
Carateristicas del lodo	
Lodo (gSSV/L)	24
Lodo (mL) en botella	3.5

4.9 Reacción de oxidación del ABTS¹⁺ con otros sustratos

Se prepararon mezclas equi-molares de ABTS¹⁺ libre de enzima, con diferentes compuestos, para determinar si el ABTS¹⁺ puede actuar como un agente oxidante, sin requerir la presencia de la lacasa. Los compuestos probados fueron: *p*-cresol, Sudán II, azobenceno, azul brillante G, *p*-cloroanilina, fenilazo anilina, naranja 7, azul remazol, rojo Congo, ácido tánico, ácido gálico y amino azo tolueno.

Las mezclas equi-molares se colocaron en una placa del lector de Elisa y se midió el cambio de absorbancia a 414 nm cada 5 minutos y durante 30 minutos para calcular la velocidad inicial de oxidación. Se eligieron dos compuestos para estudiarlos más ampliamente: el Sudán II, debido a que este colorante es no polar y por lo tanto insoluble en agua, la experimentación con este colorante permitirá realizar sistema de reacción en dos fases, el colorante en la orgánica y la lacasa y el ABTS en la acuosa y el *p*-cresol, como modelo de compuestos fenólicos que también hay reportes de su alta toxicidad e incidencia en el medio ambiente como desecho industrial.

4.10 Reacción entre el ABTS¹⁺ y el Sudán II

El Sudán II es un colorante usado en biología para hacer tinciones de tejidos con materiales grasos. Este compuesto es muy poco soluble en agua y muy soluble en etanol y hexano, mientras que el ABTS y la lacasa son hidrosolubles. Este colorante se usó como modelo para determinar si el sistema ABTS-lacasa se puede usar también con compuestos no polares, como es el caso del Sudán II.

4.10.1 Variación de coeficientes de partición

Para aumentar la cantidad de Sudán II disuelto en la fase acuosa y que pueda reaccionar con el ABTS¹⁺ y la lacasa se varió el coeficiente de partición del Sudán II mediante la adición de diferentes cantidades de co-solvente, para ello se prepararon 4 series con 9 tubos cada una. A cada tubo se les agregaron 3 mL de Sudán II disuelto en hexano posteriormente a cada tubo se le adicionaron 3 mL de solución disolvente-agua, como se indica en la tabla 4. Se registraron los cambios visuales para determinar cuál fue el mejor co-solvente que permitió que se aumente la cantidad de Sudán II en la fase acuosa.

Tabla 4. Composición de las 4 series de tubos conteniendo 3 mL de Sudán II disuelto en hexano y 3 mL de disolvente-agua.

Tubo	Serie 1 % Etanol	Serie 2 % Metanol	Serie 3 % Acetonitrilo	Serie 4 % Butanol
1	0	0	0	0
2	12.5	12.5	12.5	12.5
3	25.0	25.0	25.0	25.0
4	37.5	37.5	37.5	37.5
5	50.0	50.0	50.0	50.0
6	62.5	62.5	62.5	62.5
7	75.0	75.0	75.0	75.0
8	87.5	87.5	87.5	87.5
9	100	100	100	100

4.10.2 Cinética

Se prepararon por separado mezclas de ABTS^{I+} libre de enzima y de Sudán II, a las siguientes concentraciones: 0.008, 0.015, 0.030, 0.050 y 0.100 µg/mL y se fueron mezclando una a una todas las soluciones de ABTS^{I+} con todas las de Sudán II, directamente en una placa del lector de Elisa y completando con agua destilada al volumen final de 200 µL. La temperatura se controló a 25 °C.

Se leyeron cambios de absorbancia a $\lambda=414$ nm (ABTS^{I+}) y $\lambda=498$ nm (Sudán II oxidado) para calcular las velocidades iniciales de reacción y establecer el modelo cinético de reacción entre el ABTS^{I+} y el Sudán II, en tres esquemas de reacción:

a) Sudán II disuelto en etanol y ABTS^{I+} con la enzima inmovilizada, pero sin enzima en el medio de reacción.

b) Sudán II, lacasa y ABTS, pero adicionando porcentajes menores del 35 % de etanol. En este punto la actividad de la lacasa es prácticamente la misma que sin etanol y el Sudán II se distribuyó en ambas fases.

c) En un sistema de dos fases: el Sudán II disuelto en hexano y la lacasa y ABTS en la fase acuosa.

4.10.3 Cromatografía en placa fina

Se usó la cromatografía en capa fina con dos objetivos:

1. Corroborar que el Sudán II reaccionó con el ABTS^{I+} y
2. Separar productos de reacción para identificarlos.

La cromatografía en capa fina se hizo con los reactivos y diferentes controles:

- | | |
|------------------------------------|-----------------------|
| a) Lacasa | e) Sudán |
| b) Sudán II con lacasa | f) ABTS ^{I+} |
| c) Sudán II con ABTS reducido | g) ABTS reducido |
| d) Sudán II con ABTS ^{I+} | |

Se hicieron pruebas con diferentes eluyentes: etanol, butanol, metanol, agua, hexano, benceno, tolueno, usando los disolventes puros y las mezclas binarias y ternarias, en diferentes proporciones.

Los experimentos se hicieron de la siguiente forma: se aplicaron los compuestos en la placa de sílica de 10 x 20 cm. Se colocó el eluyente en la cámara de cromatografía. Se dejó tapada la cámara por 30 minutos para que se saturara con el eluyente a evaluar. Posteriormente, se introdujo la placa y se realizó la cromatografía hasta que ya no se observó cambio. La placa se extrajo de la cámara y se dejó secar en la campana de extracción.

Sólo un componente del Sudán II reaccionó con el ABTS¹⁺. Este componente se raspó de la placa de cromatografía y se disolvió en etanol para separarlo de la sílica. Posteriormente, se concentró y se puso en una nueva placa de cromatografía y se separó otra vez por cromatografía en capa fina con diferentes disolventes para intentar purificarlo. La mancha principal se volvió a raspar, disolver, concentrar y separar en otra placa de cromatografía; éste proceso se repitió 4 veces.

4.10.4 Cromatografía de gases y espectroscopia de masas.

El Sudán II disuelto en etanol se inyectó en el cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 Series II Plus acoplado a un espectrofotómetro de masas Hewlett Packard 5932 Series Mass Selective Detector usando una columna Hewlett Packard HP-5MS. Se probaron varias rampas de temperatura hasta obtener un pico definido que identificara al compuesto en la biblioteca del equipo como el Sudán II.

El componente del Sudán II que reaccionó con el ABTS¹⁺ también se inyectó en el cromatógrafo de gases usando las mismas condiciones con que se identificó el Sudán II y posteriormente se probaron otras rampas de temperatura intentando obtener un pico nítido que se pudiera identificar.

4.11 Reacción entre el ABTS¹⁺ libre de enzima y el *p*-cresol

4.11.1 Comprobación de la reacción entre ABTS¹⁺ y *p*-cresol

Se usó la cromatografía en capa fina con la mezcla de reacción del *p*-cresol y el ABTS¹⁺ para:

- Corroborar que el *p*-cresol reaccionó con el ABTS¹⁺ y
- Separar productos de reacción para identificarlos.

La cromatografía en capa fina se hizo con los reactivos y los siguientes controles:

- a) Lacasa
- b) *p*-cresol
- c) *p*-cresol más ABTS¹⁺
- d) *p*-cresol más ABTS reducido
- e) ABTS¹⁺

Se hicieron pruebas de separación con diferentes eluyentes: etanol, butanol, metanol, agua, usando los disolventes puros y mezclas de ellos binarias y ternarias, en diferentes proporciones. Los experimentos se hicieron según lo descrito en 4.10.3.

4.11.2 Producto de reacción del *p*-cresol oxidado con ABTS.

El compuesto identificado como producto de oxidación del *p*-cresol usando ABTS¹⁺ libre de enzima, se obtuvo en forma pura raspándolo de la placa de sílica y posteriormente se separó de ésta disolviéndolo en acetato de etilo. La solución se filtró con papel filtro y se dejó evaporar en un desecador para eliminar el solvente y dejar únicamente el producto de reacción.

El producto de reacción se disolvió en etanol y se inyectó en el cromatógrafo de gases usando la misma rampa de temperatura con que se identificó el Sudán II y posteriormente se probaron otras rampas, hasta que se obtuvo un pico nítido.

4.11.3 Estequiometría de la reacción entre *p*-cresol y ABTS¹⁺

Se prepararon mezclas de *p*-cresol con 10 % de etanol y ABTS¹⁺ en agua, en las proporciones molares indicadas en la tabla 5.

Tabla 5. Relaciones molares de *p*-cresol : ABTS¹⁺ usadas para determinar la estequiometría de la reacción

<i>p</i> -cresol	ABTS ¹⁺
4	1
2	1
1	1
1	2
1	4

Las mezclas se dejaron reaccionar a temperatura ambiente durante 24 horas y se analizaron para observar el consumo de reactivos y determinar la relación estequiométrica de la reacción. Los análisis se hicieron con el espectrofotómetro UV-visible en el intervalo de 230 a 630 nm e inyectando las mezclas finales en el cromatógrafo de líquidos Hewlett Packard usando una columna Bond-Clone C-18, a las siguientes condiciones:

Eluyente: Acetonitrilo agua en relación 30:70

Flujo: 1.5 mL/min

Temperatura 40 °C

Longitud de onda 254 nm

Bajo estas condiciones el tiempo de retención del *p*-cresol fue de 2.8 minutos y el del ABTS 1.1 minutos. Las concentraciones de *p*-cresol y ABTS remanente se calcularon usando curvas de calibración.

4.11.4 Cinética

Se prepararon mezclas de ABTS¹⁺ libre de enzima y *p*-cresol a diferentes concentraciones, ver tabla 6 para determinar la cinética de la reacción.

Tabla 6. Concentraciones de p-cresol y ABTS¹⁺ usadas para determinar la cinética de la reacción

<i>p</i> -cresol (mM)	ABTS (mM)
0.00075	0.001
0.003	0.003
0.0075	0.0056
0.015	0.032
0.03	0.041
0.15	-----

Se hizo reaccionar cada nivel de concentración de *p*-cresol con todas las correspondientes de ABTS¹⁺, controlando la temperatura a 25 °C.

Se midieron, para cada caso los cambios de absorbancia a 414 nm (ABTS¹⁺) y a 557 nm (*p*-cresol oxidado), cada 5 segundos y durante 1 minuto. Se probó el ajuste de los resultados obtenidos a modelos cinéticos de orden cero, de primer orden y segundo orden.

Finalmente se comparó la velocidad de oxidación del *p*-cresol con el ABTS¹⁺ en ausencia y presencia de 4 U de lacasa, midiendo los cambios de absorbancia a 557 nm (*p*-cresol oxidado).

4.12 Reacción entre el ABTS¹⁺ y otros compuestos

Los demás compuestos indicados en la sección 4.9 (azobenceno, azul brillante G, *p*-cloroanilina, fenilazoanilina, naranja 7, azul remazol, rojo Congo, ácido tánico, ácido gálico y aminoazotolueno), se mezclaron equimolarmente con el ABTS¹⁺. Las mezclas se incubaron a 25 °C y después de 2 horas se determinó su espectro espectrofotométrico UV-visible al ABTS¹⁺, a cada uno de los compuestos analizados y a la mezcla de reacción de cada compuesto con el ABTS¹⁺, para determinar si hubo o no reacción química.

4.12.1 Reciclamiento del ABTS entre la lacasa y diferentes sustratos

Se calcularon las velocidades de oxidación de: *p*-cresol, azul índigo, azul brillante G y naranja 7 usando los sistemas:

- a) 200 nmoles del compuesto con 2 nmoles de ABTS¹⁺
- b) 200 nmoles del compuesto con 4 U de lacasa
- c) 200 nmoles del compuesto con 2 nmoles de ABTS y 4 U de lacasa.

Se calcularon las velocidades iniciales de reacción en cada uno de los sistemas midiendo los cambios de absorbancia con el tiempo a la longitud de onda de máxima absorción para cada sustrato.

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Caracterización de la enzima

5.1.1 Caracterización de la lacasa

Se calculó, por Kendall, que el producto comercial Deni Lite II S contenía aproximadamente 2 g de lacasa por cada 100 g de producto sólido. El contenido de proteína de la lacasa purificada fue de 3.15 mg/mL, medido por Kendall.

La lacasa purificada y disuelta en amortiguador buffer 0.1 M a pH 5 tuvo una actividad de 10.2 U/mL, usando ABTS como sustrato a 40 °C, calculada según se indica en el apéndice 1.

Su peso molecular fue de 80 KDa (dato no publicado obtenido por López J., estudiante de doctorado del laboratorio del Dr. Viniegra).

La figura 2 muestra la curva característica del ajuste a la ecuación de Michaelis Mentel. Los parámetros cinéticos calculados del ajuste fueron: $K_M = 200 \mu\text{M}$ y $k_{\text{cat}} = 713 \text{ min}^{-1}$ para la lacasa usando ABTS como sustrato y a 40 °C. Ver cálculo de los parámetros cinéticos en el Apéndice 2.

Li et al (1998), reportan un $K_M = 96 \mu\text{M}$ y $k_{\text{cat}} = 440 \text{ min}^{-1}$ para la lacasa de *Myceliophthora thermophila* a 20 °C. La diferencia con los valores calculados es debido a la temperatura, ya que la velocidad de reacción incrementa con el aumento en la temperatura.

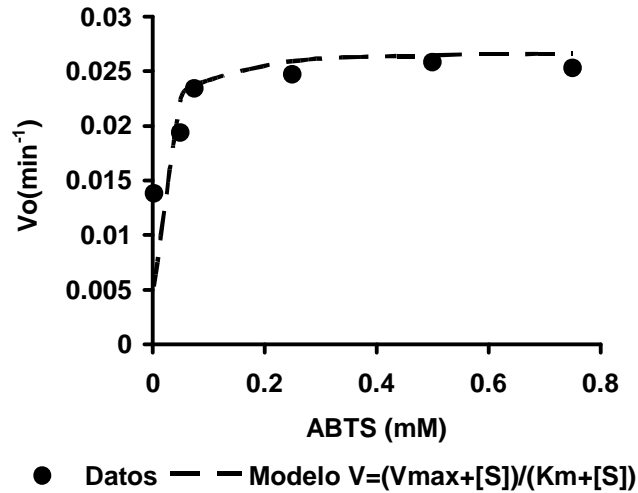


Figura 2. Ajuste al modelo de Michaelis Mentel $V=V_{max}[S]/(K_m + [S])$ para la lacasa usando ABTS como sustrato a 40°C.

5.1.2. Efecto de disolventes sobre la actividad enzimática.

La figura 3 ilustra el efecto del etanol y acetonitrilo sobre la actividad de la lacasa, medidos a 25 °C con ABTS como sustrato. Se observó experimentalmente que adicionando pequeñas cantidades de etanol (menos del 30 %) la actividad de la lacasa aumentó respecto a la determinada sin adicionar disolventes. Cuando se adicionó un 10 % de etanol se observó el máximo incremento en actividad, que fue de 21% más, respecto a la actividad calculada sin la adición de disolventes. Este fenómeno se explica porque el etanol puede formar puentes de hidrógeno con el sitio activo de la enzima, favoreciendo la reacción con el ABTS.

Con la adición de acetonitrilo, en todas las proporciones usadas, la actividad de la lacasa disminuyó, ver figura 3, por ejemplo para una adición del 10 % de acetonitrilo la actividad enzimática calculada fue del 50 % de la actividad calculada sin la adición de disolventes. El acetonitrilo no formó puentes de hidrógeno que favoreciera la reacción entre el sitio activo y el ABTS, además de que pudo desnaturizar a la lacasa, de allí la disminución en la actividad.

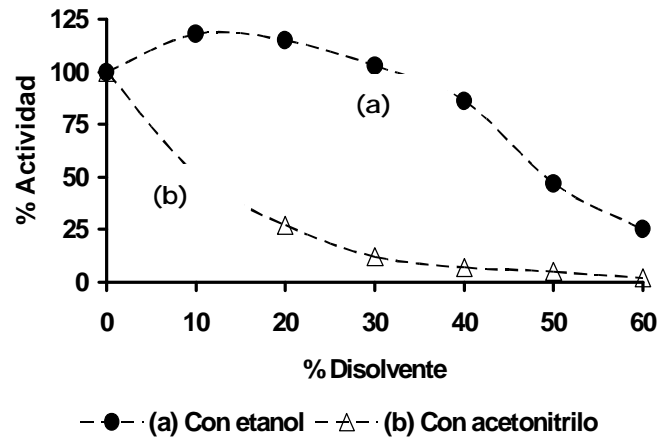


Figura 3. Efecto de la adición de (a) etanol (n) y (b) acetonitrilo (\hat{e}) sobre la actividad de la lacasa usando ABTS como sustrato a 25 °C.

5.2 Sistemas de inmovilización.

Con los dos sistemas de inmovilización descritos en la sección de Materiales y Desarrollo Experimental se logró inmovilizar la lacasa. El sistema uno, cuyo soporte fue arena de sílica gel dió muy buena actividad, ya que en poco tiempo se obtuvo $ABTS^{1+}$ el problema que se presentó fue que el $ABTS^{1+}$ se quedó adsorbido en la sílica y fue difícil separarlo; por lo que este soporte no se caracterizó más. El mejor sistema fue el número dos, el descrito por Villaseñor (2004), cuyo soporte fue de cristales de sílica. En éstos el $ABTS^{1+}$ no se adsorbió, por lo que al filtrarlo con papel se pudo separar de la enzima. El $ABTS^{1+}$ libre de enzima que se empleó en todos los experimentos se obtuvo con éste sistema de inmovilización.

5.3 Estudio electroquímico del ABTS oxidado

Al reaccionar el ABTS con la lacasa pudo seguir una de las siguientes reacciones:



Para determinar qué reacción se efectuó entre el ABTS y la lacasa inmovilizada, se realizó el estudio electroquímico del ABTS y de la solución de ABTS previamente oxidado por la lacasa inmovilizada.

5.3.1 Caracterización electroquímica de ABTS

En la figura 4 se muestran los voltamperogramas del ABTS 0.2 mM, sin la enzima lacasa, a 100 mV/s. El barrido de potencial se inició en el potencial de corriente nula $E_{i=0}$ y en las direcciones negativa (figura 4a) y positiva (figura 4b).

El potencial de corriente nulo ($E_{i=0}$) fue 0.3 V, es decir en este potencial el ABTS está en su estado reducido. La figura 4a muestra el barrido de potencial en la dirección negativa, es decir, hacia el sentido de los procesos de reducción; como la solución de trabajo es el ABTS en su estado reducido, no se observó señal alguna indicando una reacción electroquímica de reducción, debido a que no hay ninguna especie que pueda sufrir este proceso.

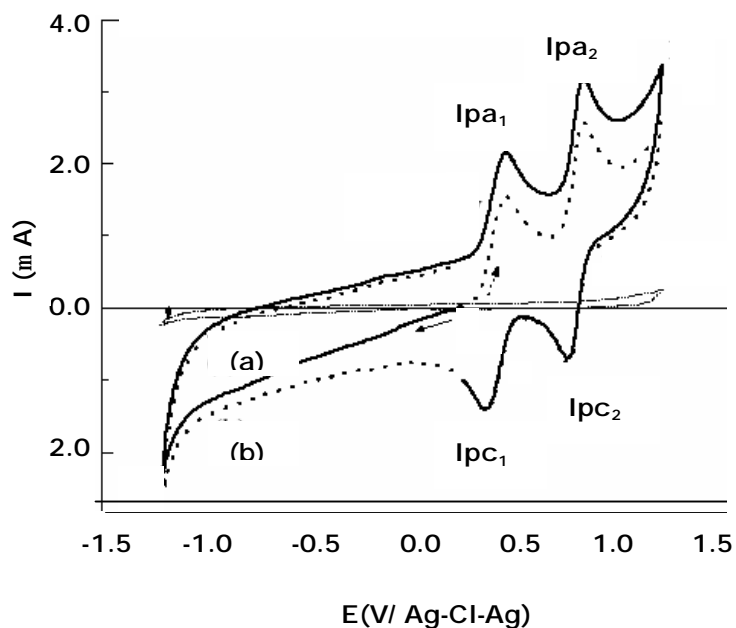


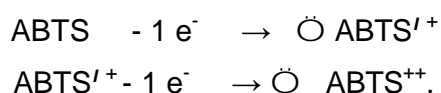
Figura 4. Voltamperogramas del ABTS oxidado electroquímicamente. Iniciando el barrido de potencial en $E_{i=0}$ y en las direcciones (a) negativa y (b) positiva

Cuando el barrido de potencial llegó a -1.4 V, se invirtió, observándose ahora los procesos correspondientes a oxidaciones electroquímicas: se observaron dos señales, la primera señal correspondió al proceso de oxidación de $ABTS \rightarrow ABTS'^+$ y la segunda al de $ABTS'^+ \rightarrow ABTS^{++}$; corroborando que el ABTS tiene los dos estados de oxidación que se muestran en la figura 1. Las señales de oxidación del ABTS (I_{pa1} e I_{pa2}) ocurrieron en los potenciales $E_{pa1} = 0.527$ y $E_{pa2} = 0.913$ V respectivamente, ver figura 4a. Cuando el potencial se invirtió se observaron ahora los procesos de reducción correspondientes a $ABTS^{++} \rightarrow ABTS'^+$ y $ABTS'^+ \rightarrow ABTS$, ocurridas a valores de potencial de 0.816 y 0.419 V (I_{pc2} e I_{pc1}) respectivamente.

En el barrido de potencial iniciado en la dirección positiva, figura 4b se observaron dos señales que corresponden a las oxidaciones del ABTS: de ABTS a $ABTS'^+$ y la segunda al de $ABTS'^+$ a $ABTS^{++}$, que coincidieron con los procesos de oxidación descritos anteriormente.

Cuando la dirección de potencial cambió, se observaron las correspondientes señales de reducción la primera señal fue la reducción de $ABTS^{++}$ a $ABTS'^{+}$ y la segunda señal la reducción de $ABTS'^{+}$ a $ABTS$ coincidiendo con lo arriba descrito.

En resumen, en la figura 4 se muestra que en la interfase del electrodo ocurrieron, en ambas direcciones, dos procesos reversibles monoelectrónicos. La diferencia entre los picos de potencial anódico y catódico de cada proceso 99 y 88 mV, respectivamente, confirman la quasi transferencia monoeléctrica asociada a ambos procesos:



El $E_{1/2} = 0.469$ V/Ag-AgCl correspondió al sistema $ABTS/ABTS'^{+}$ y el segundo $E_{1/2} = 0.87$ V/Ag-AgCl fue asignado al sistema $ABTS'^{+}/ABTS^{++}$, lo cual coincide con lo reportado por Bourbonnais et al (1998). Los potenciales de onda media se calcularon como $E_{1/2} = (E_{pa} + E_{pc})/2$.

:

5.3.2 Caracterización electroquímica de la solución obtenida al oxidar al ABTS con la lacasa inmovilizada

Para determinar si el ABTS oxidado con la lacasa inmovilizada correspondió al estado monocatión $ABTS'^{+}$, al dicatión $ABTS^{++}$ o a una mezcla de ambos, se hizo un estudio electroquímico a condiciones similares al descrito en la sección anterior, usando ahora la solución resultante de haber oxidado previamente al ABTS en presencia de la lacasa inmovilizada.

La figura 5 muestra los voltamperogramas de la solución de ABTS resultante al oxidarlo previamente con la lacasa inmovilizada.

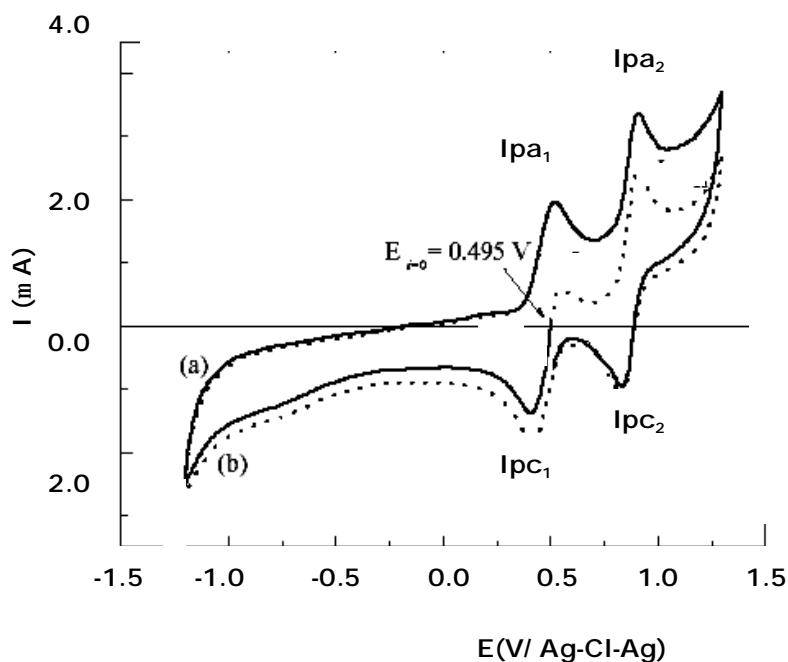


Figura 5. Voltamperogramas de la solución de ABTS oxidada previamente con la lacasa inmovilizada. Iniciando el barrido de potencial en $E_{i=0}$ y en las direcciones (a) negativa y (b) positiva

El potencial de corriente nulo para la solución obtenida al oxidar previamente al ABTS con la lacasa inmovilizada, fue $E_{i=0}=0.495$ V; mientras que para la solución fresca de ABTS, el $E_{i=0}=0.3$ V, lo cual indica entonces que en la solución de ABTS previamente oxidada por la lacasa inmovilizada había ABTS monocatión ya que el $E_{i=0}=0.495$ V para la solución de ABTS previamente oxidada con lacasa se encuentra muy cercano al potencial de onda media $E_{1/2} = 0.469$ V/Ag-AgCl determinado para el sistema $ABTS/ABTS^{I+}$. Con la lacasa inmovilizada sólo se obtuvo el ABTS monocatión, no se formó el ABTS dicatión, ya que si hubiera ocurrido la oxidación completa del ABTS con la lacasa inmovilizada, el valor de $E_{i=0}$ hubiera sido muy cercano al valor $E_{1/2} = 0.87$ V/Ag-AgCl determinado para el sistema $ABTS^{I+}/ABTS^{++}$.

La figura 5a describe el barrido de potencial de la solución de ABTS obtenida al oxidarlo previamente con la lacasa inmovilizada. Iniciando en $E_{i=0}$ y en la dirección negativa, se observó una señal de reducción a $E_{pc1}=0.414$ V; esta señal correspondió al proceso de reducción de $ABTS^{I+}$ a ABTS, confirmando que en la solución inicial había $ABTS^{I+}$. Las posteriores señales de oxidación I_{pa1} e I_{pa2} , así como las

correspondientes a los procesos de reducción I_{pc1} e I_{pc2} concuerdan con las explicadas en las figuras 4a y 4b.

Cuando el barrido de potencial se inició en la dirección positiva se observó la señal asociada al proceso de oxidación de ABTS a $ABTS^{1+}$ descrita en las figuras 4a y 4b, lo cual indica que en la solución inicial había ABTS en su estado reducido. La posterior señal de oxidación I_{pa2} , así como las correspondientes a los procesos de reducción I_{pc1} e I_{pc2} concuerdan con las explicadas en las figuras 4a y 4b.

La lacasa al ponerse en contacto con la solución de ABTS lo oxidó parcialmente, obteniéndose una mezcla de ABTS en su estado reducido y $ABTS^{1+}$. Esto concuerda con el valor de potencial redox reportado para la lacasa de *Myceliophthora thermophila*, que es de 0.3 a 0.4 V/NHE según Xu (1996).

El ABTS reducido no reaccionó con ninguno de los compuestos estudiados y que se describen posteriormente a lo largo de la presente tesis, por lo que en todos los experimentos se usó la mezcla de $ABTS/ABTS^{1+}$ obtenida con la lacasa inmovilizada sin efectuar ningún proceso de separación de ambas especies.

5.4 Producción electroquímica de $ABTS^{2+}$ y $ABTS^{1+}$

Como la lacasa de *Myceliophthora thermophila* no tuvo el potencial redox necesario para oxidar al ABTS hasta el dicatión éste se generó electroquímicamente, para así conocer su espectro de absorción electrónica y compararlo con las propiedades reportadas para éste dicatión.

5.4.1 Electrólisis del ABTS

Para la electrólisis de ABTS y del $ABTS^{1+}$ se usó una celdilla de cuarzo de 0.1 cm de espesor y una malla de platino como electrodo de trabajo; por lo que, a diferencia de la voltamperometría cíclica, donde los cambios ocurridos fueron únicamente en la interfase del electrodo, la electrólisis se produjo en toda la solución contenida en la celdilla.

La figura 6 muestra los cambios espectrofotométricos ocurridos durante la electrólisis de $\text{ABTS} \rightarrow \text{ABTS}^{1+}$. Al inicio, con el ABTS como única especie, se observaron dos picos: $\lambda_1=214$ nm, $\lambda_2 =340$ nm. Cuando empezó el proceso de electrólisis aparecieron y fueron creciendo 4 picos a $\lambda_3=394$, $\lambda_4 =414$, $\lambda_5=646$ y $\lambda_6=728$ nm. La absorbancia a λ_2 fue decreciendo y la correspondiente a λ_1 no sufrió cambios, por lo que se puede concluir que para realizar mediciones de absorbancia del ABTS en su estado reducido se puede realizar a 340 nm.

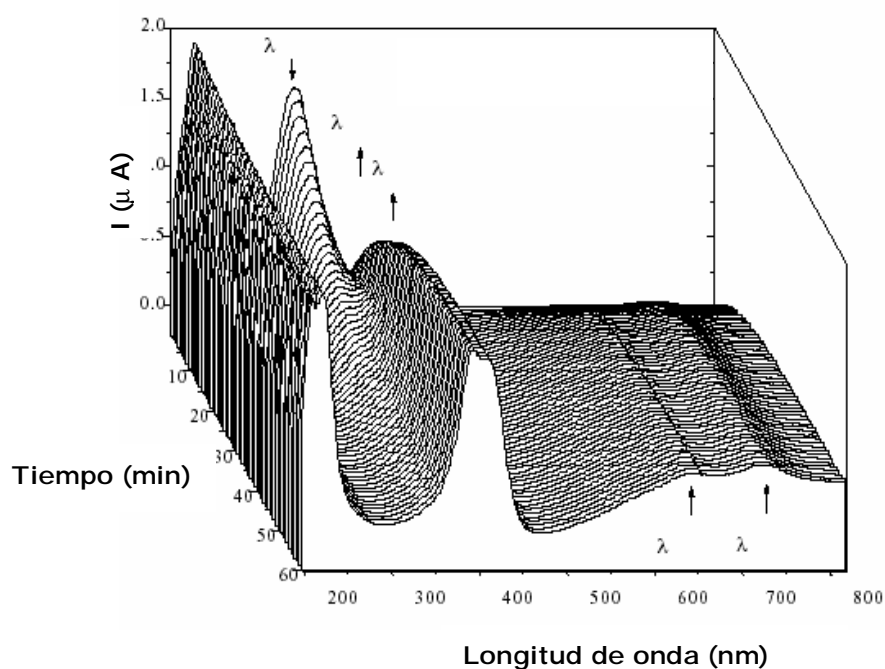


Figura 6. Espectros espectrofotométricos obtenidos in situ durante la electrólisis del ABTS a ABTS^{1+} realizada de 0.65 V a 0.7 V/Ag-AgCl, con una velocidad de barrido de potencial de 0.05 mV/s, espectros UV-Visible registrados cada 30 seg.

Como se observa en la figura 6, al irse desarrollando el proceso de electrólisis del ABTS, va disminuyendo la absorbancia a $\lambda =340$ nm e incrementando las absorbancias a $\lambda =394$ y $\lambda =414$ nm y en una parte del proceso estas señales se traslapan, según Johannes y Majcherczyk (b2000) esta interferencia se debe a la formación de un complejo entre el ABTS y el ABTS^{1+} . También se observó en la figura 6 que las absorbancias a $\lambda =646$ y $\lambda =728$ nm son específicas del ABTS monocatión y en esta

región no se traslapan dichas señales con ninguna otra. Esto indica que no es exacta la determinación de la concentración del $\text{ABTS}^{\text{I}+}$ realizada a longitudes de onda cercanas a 414 nm, sin embargo muchos valores reportados de coeficiente de extinción molar y de longitud de onda de máxima absorción del $\text{ABTS}^{\text{I}+}$ son valores muy cercanos a 414 nm, por ejemplo: Kim et al (2002) indican $\epsilon=35000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 405 nm; mientras que D'Acunzo et al (2002) proponen $\epsilon=31500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 414 nm; Gouka et al (2001) asignan un $\epsilon=35000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 414 nm; mientras que Tiller et al (1999) denotan $\epsilon=36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 414 nm; por otro lado Bourbonnais et al (1998) proponen un $\epsilon=36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 420 nm y Muñoz et al (1997), indican $\epsilon=29300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 436 nm.

La mejor longitud de onda para cuantificar al ABTS monocatión es $\lambda=728 \text{ nm}$, ya que en ésta longitud de onda no ocurre ninguna interferencia con el ABTS .

5.4.2 *Electrólisis del $\text{ABTS}^{\text{I}+}$*

Una vez completada la electrólisis del ABTS a $\text{ABTS}^{\text{I}+}$ inmediatamente se procedió a realizar la electrólisis del $\text{ABTS}^{\text{I}+}$ a ABTS^{II} , ver figura 7.

La figura 7 muestra que los picos del ABTS monocatión a 394, 414, 646 y 728 nm prácticamente desaparecieron al desarrollarse la electrólisis, lo cual corrobora que la longitud de onda de 728 nm es específica para el $\text{ABTS}^{\text{I}+}$.

Al término de la electrólisis, cuando sólo se tuvo ABTS^{II} en toda la solución contenida en la celdilla, se observaron tres picos con máximos de absorción en $\lambda=214 \text{ nm}$, $\lambda=256 \text{ nm}$ y $\lambda=298 \text{ nm}$, es decir el ABTS^{II} no absorbió en la región de luz visible, sino en la región de luz ultravioleta, contrariamente a lo reportado por Bourbonnais et al (1998) y Barreca et al (2003) quienes asignan al ABTS dicatión un color púrpura y rojo respectivamente.

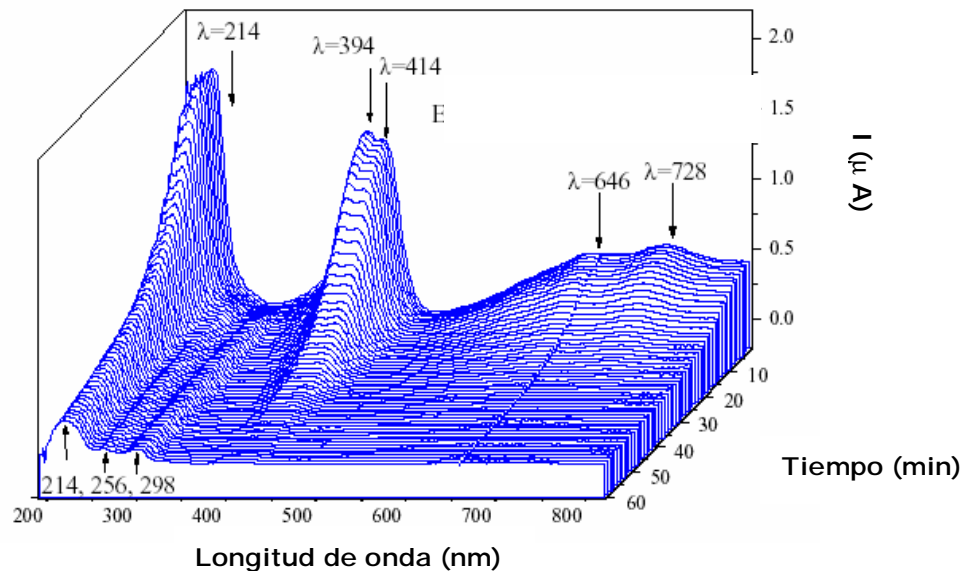


Figura 7. Espectros espectrofotométricos obtenidos in situ durante la electrolisis del $ABTS^{I+}$ a $ABTS^{II+}$ realizada de 0.65 V a 0.7 V/Ag-AgCl con una velocidad de barrido de potencial de 0.05 mV/s y espectros UV-Visible registrados cada 30 seg. La solución inicial en este caso fue la resultante de los experimentos mostrados en la figura 6.

En el caso de Bourbonnais et al (1998) su solución de trabajo fue una solución de ABTS en buffer citratos 0.05 M a pH 4 y la electrólisis se realizó con un electrodo de carbón vítreo reticular inmerso en una celda de 50 mL; el problema del electrodo reticular es que las reacciones de óxido-reducción ocurren sólo en la interfase del electrodo y los productos de la electrólisis están en contacto con el resto de la solución, por lo que no hay un control de las reacciones ocurridas. Barreca et al (2003) no dan datos de cómo obtuvieron el $ABTS^{II+}$ ni porque la afirmación de que el ión es de color rojo. En el desarrollo experimental aquí realizado se partió de una solución acuosa de ABTS; la electrólisis se realizó in situ y en todo el volumen contenido en la celdilla de cuarzo, de 0.1 cm de espesor, ya que se usó como electrodo una malla de platino, por lo que los cambios medidos y registrados corresponden completamente a la electrólisis, en el primer paso de ABTS a $ABTS^{I+}$ y en el segundo de $ABTS^{I+}$ a $ABTS^{II+}$

Al finalizar la electrólisis se observó que el $ABTS^{II+}$ inmediatamente regresó a su estado monocatión, esto se puede explicar porque el $ABTS^{II+}$ es una especie inestable muy reactiva, de allí que existen muy pocos reportes del $ABTS^{II+}$.

5.5 Estabilidad del ABTS¹⁺

La estabilidad de la solución de ABTS/ ABTS¹⁺ obtenida con la enzima inmovilizada se midió a diferentes condiciones:

a) Cambio de temperatura. La mezcla ABTS/ ABTS¹⁺ fue almacenado durante un mes a 4, 25 y 60 °C. Las cantidades remanentes del ABTS¹⁺ después de dicho periodo fueron: 95, 70 y 0 % de la cantidad inicial, respectivamente. La mezcla ABTS/ ABTS¹⁺ fue estable en refrigeración.

b) Cambios de pH. En la figura 8a se muestra el espectro de absorción de la mezcla ABTS/ ABTS¹⁺ obtenida con la lacasa inmovilizada, su pH fue de 6.3. Los máximos de absorción son $\lambda = 212$ y $\lambda = 340$ nm para el ABTS reducido y $\lambda = 394$, $\lambda = 414$, $\lambda = 646$ y $\lambda = 728$ nm para el ABTS dicatión (según lo descrito en la electrólisis del ABTS).

Al variar el pH a la mezcla de ABTS/ ABTS¹⁺ se afectó la proporción de [ABTS]/ [ABTS¹⁺], como se observa en la figura 8b. A pH 8.2 sólo se observa un pico a $\lambda = 340$ nm debido a que no hay protonación del ABTS y éste permaneció en su estado reducido. A pH 1.3 el pico mayor fue el del ABTS monocatión ($\lambda = 414$, 646 y 728 nm), ya que la oxidación del ABTS se favoreció con la acidez.

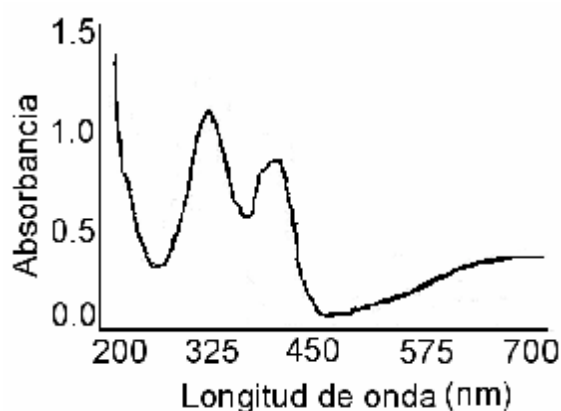


Figura 8a. Espectro de absorción de la mezcla de ABTS/ABTS¹⁺ a pH 6.5, producida con la enzima inmovilizada.

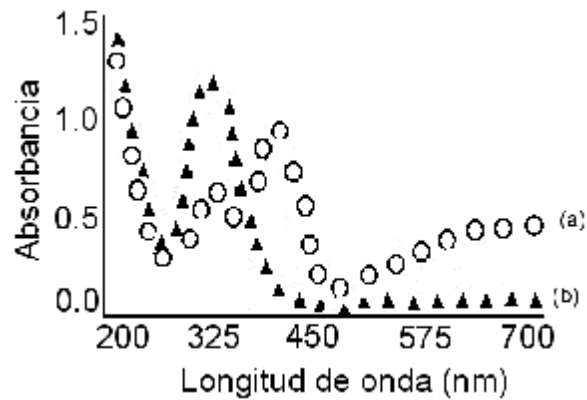


Figura 8b. Espectro de absorción de la mezcla de ABTS/ABTS'⁺ producida con la enzima inmovilizada a diferentes valores de pH (a) pH 1.3 (○), (b) pH 8.2 (▲)

c) Efecto de disolventes. La figura 9 muestra el efecto de adicionar 20 % de diferentes disolventes sobre el ABTS'⁺, este radical fue muy estable en presencia de alcoholes de bajo peso molecular y con acetonitrilo.

Este resultado es muy interesante ya que, como se mostró en la figura 3, el acetonitrilo redujo considerablemente la actividad de la lacasa, con 20 % de acetonitrilo su actividad fue del 25 %, respecto a la actividad sin disolvente; mientras que este disolvente no afectó al ABTS'⁺.

Este hallazgo permite sustentar las bases para plantear reacciones en dos etapas, la primera con enzima inmovilizada oxidar al mediador y después usar al ABTS'⁺ para oxidar a los sustratos finales, esta reacción se puede efectuar en soluciones acuosas, con alcoholes de bajo peso molecular o con acetonitrilo, a pH ácido y temperaturas ambiente o menores.

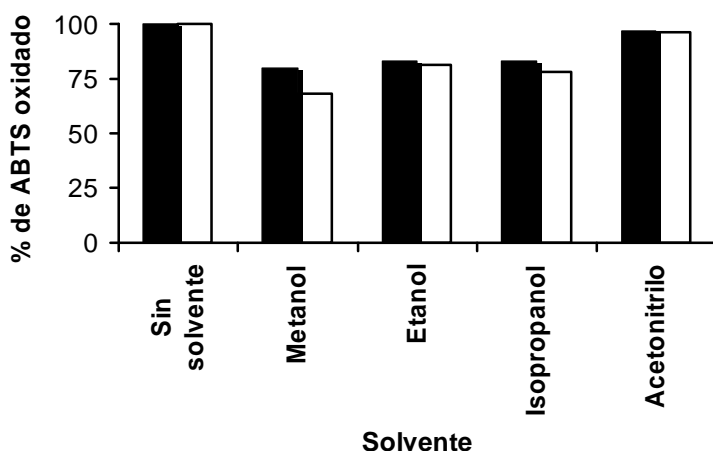


Figura 9. Estabilidad de la mezcla ABTS/ABTS^{l+} obtenida con la enzima inmovilizada, en presencia de 20 % en volumen de metanol, etanol, isopropanol y acetonitrilo. Después de 1 hora (■) y de 7 horas (□) de haberse mezclado con el disolvente a 25 °C.

5.6 Reacción entre el ABTS^{l+} y el azul índigo.

Después de caracterizar al ABTS oxidado con la lacasa inmovilizada y determinar su estabilidad a la temperatura, variación de pH y su mezclado con diferentes disolventes, se estudió con que compuestos puede reaccionar, principalmente los correspondientes a los colorantes, que están ocasionando graves daños ambientales debido a que no son biodegradables y son potencialmente tóxicos en el ambiente, como es el caso del índigo, uno de los colorantes textiles más usados.

5.6.1 Comprobación de la reacción entre el azul índigo y el ABTS^{l+}

En la cromatografía en capa fina de la figura 10, donde la fase móvil fue la mezcla 55:35:10 de agua:etanol:butanol, se observa que: La mancha "a" correspondiente a la lacasa, no muestra componentes coloridos en este sistema. La mancha "b" correspondiente al índigo mostró un color azul característico. La mancha "c" es la mezcla de reacción del ABTS^{l+} y el índigo. Aquí ya no se observaron con este sistema de disolventes, presencia de los componentes azules del índigo ya que el ABTS^{l+} reaccionó con el colorante y como resultado se obtuvo un producto incoloro, sólo se observó una mancha verde de ABTS^{l+} similar al control usado en la mancha "d".

El $ABTS^{1+}$ se pudo usar para realizar decoloraciones de soluciones que contengan índigo



Figura 10. Cromatografía en capa fina de la reacción del índigo con el $ABTS^{1+}$. La mancha "a" corresponde a la lacasa, mancha "b" al índigo, mancha "c" a la reacción de $ABTS^{1+}$ + índigo y la mancha "d" corresponde al $ABTS^{1+}$.

5.6.2 Relación estequiométrica de la reacción entre el $ABTS^{1+}$ y el índigo

En la figura 11 se muestran los espectros de absorción obtenidos de las primeras 13 adiciones de $50 \mu\text{M}$ de índigo a la celda de cuarzo conteniendo 2 mL de $ABTS^{1+}$ 43.7 mM . Se observó una disminución constante en la absorbancia a las longitudes de onda 394 , 414 , 646 y 728 nm (correspondientes al $ABTS^{1+}$) indicando que ocurre reacción con cada adición de índigo y al mismo tiempo se observó un incremento a $\lambda=340 \text{ nm}$ (absorción del $ABTS$ reducido). Estos cambios se explicaron porque el mecanismo de la reacción que se siguió fue: la lacasa sustrajo un electrón al $ABTS$ oxidándolo y formando el $ABTS^{1+}$ (se demostró en el estudio electroquímico del $ABTS$), el radical $ABTS^{*+}$ al ponerse en contacto con el índigo recuperó el electrón que perdió y regresó a su estado reducido, lo cual se confirma por la disminución en la lectura de absorbancia del $ABTS^{*+}$ y el aumento en la absorbancia del $ABTS$ reducido. Por otro lado, la pérdida de un electrón de la molécula de índigo dió como producto un

compuesto incoloro, como se observa en la figura 10. Esto continuó hasta que todo el ABTS^{*+} reaccionó con el índigo.

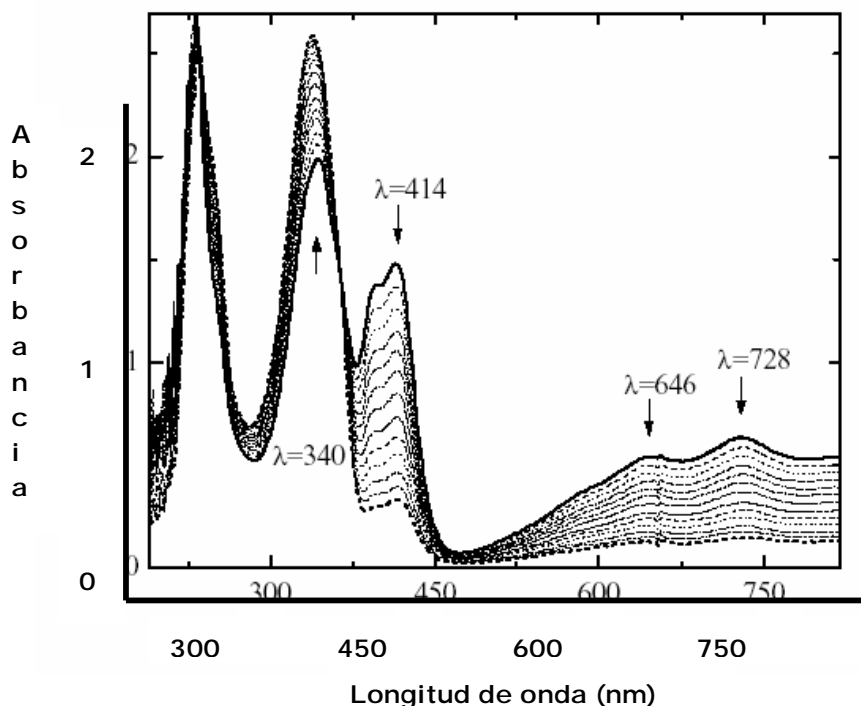


Figura 11. Barridos espectrofotométricos de las primeras 13 adiciones de 50 mM de índigo a 43.7 mM de ABTS^{*+}

En las posteriores adiciones del colorante se observó un incremento de absorbancia a 610 nm debido a la acumulación del índigo, ver figura 12, que al no haber más ABTS^{*+} ya no pudo reaccionar.

Para calcular la estequiometría de la reacción se graficaron las absorbancia a 414 y 610 nm contra la cantidad de índigo adicionada y se calculó el punto de titulación, que fue después de realizar 14.5 adiciones de 50 μM de índigo, por lo tanto, la cantidad consumida de ambos reactivos fue:

$$[\text{ABTS}^{*+}] = 2 \text{ mL} \times 43.7 \mu\text{M} = 87.4$$

$$[\text{Índigo}] = 0.03 \text{ mL} \times 14.5 \times 50 \mu\text{M} = 21.75$$

$$[\text{ABTS}^{*+}] / [\text{Índigo}] = 4.01$$

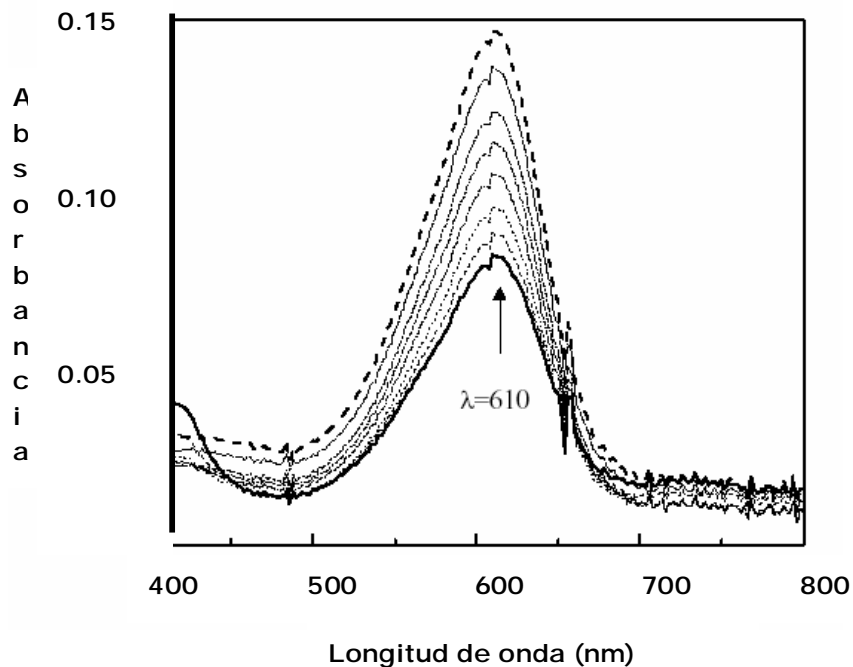


Figura 12. Barridos espectrofotométricos de las últimas 8 adiciones de 50 mM de índigo a 43.7 mM de ABTS+*

La relación estequiométrica fue de 4 moles de ABTS*+ por mol de índigo. Según el mecanismo de reacción explicado por Campos y Cavaco (2001) que se muestra en la figura 13, el ABTS*+ en ausencia de lacasa es capaz de oxidar completamente al índigo, hasta isatin. El mecanismo de oxidación de índigo según Campos y Cavaco (2001) se muestra en la figura 13.

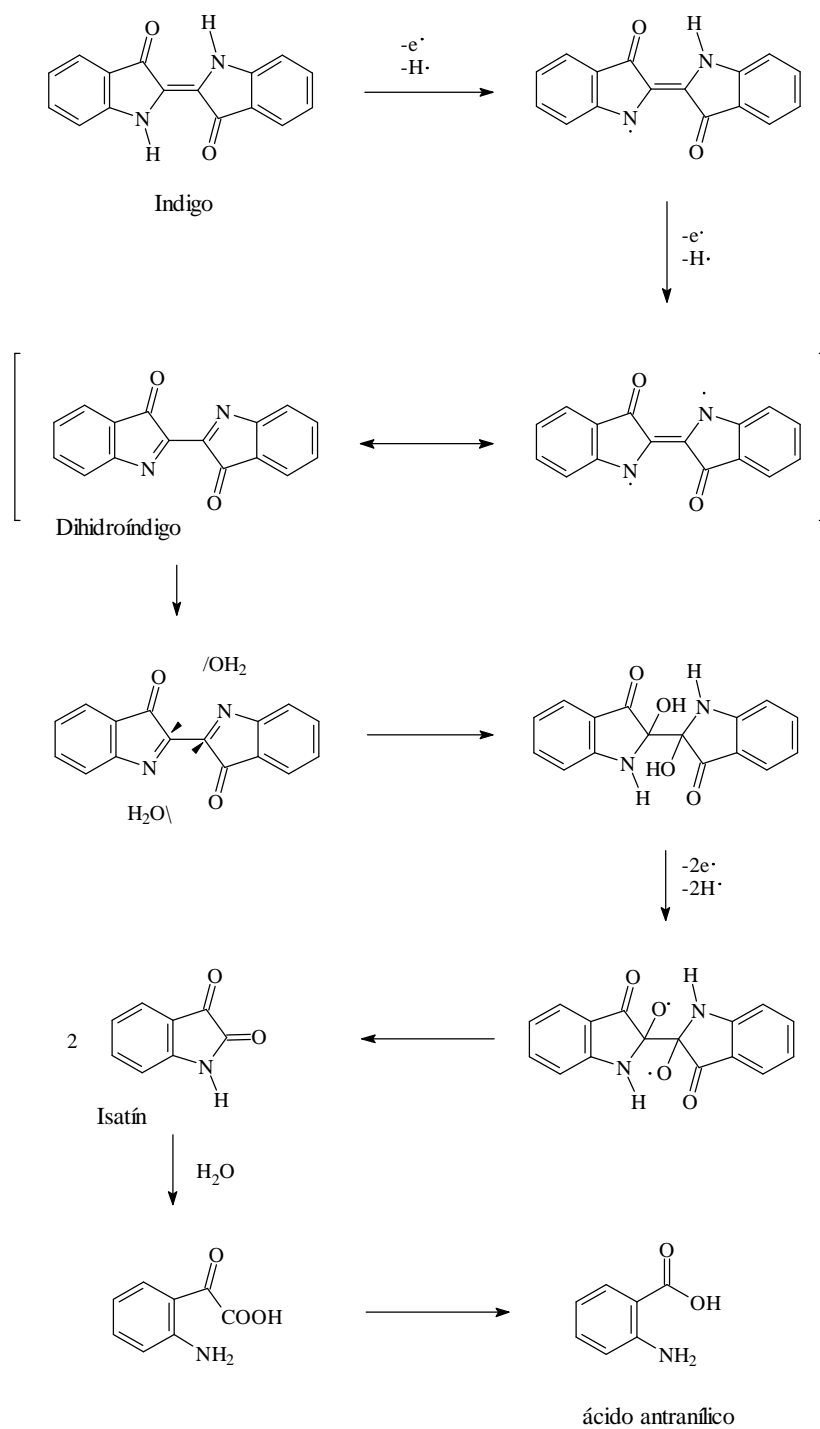


Figura 13. Mecanismo de oxidación del índigo hasta isatín, según Campos y Cavaco (2001).

El índigo por sustracción de 2 electrones se oxida a dihidroíndigo y por sustracción de 4 electrones se oxida completamente a isatín, que posteriormente con una hidrólisis se convierte en ácido antranílico, hay reportes que indican que este ácido tiene toxicidad moderada sobre todo para ambientes acuáticos.

5.6.3 Cinética

Se calculó la cinética de oxidación del índigo con 0.05 mM de $ABTS^{*+}$ y variando el índigo en 0.02, 0.013, 0.01, 0.008, 0.0075 y 0.005 mM para aproximar a un modelo de reacción de pseudo-primer orden.

La figura 14 muestra la velocidad inicial de consumo de 0.05 mM de $ABTS^{*+}$ con las diferentes cantidades de índigo a 25 °C, las velocidades iniciales se calcularon según el ejemplo del apéndice 1. La tendencia que siguió la velocidad de consumo fue una línea recta, esto indicó que la velocidad de consumo del $ABTS^{*+}$ fue proporcional a la cantidad de índigo adicionada.

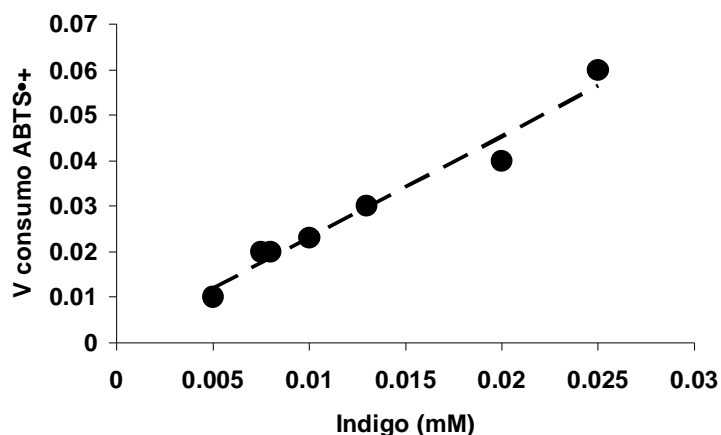


Figura 14. Velocidad de consumo de 0.05 mM de $ABTS^{*+}$ con diferentes cantidades de índigo

Posteriormente se ajustaron a un modelo de primer orden, los datos de absorbancia a 414 nm medidos contra tiempo, para cada una de las concentraciones de índigo, mezclados con los 0.05 mM de ABTS^{•+}, como se ilustra en el apéndice 3, y se determinó la constante cinética de primer orden:

$$\ln(S) = \ln(S_0) - kt$$

El valor ajustado fue de $k = 5.69 \mu\text{M/s}$

5.6.4 Reacción de oxidación de índigo con ABTS^{•+} con y sin lacasa

Se comparó la velocidad inicial de consumo de índigo con el ABTS^{•+} en presencia y ausencia de lacasa, para observar el efecto de la enzima. Las determinaciones se realizaron en los siguientes sistemas:

- a) Índigo + 2 nmoles de ABTS^{•+}
- b) Índigo + 4 U de lacasa
- c) Índigo + 2 nmoles de ABTS^{•+} + 4 U de lacasa.

Los resultados se resumen en la tabla 7 y se muestran en la figura 15.

Tabla 7. Velocidades de oxidación del índigo con ABTS^{•+} en presencia y ausencia de lacasa

Sistema de reacción	Velocidad de reacción
Índigo + 2 nmoles de ABTS ^{•+}	$k = 4 \times 10^{-6} \pm 1 \times 10^{-7} \text{ mol/min}$
Índigo + 4 U de lacasa	$k = 8 \times 10^{-5} \pm 5 \times 10^{-6} \text{ mol/min}$
Índigo + 2 nmoles de ABTS ^{•+} + 4 U lacasa	$k = 6 \times 10^{-4} \pm 3 \times 10^{-5} \text{ mol/min}$

Se observó que el índigo mezclado con ABTS^{•+} ó lacasa por separado se oxidó, pero en el medio de reacción donde estuvieron ambos, ABTS y lacasa, la velocidad de reacción aumentó considerablemente, en un orden de magnitud respecto el sistema con únicamente lacasa y de dos órdenes de magnitud respecto a usar únicamente ABTS^{•+}, como se muestra en la figura 14. Este aumento en la velocidad de reacción se

explicó completando el mecanismo propuesto anteriormente: la lacasa sustrae un electrón al ABTS oxidándolo y formando el $ABTS^{*+}$. El radical $ABTS^{*+}$ al ponerse en contacto con el índigo recuperó el electrón que perdió y regresó a su estado reducido, por lo que al haber lacasa en el medio de reacción el ABTS reducido se vuelve a oxidar, el $ABTS^{*+}$ oxida más moléculas de índigo y regresa nuevamente a su estado reducido; el ciclo se vuelve a repetir una y otra vez por lo que se observó una velocidad de reacción considerablemente mayor que al usar únicamente lacasa ó $ABTS^{*+}$ para oxidar al índigo.

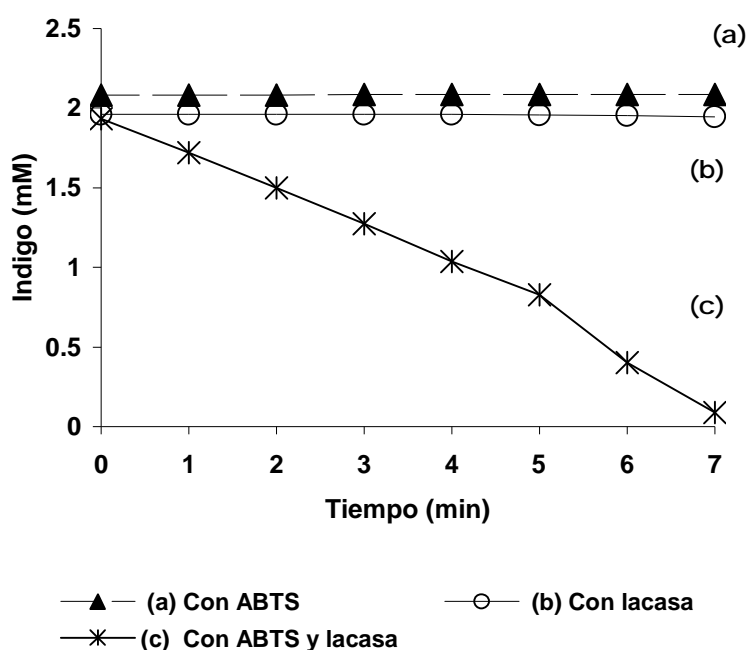


Figura 15. Velocidad de oxidación del índigo con (a) 2 nmoles $ABTS^{*+}$, (b) 4 U de lacasa y (c) 2 nmoles de $ABTS^{*+}$ y 4 U de lacasa

5.6.5 Reciclado del ABTS entre la lacasa y el índigo

Para corroborar que el ABTS se pudo reciclar entre la lacasa y el índigo, se adicionaron 10 alícuotas de 200 nmoles de índigo al ABTS contenido en la celda del espectrofotómetro y en presencia de 4 U de lacasa.

El máximo de absorción de índigo fue a 610 nm (según los espectros de las figuras 12 y 13), mientras que el ABTS^{•+} tiene uno de sus máximos de absorción en 646 nm, esto indica la existencia de un traslape de las curvas de absorción de ambos reactivos, por esta razón se usó el sistema de ecuaciones (descrito en materiales y desarrollo experimental) para calcular la cantidad de índigo y de ABTS^{•+} después de cada adición de índigo:

$$A_{414} = \varepsilon^A_{414} C_A + \varepsilon^I_{414} C_I \dots\dots\dots (1)$$

$$A_{610} = \varepsilon^A_{610} C_A + \varepsilon^I_{610} C_I \dots\dots\dots (2)$$

Donde C_A es [ABTS^{•+}], C_I es [Índigo] y el coeficiente de extinción molar ε^J_λ (J = A para ABTS^{•+} e I para azul índigo).

La figura 16 muestra las 10 adiciones sucesivas de 200 nmoles de índigo, realizadas directamente en la celda del espectrofotómetro conteniendo 2.5 nmoles de ABTS y 4 U de lacasa. Se observaron las oscilaciones periódicas del ABTS e índigo: a cada adición del colorante la cantidad de ABTS^{•+} disminuyó rápidamente, hasta oxidar a todo el índigo adicionado, posteriormente se observó una acumulación del ABTS^{•+} por acción de la lacasa presente en el medio de reacción. Este ciclo se repitió con cada una de las 10 adiciones del colorante.

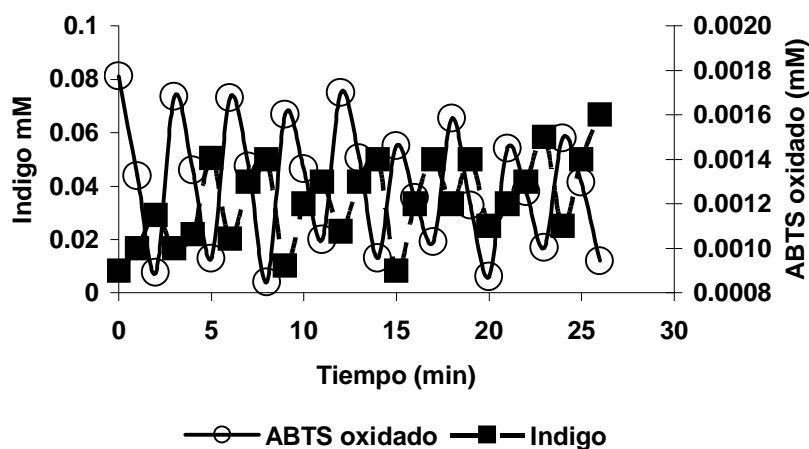


Figura 16. Ciclos periódicos del consumo y re-oxidación de 2.5 nmoles de ABTS^{•+} al hacer adiciones de 200 nmoles de índigo en presencia de 4 U de lacasa.

En total se adicionaron $10 \times 200 = 2\ 000$ nmoles de índigo y se oxidaron con 2.5 nmoles de ABTS en presencia de 4 U de lacasa. Entonces $2000/2.5=800$ nmoles de índigo se oxidaron por cada nmol de ABTS teniendo en el medio de reacción 4 U de lacasa (la relación estequiométrica en ausencia de lacasa fue de 4 moles de ABTS^{•+} por mol de índigo). Esto comprobó que el ABTS se recicló entre el índigo y la lacasa, de tal forma que con cantidades muy pequeñas del mediador fue posible oxidar cantidades importantes del sustrato. Esto es interesante ya que de esta forma se pueden emplear industrialmente mediadores de precio elevado, como es el caso del ABTS.

5.7 Decoloración de mezclilla usando lacasa y ABTS

5.7.1 Decoloración de mezclilla

El índigo, colorante de la mezclilla, es uno de los colorantes más empleados en la industria textil, debido a su importancia se consideró para estudiar su reacción con el sistema lacasa-ABTS pero ahora experimentando la decoloración del índigo presente en la tela.

La figura 17 es una fotografía de tres series de trozos de tela de mezclilla, después de 48 horas de haberse sometido a uno de los siguientes sistemas de reacción a 25 °C:

- Serie 1 con 40 μ moles de ABTS^{•+} en 200 mL de agua
- Serie 2 con 40 U de lacasa en 200 mL de agua
- Serie 3 con 40 μ moles de ABTS y 40 U de lacasa en 200 mL de agua

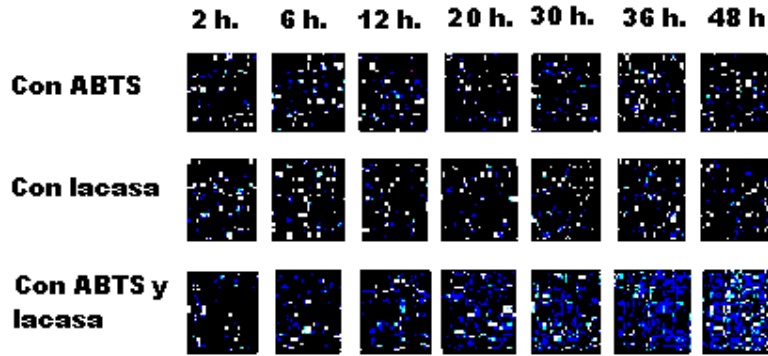


Figura 17. Decoloración de la mezclilla usando ABTS y lacasa

La mezclilla sometida al tratamiento con ambos ABTS y lacasa fue la única que se decoloró, esto se explicó porque el ABTS también se recicló entre el índigo de la tela y la lacasa, con el mismo mecanismo que ya se explicó anteriormente: el ABTS se oxida en presencia de la lacasa, éste recupera su electrón del índigo regresando a su estado reducido quedando así susceptible de oxidarse nuevamente en presencia de la lacasa. Este proceso es lento comparado con la reacción teniendo al índigo en solución, debido al paso de difusión del ABTS entre las fibras para poder oxidar al índigo.

5.7.2 Análisis colorimétrico

Las figuras 18, 19 y 20 muestra el análisis colorimétrico realizado a las tres series de mezclilla sometida a tratamientos con ABTS⁺, lacasa y la mezcla de ambos.

La figura 18 muestra la lectura en el parámetro "L" de las tres series de trozos de tela (este parámetro indica qué tan blanca es una muestra, su escala varía de 0-negro a 100- blanco). Sólo ocurrió variación en la serie de trozos de tela sometidos a decoloración con ambos ABTS y lacasa, para este caso el parámetro "L" incrementó en un 40 % respecto a su valor inicial, este incremento se explicó porque la serie de trozos de tela tratada con ABTS y lacasa se decoloró y dió por lo tanto un valor mayor en "L" acercándose al valor de 100 correspondiente al blanco. No se observó ningún cambio en el mismo parámetro para las telas tratadas con lacasa ó ABTS solos.

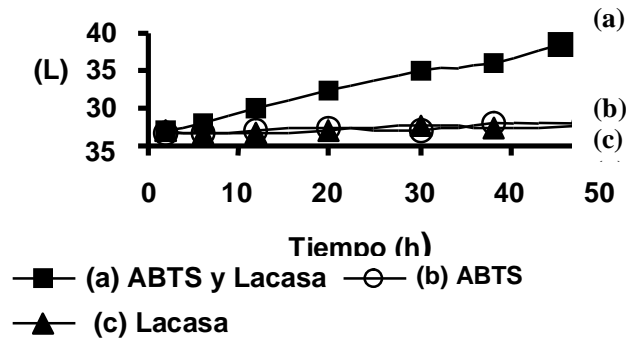


Figura 18. Variación en el parámetro Lighness de los tres tratamientos aplicados para decolorar la mezclilla

El parámetro Hue es una escala de colores que ubica el color de la muestra en un círculo dividido en 100 partes, ver figura 19, el color está definido por el ángulo en la escala.

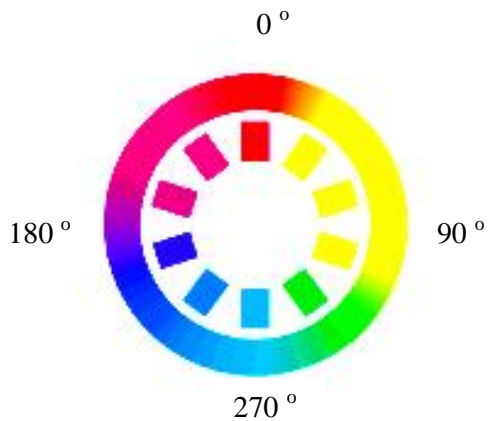


Figura 19. Escala de colores para determinar el parámetro Hue

La figura 20 muestra la variación en el parámetro Hue de las tres series de trozos de mezclilla. Los trozos de tela que se trataron con ABTS⁺⁺ o lacasa no mostraron variación en el Hue, ya que su color no cambió, pero los trozos de tela decolorados con la mezcla de ABTS⁺⁺ y lacasa mostraron un incremento en el Hue, variaron de 260° correspondiente a un color azul intenso hasta 268° a una región azul-verde más clara.

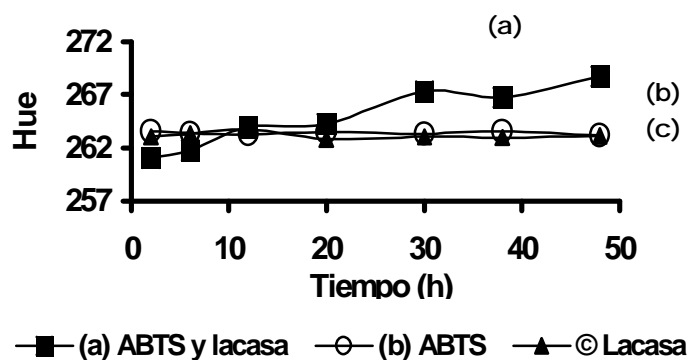


Figura 20. Variación en el parámetro Hue de los tres tratamientos para decolorar la mezclilla

La figura 21 muestra las gráficas de los valores de Chroma leídos para las tres series de trozos de mezclilla. El chroma indica la brillantez u opacidad de una muestra. En este caso ninguna de las series de tela mostraron cambios importante en el parámetro Chroma. Esto indica que aunque el sistema ABTS-lacasa puede decolorar la mezclilla, ésta no se opaca con el tratamiento.

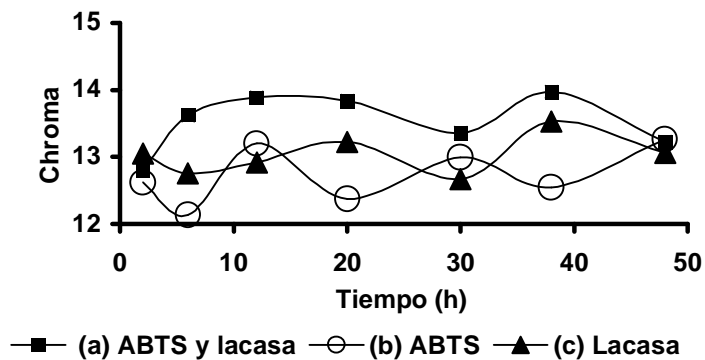


Figura 21. Variación en el parámetro Chroma de los trozos de tela sometidos a los tres tratamientos para decolorar la mezclilla

La mayoría de las lavanderías textiles que trabajan con mezclilla, utilizan en su proceso de blanqueo al hipoclorito de sodio, este compuesto es de uso delicado ya que puede formar compuestos clorados tóxicos; además, el índigo residual no se biodegrada y al ser tirado en los efluentes puede formar aminas cancerígenas. El uso del sistema ABTS-Lacasa abre un campo de oportunidad en la industria textil, ya permite realizar decoloraciones directamente sobre la tela evitando de esta forma los problemas ambientales que se producen con los procesos tradicionales. Para completar este estudio se determinó si los productos resultantes de la decoloración de la mezclilla con ABTS-lacasa fueron susceptibles de biodegradarse en un sistema biológico.

5.7.3 Biodegradabilidad del agua residual

Para determinar si el agua residual de la decoloración de la mezclilla es biodegradable, se sometió a un proceso usando lodos activados en condiciones aerobias y biomasa floculada en condiciones anaerobias.

En el proceso aerobio, se incubaron por 5 días: a) una muestra de agua residual de la decoloración de la mezclilla, b) una muestra de índigo en solución y c) una muestra de la mezcla de ABTS con lacasa, todas a la misma DQO inicial (1000 mg/L). A los tres sistemas se les midió diariamente la DBO, la cual se calculó con la relación:

$$\text{DBO muestra} = [\text{DBO medido} - (0.1 \times \text{DBO blanco})] / 0.9$$

. En la figura 22, se graficaron los resultados obtenidos en los 5 días que duró el experimento. Se observó que en el primer día, con la muestra de agua residual de decoloración de la mezclilla, se obtuvo un valor de DBO = 696 mg/L. Para el 2º al 5º día la variación en la DBO fue pequeña, llegando al quinto día a un valor de DBO=764 mg/L. La relación DBO/DQO = 0.764, esto indica que el agua residual de decoloración de la mezclilla sí es biodegradable con un sistema de lodos activados. Para el índigo en el primer día no ocurrió ningún cambio y en el día 5 se calculó una relación DBO/DQO = 0.67 (este valor se alcanzó con el agua de desecho de la decoloración de la mezclilla en un día), sin embargo la solución de índigo al final del experimento se siguió observando de un color azul intenso.

El índigo se biodegradó más lentamente que el agua residual de decoloración de la mezclilla. Para la mezcla de ABTS con lacasa se observó un incremento casi constante en la DBO durante los 5 días de análisis y al finalizar el experimento se midió una $DBO/DQO = 0.31$, indicando que esta mezcla se biodegradó más lentamente que la muestra de agua residual de decoloración de la mezclilla.

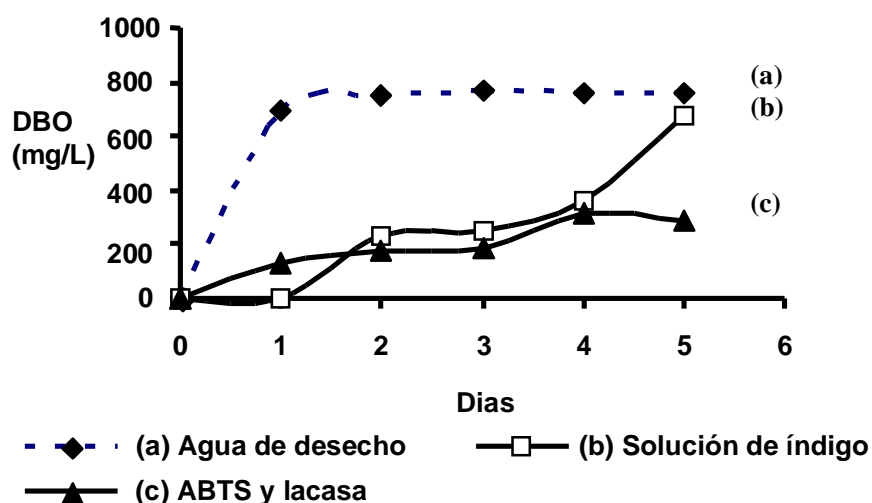


Figura 22. Medición de DBO en el sistema de tratamiento con lodos aerobios para (a) el agua de desecho de la decoloración de la mezclilla, (b) mezcla de ABTS + lacasa y (c) solución de índigo

5.7.4 Metanogénesis

Una muestra del agua de desecho de la decoloración de la mezclilla (a), se sometió también a un proceso de biodegradación pero ahora en un sistema anaerobio. En este caso los controles usados fueron: (b) una solución de índigo y (c) una solución de acetato de sodio, (d) una solución de lacasa y (e) una solución de ABTS. Se midió la producción de metano durante 72 horas, por desplazamiento de una solución de NaOH, este gas es producto del metabolismo microbiano en ausencia de oxígeno.

La figura 23 muestra la producción de metano de: (a) agua de desecho, (b) de la solución de índigo y (c) de la solución de acetato de sodio. Con el agua de desecho se calculó que la producción de metano fue del 75% del valor teórico, mientras que no se observó producción de metano en la solución de índigo a lo largo de las 72 horas que duró el experimento, en el apéndice 4 se muestran los cálculos realizados.

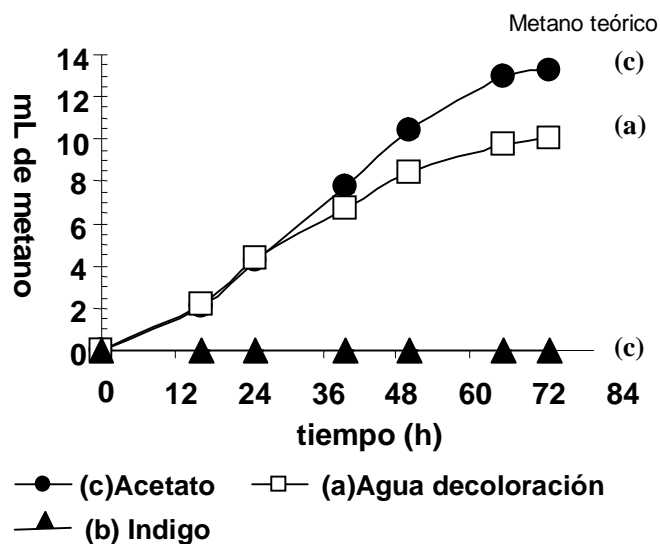


Figura 23. Producción de metano (mL) en un sistema de biomasa floculada para el tratamiento de (a) acetato, (b) agua de decoloración de la mezclilla y (c) una solución de índigo

Posteriormente se determinó la DQO después de 72 horas para las muestras analizadas: (a) agua de desecho, (b) de la solución de índigo, (c) de la solución de acetato de sodio (d) solución de lacasa y (e) solución de ABTS. Los resultados se indican en la tabla 8. Donde se observa que usando biomasa floculada se oxidó un 70% de la materia orgánica contenida en el agua de desecho de la decoloración de la mezclilla.

Tabla 8. % de materia orgánica oxidada anaeróbicamente

Muestra	DQO inicial (mg/L)	DQO final (mg/L)	% materia oxidada
Agua de desecho de decoloración de mezclilla	1000	298	70.2 %
Solución de índigo	1000	1000	0.0 %
Solución de acetato	1000	78	92.2 %
Solución de lacasa	1000	517	48.3 %
Solución de ABTS	1000	785	21.5 %

El agua de desecho de la decoloración de la mezclilla se pudo biodegradar en ambos tipos de proceso, aerobio y anaerobio. Esto indica que el sistema ABTS-lacasa se puede usar para decolorar directamente la mezclilla y para decolorar efluentes textiles contaminados con índigo; ya que al reaccionar el índigo con el ABTS y la lacasa se transformó en productos biodegradables en sistemas biológicos de manera aerobia o anaerobia.

5.8 Reacción de oxidación con el ABTS²⁺

Se probó la reactividad del ABTS²⁺ con otros compuestos: Sudán II, p-cresol, p-cloroanilina, ácido gálico, ácido tánico, aminoazo tolueno, aminoazo benceno, rojo congo, azul remazol, azul brillante G, naranja 7, fenilazo anilina. Se prepararon mezclas de los compuestos y se incubaron equimolarmente con ABTS²⁺ por 2 horas a 25 °C. Se leyeron periódicamente los cambios de absorbancia para calcular la velocidad inicial de consumo de ABTS²⁺; además se obtuvieron los espectros de absorción UV-Visible de los compuestos puros, de la solución de ABTS²⁺ y la mezcla de ambos, dichos espectros se muestran en la figura 24.

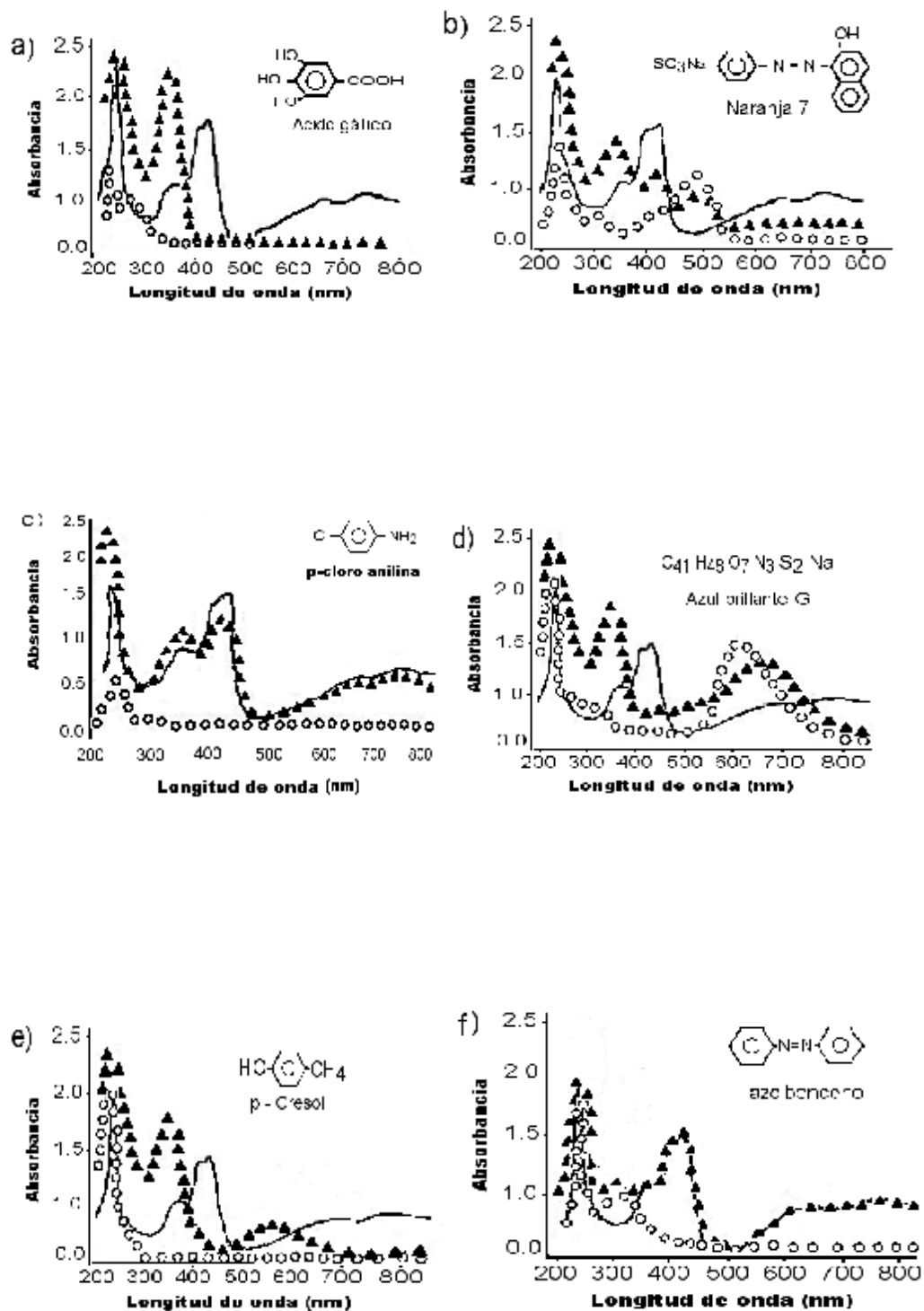


Figura 24. Oxidación de diferentes compuestos usando la mezcla de ABTS/ABTS⁺ producida por la lacasa inmovilizada (—), con diferentes compuestos, (○) Compuesto a oxidarse y (▲) Mezcla de cada compuesto con ABTS/ABTS⁺

En las figuras 24 a) hasta f) se anexan algunos de los espectros de absorción de los diversos compuestos usados para determinar la reactividad del ABTS^{•+}. En las figuras 24a, 24b, 24d y 24e se muestran los espectros espectrofotométricos UV-Visible de algunos de los compuestos que si se oxidaron con el ABTS^{•+}. Las figuras 24c y 24f corresponden a dos de los tres compuestos que no reaccionaron con el ABTS^{•+}, el azobenceno y la p-cloroanilina, el tercer compuesto de los 13 estudiado que no reaccionó con el ABTS^{•+} fue la fenilazo anilina.

En la figura 24 (a) se muestra el espectro de absorción del ácido gálico (O), de la mezcla de ABTS/ABTS^{•+} producida con la lacasa inmovilizada (-) y la mezcla de ambos (▲). El ácido gálico presentó máximos de absorción en 242 y 265 nm y el ABTS los característicos descritos anteriormente (340 para el estado reducido y 394, 414, 646 y 728 nm para el monocatión). En la mezcla de reacción se observó que los picos correspondientes al ABTS^{•+} disminuyeron y aumentó el pico del ABTS reducido; el producto de oxidación debió absorber en alguna longitud de onda similar al ABTS de allí que no se aprecie un nuevo pico.

En la figura 24 (b) se muestra el espectro de absorción del naranja 7 (O), de la mezcla de ABTS/ABTS^{•+} producida con la lacasa inmovilizada (-) y la mezcla de ambos (▲). El naranja 7 presentó máximos de absorción en 232 y 490 nm, en la mezcla de reacción se observó que el pico a 490 nm disminuyó. Asimismo ocurren los mismos cambios en los espectros del ABTS indicados en el inciso anterior.

La figura 24 (c) son los espectros de absorción de p-cloro anilina (O), de la mezcla de ABTS/ABTS^{•+} producida con la lacasa inmovilizada (-) y la mezcla de ambos (▲). La p-cloro anilina presentó un máximo de absorción en 235. La mezcla de reacción no presentó cambios significativos comparados con el espectro de la mezcla de ABTS/ABTS^{•+}, por lo que se que se concluye que la p-cloroanilina no reaccionó con este sistema.

En la figura 24 (d) están los espectros de absorción del azul brillante G (O), de la mezcla de ABTS/ABTS^{•+} producida con la lacasa inmovilizada (-) y la mezcla de ambos (▲). El azul brillante G mostró un máximo en 600 nm, el cual cambió al reaccionar con el ABTS^{•+}, de tal forma que el producto tuvo un máximo en 662 nm, visualmente se observó que la mezcla inicialmente de color azul cambió a verde, de allí el cambio en los máximos de absorción. Los cambios en el ABTS son similares a los ya descritos.

La figura 24 (e) son los espectros de absorción del *p*-cresol (O), de la mezcla de ABTS/ABTS^{•+} producida con la lacasa inmovilizada (-) y la mezcla de ambos (▲). El *p*-cresol puro es incoloro, lo cual se corrobora con el único pico en su espectro a 242 nm, en la mezcla de reacción se observó la aparición de un nuevo pico a 556 nm, indicando que el *p*-cresol oxidado es colorido, lo cual se confirmó con la apreciación visual, el producto de oxidación del *p*-cresol da como producto un compuesto rosa intenso.

En la figura 24 (f) aparecen los espectros de absorción del azobenceno (O), de la mezcla de ABTS/ABTS^{•+} producida con la lacasa inmovilizada (-) y la mezcla de ambos (▲). El azobenceno tampoco reaccionó con el ABTS^{•+}, de tal forma que los espectros del ABTS y de la mezcla son prácticamente los mismos, la pequeña variación que se observó a 312 nm se debió a la suma de absorbancias de los compuestos puros.

Se observó también en los compuestos donde sí hubo reacción química, que el pico a 340 nm (correspondiente al ABTS reducido) aumentó. Esto se debe a que en todos estos compuestos el mecanismo de oxidación fue similar al del índigo: el ABTS^{•+} tiene una deficiencia en un electrón, el cual captó del sustrato y regresó a su estado reducido.

El ABTS^{•+} además de ser un radical bastante estable es muy reactivo, puede oxidar a una gama de compuestos fenólicos y no fenólicos sin requerir que la lacasa esté presente en el medio de reacción.

Se realizó un estudio más extenso de la reacción de oxidación del ABTS^{•+} con dos compuestos: El Sudán II debido a que este compuesto es no polar y para determinar el efecto del ABTS-lacasa pero en sistemas de dos fases y el p-cresol como modelo de compuestos fenólicos que son otro de los grupos químicos tóxicos que se desechan como residuos industriales.

5.9 Reacción entre el ABTS^{•+} y el Sudán II

El Sudán II es un colorante empleado para hacer tinciones biológicas. Es insoluble en agua y soluble en compuestos orgánicos. Este compuesto es interesante para estudiar si el ABTS^{•+} puede efectuar oxidaciones de compuestos en sistemas de dos fases: el ABTS^{•+} en la fase acuosa y el compuesto a oxidar en la orgánica.

5.9.1 Variación de coeficientes de partición

Para incrementar la cantidad de Sudán II que se disolvió en la fase acuosa, se variaron los coeficientes de partición del sistema agua-hexano mediante la adición de diversos disolventes.

Al adicionar etanol, metanol, acetonitrilo y butanol al sistema agua- Sudán II disuelto en hexano. Se observó que con metanol se requirió adicionar más del 62.5 % V/V para que el Sudán II empezara a disolverse en la fase acuosa, con etanol se requirió adicionar más del 50 % V/V. Mientras que con acetonitrilo con tan solo con el 25 % V/V adicionado se observó Sudán II en la fase acuosa, incluso con adición del 87.5 % V/V de acetonitrilo es mayor la cantidad de Sudán II disuelta en la fase polar que en la no polar. En el caso del butanol, este solvente en todas las proporciones usadas se adicionó a la fase no polar, incrementando el volumen de ésta, pero no ocurrió que se variara la cantidad del colorante disuelta en la fase orgánica. El acetonitrilo resultó ser el mejor co-solvente ya que permitió que el Sudán II se distribuyera entre las fases acuosa y orgánica, de tal forma que se pudiera hacer la reacción de oxidación con el ABTS y la lacasa (que son hidrosolubles).

En la sección 5.1.2 se describió que la actividad de la lacasa disminuyó con la adición de acetonitrilo, por lo que a pesar de ser éste un excelente co-solvente no se pudo usar debido a que afecta negativamente y en gran medida a la actividad de la enzima. Por ejemplo, con la adición del 25 % de acetonitrilo la actividad remanente de la lacasa fue del 15 % respecto a su actividad sin adicionar disolventes; por lo tanto se eligió al etanol como co-solvente, además de que este disolvente adicionado en menos del 30 % V/V aumenta la actividad catalítica de la enzima.

Se midieron las absorbancias de la serie de tubos con Sudán II disuelto en hexano a los que se les adicionaron diferentes cantidades de etanol, para observar la distribución del colorante en ambas fases polar y no polar, ver figura 25.

En figura 25 se observa cómo cambió la distribución de Sudán II en cada fase al hacer las adiciones de etanol. De las figuras 3 y 25 se concluyó que se puede adicionar hasta un 35 % de etanol para que se disuelva parte del Sudán II en la fase acuosa y si disminuir la actividad de la enzima.

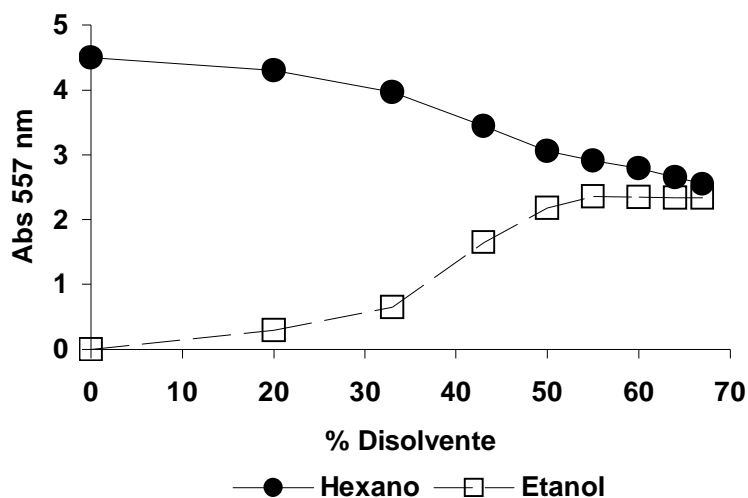


Figura 25. Distribución del Sudán II en hexano y agua al ir adicionando etanol

5.9.2 Cinética

Para determinar el efecto de la lacasa y de trabajar en un sistema en una y dos fases, se prepararon las siguientes mezclas de reacción: a) Sistema de una sola fase: ABTS^{•+} y Sudán II previamente disuelto en una solución acuosa con 35 % V/V de etanol, pero sin enzima en el medio de reacción, b) Las mismas condiciones que a) pero con lacasa en el medio de reacción y c) En un sistema de dos fases: el Sudán II disuelto en hexano y la lacasa y ABTS reducido en la fase acuosa.

La reacción de oxidación del Sudán II ocurrió en los tres esquemas, dando un producto polar de color rosa. En los esquemas a) y b) se observó que la reacción ocurrió en segundos. En el caso b) se vio una coloración mucho más intensa debido a una mayor formación de producto que en a), porque el ABTS^{•+} se recicló también entre la lacasa y el Sudán, con un mecanismo similar al descrito anteriormente. En c) la reacción ocurrió en la interfase, por lo que es más lenta, no se observa cambio de coloración en la fase orgánica, pero sí en la acuosa, ya que el producto de oxidación es polar. Inicialmente se observó el color verde característico del ABTS^{•+} y posteriormente, al irse formando el producto cambió a rosa y se fue intensificando esta tonalidad.

Se intentó medir la velocidad de formación de producto o de consumo de reactivos, pero los resultados obtenidos de las mediciones de absorbancia no muestran tendencia alguna, hay oscilaciones irregulares, como si ocurrieran varias reacciones a la vez, de formación y consumo de sustancias, por lo que no se pudo determinar ninguna velocidad de reacción. Posteriormente se encontró que el Sudán II es una mezcla de varias sustancias no es un compuesto puro.

5.9.3 Análisis de pureza del Sudán II

La figura 26 es una cromatografía en capa fina del Sudán II, del ABTS^{•+} y la lacasa usando como fase móvil la mezcla 55 agua:35 etanol:10 butanol. La mancha (a) muestra que la lacasa no tiene componentes coloridos que se pudieran separar con el sistema de disolventes usado, las manchas (b) y (c) indicaron que con este sistema no

se identificó la formación de producto colorido entre la lacasa y el Sudán II ni entre el ABTS y el Sudán II. Mientras que la mancha (d) indicó que el $ABTS^{*+}$ formó productos con el Sudán II que se pudieron separar con la fase móvil usada. Las manchas (e), (f) y (g) son los controles de los reactivos de Sudán II, $ABTS^{*+}$ y ABTS reducido respectivamente. Al comparar la mancha (d) con las demás, se concluyó que en la reacción entre el $ABTS^{*+}$ y el Sudán II se formaron varios productos coloridos habiendo dos que se forman en mayor cantidad (correspondientes a las dos manchas coloridas más intensas).

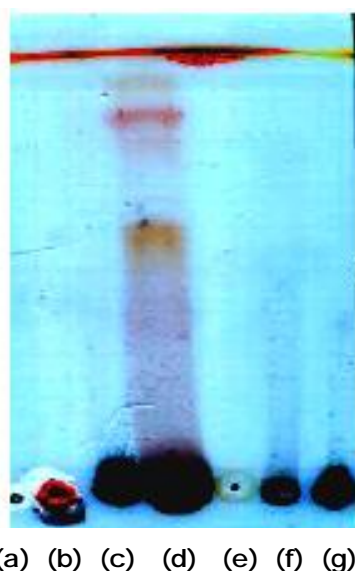


Figura 26. Cromatografía en capa fina de reacción del Sudán II con el $ABTS^{+}$ mancha (a) lacasa, mancha (b) Sudán II + lacasa, mancha (c) ABTS reducido + Sudán II, mancha (d) $ABTS^{*+}$ + Sudán II, mancha (e) Sudán II, mancha (f) $ABTS^{*+}$ y (g) ABTS*

Se realizaron varias cromatografías en capa fina similares a ésta pero con diferentes disolventes: etanol, butanol, metanol, agua, benceno, tolueno, usando los disolventes puros y mezclas de ellos binarias y terciarias en diferentes proporciones, con el objetivo de separar los componentes del Sudán II y/o mejorar la separación de las manchas correspondientes a los productos de reacción, pero sin éxito.

En la cromatografía en capa fina usando benceno como eluyente, se detectó que el Sudán II no es un compuesto puro, ver figura 27, ya que aparecieron múltiples manchas, dos de ellas principales, véase la figura 27 mancha (a). La mancha (b) corresponde a la reacción entre el $ABTS^{*+}$ y el Sudán II, mostrando que sólo dos de los componentes del Sudán II (de la parte superior de la placa) se decoloraron al reaccionar con el $ABTS^{*+}$. La mancha (c) corresponde a la fracción del Sudán II que se decoloró con el $ABTS^{*+}$ y se observó, usando benceno, que está formada por varios componentes coloridos, finalmente la mancha (d) es la reacción de (c) con el $ABTS^{*+}$, indicando que varios de los compuestos coloridos reaccionan con el mediador oxidado. Estas observaciones explican porque no se pudo determinar cinética de reacción entre el $ABTS^{*+}$ y el Sudán II, ya que no se estaba leyendo sólo una reacción a la vez.

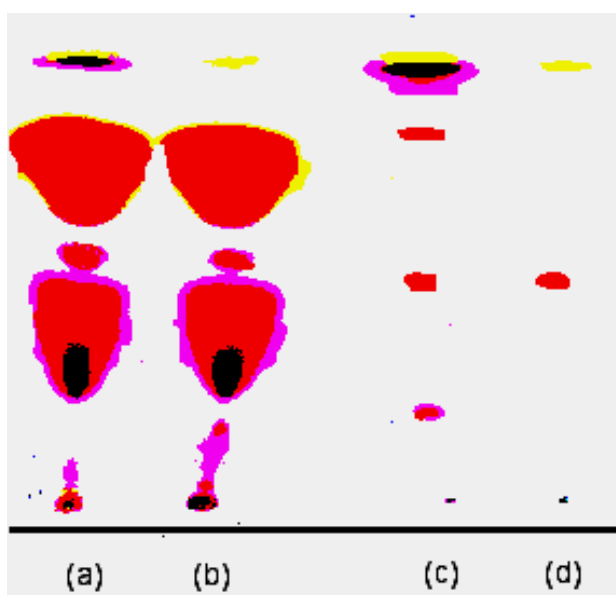


Figura 27. Cromatografía del Sudán II y del componente que Reaccionó con el $ABTS^{+}$ mancha (a) Sudán II, mancha (b) Sudán II + $ABTS^{*+}$ mancha (c) Componente de (a) que reaccionó con el $ABTS^{*+}$, mancha (d) la mancha (c) + $ABTS^{*+}$*

Se intentó purificar por varios métodos la fracción del Sudán II que reaccionó con el $ABTS^{*+}$ pero no hubo resultados positivos, por lo que fue imposible identificar dichos componentes del colorante.

Se corroboró que las múltiples manchas del Sudán II reveladas con benceno como fase móvil, no correspondieron a descomposición del compuesto debido al tiempo de almacenamiento ni a la exposición a la luz, ya que se realizaron otras cromatografías en capa fina con un lote de Sudán II recién adquirido, con una muestra de Sudán II expuesta a luz ultravioleta por 4 horas y con muestras de Sudán III y Sudán IV; en todas ellas se observaron también múltiples manchas.

5.10 Reacción entre el ABTS^{•+} y el *p*-cresol

5.10.1 Cromatografía en capa fina

La figura 28 es la cromatografía en capa fina usando la mezcla 55 agua:35 etanol:10 de butanol, donde se observaron productos coloridos entre el ABTS^{•+} y el *p*-cresol. Con este mismo sistema no hubo evidencia de formación de productos coloridos entre el ABTS en su estado reducido y el *p*-cresol, como se observa en la mancha (d).

Posteriormente se mezcló en forma equimolar el *p*-cresol con el ABTS^{•+}, y se adicionaron 4 U de lacasa, en este caso se observó también la formación de un producto con la misma coloración morada que al hacer reaccionar el ABTS^{•+} con el *p*-cresol, con la diferencia que en el sistema conteniendo lacasa se observó la formación de un precipitado del mismo color.



Figura 28. Cromatografía en capa fina del *p*-cresol con el $ABTS^{*+}$, (a) corresponde a la lacasa, la mancha (b) corresponde a la mezcla de *p*-cresol + $ABTS^{*+}$, la mancha (c) es la mezcla de $ABTS$ reducido + Sudán II y la mancha (d) es solución de $ABTS/ABTS^{*+}$.

5.10.2. Identificación del *p*-cresol oxidado

El producto de reacción se separó de la placa de cromatografía y se inyectó en el cromatógrafo de gases acoplado al espectrofotómetro de masas; se logró obtener un pico que se identificó en la biblioteca del equipo como: 3(4H)-dibenzofuranona, 4a, 9b-dihidro-8,9b dimetil. Este producto de reacción es el reportado también por Raven et al (2001):



5.10.3 Estequiometría

El *p*-cresol y ABTS⁺⁺ se mezclaron en diferentes proporciones molares y se dejaron reaccionar toda la noche. Posteriormente se analizaron en el espectrofotómetro uv-visible y en el HPLC para determinar cual fue la relación molar donde se consumieron ambos reactivos. Se encontró por ambos métodos que la estequiometría fue de 2 moles de ABTS⁺⁺ por mol de *p*-cresol, ya que en esta proporción se encontró que se consumieron completamente los dos reactivos. Este resultado coincidió con la reacción propuesta por Raven et al (2001) para la oxidación del *p*-cresol y que se ilustra en el esquema anterior. Para la formación de la 3(4H)-dibenzofuranona, 4a, 9b-dihidro-8,9b dimetil se requiere que a cada molécula de *p*-cresol le sean sustraídos dos electrones, uno del anillo bencénico y el otro del grupo hidroxilo, es decir, se requieren de 2 moles de ABTS oxidado monocatión por cada mol de *p*-cresol para formar el producto identificado por espectrofotometría de masas.

5.10.4 Cinética

Los datos obtenidos de la velocidad de consumo de ABTS⁺⁺ al hacerse reaccionar con diferentes cantidades de *p*-cresol en ausencia de lacasa, se ajustaron a los modelos cinéticos de orden cero, de primero y segundo orden. El mejor ajuste correspondió al modelo de cinética de segundo orden: $V = A_0 - kt$

Se ajustaron los datos con el programa de solver y se obtuvo una $k = 0.99 \text{ nM/s}$

La figura 29 muestra el cambio de absorbancia con el tiempo al hacer reaccionar el *p*-cresol con ABTS⁺⁺ en diferentes cantidades, en presencia y ausencia de la enzima. En el caso de los sistemas reactivos conteniendo lacasa, se observó una velocidad de oxidación mayor, en un orden de magnitud que en los casos donde no hubo enzima presente. Este resultado se explicó también por el reciclamiento del ABTS que ocurrió entre el sustrato y la lacasa.

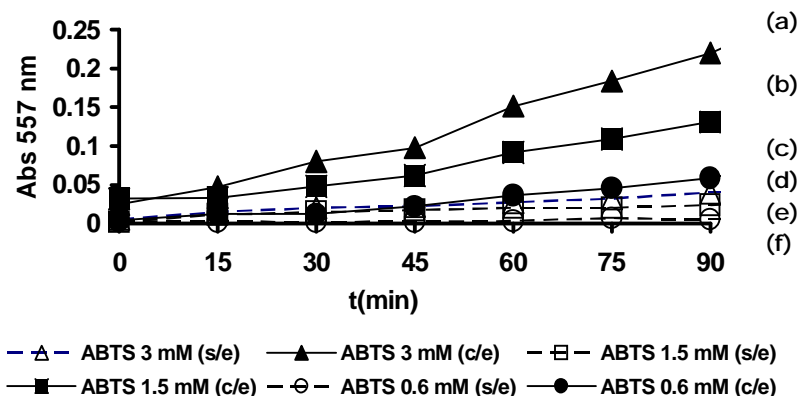


Figura 29. Reacción de *p*-cresol con ABTS*⁺ en presencia y ausencia de lacasa (a) ABTS 3 mM con enzima, (b) ABTS 1.5 mM con enzima, (c) ABTS 0.6 mM con enzima, (d) ABTS 3 mM sin enzima, (e) ABTS 1.5 mM sin enzima, (f) ABTS 0.6 mM sin enzima

5.10.5 Reciclado del ABTS entre la lacasa y diferentes sustratos

Para determinar si el ABTS*⁺ se recicló entre la lacasa y otros sustratos, se midió la velocidad de oxidación de algunos de los compuestos estudiados, en tres sistemas:

- Con 200 nmoles del compuesto y dos nmoles de ABTS*⁺ (V_1 (h^{-1}))
- Con 200 nmoles del compuesto, dos nmoles de ABTS y 4 U lacasa (V_2 (h^{-1}))
- Con 200 nmoles del compuesto y cuatro U de lacasa (V_3 (h^{-1}))

Los resultados se resumen en la tabla 9.

Tabla 9. Velocidades de oxidación de algunos compuestos con ABTS*⁺, V_1 (h^{-1}) con 200 nmoles del compuesto y dos nmoles de ABTS*⁺, V_2 (h^{-1}) con 200 nmoles del compuesto, dos nmoles de ABTS y 4 U lacasa V_3 (h^{-1}) con 200 nmoles del compuesto y 4 U de lacasa

Compuesto	V_1 (hr^{-1})	V_2 (hr^{-1})	V_3 (hr^{-1})
Indigo	0.067 ± 0.01	6.280 ± 0.061	0.206 ± 0.08
Azul Brillante G	0.072 ± 0.02	1.224 ± 0.13	0.052 ± 0.03
Naranja 7	0.010 ± 0.005	0.342 ± 0.018	0.016 ± 0.01
Aminoazotoluenc	0.168 ± 0.10	0.244 ± 0.090	0.222 ± 0.09
<i>p</i> -cresol	0.016 ± 0.00	0.054 ± 0.016	0.026 ± 0.01

Excepto para el índigo, las velocidades de reacción del compuesto con lacasa ó con ABTS^{•+} fueron similares, del mismo orden de magnitud. Se observó también que para todos los compuestos, excepto el caso del aminoazo tolueno, la adición de lacasa y ABTS incrementó la velocidad de oxidación comparada con la velocidad obtenida al usar solamente ABTS ó lacasa. Para el índigo, la adición de lacasa incrementó la velocidad de reacción 93 veces respecto a emplear únicamente ABTS^{•+}, para el azul brillante G el aumento en la velocidad fue de 17 veces, 34 para el naranja 7 y en 3 veces para el *p*-cresol.

El ABTS en todos los casos descritos siguió un mecanismo similar, por acción de la lacasa perdió un electrón formando el monocatión, éste tuvo la capacidad de oxidar por si solo a diversos sustratos, al realizar esta reacción recuperó el electrón perdido retornando así a su estado reducido para volver a ser oxidado por la lacasa.

CONCLUSIONES

1. La enzima lacasa puede oxidar al ABTS, formando el ABTS^{•+} (monocación)
2. El monocación presenta bandas de absorción característica a las longitudes de onda $\lambda=394$ nm $\lambda=414$ nm, $\lambda=646$ nm y $\lambda=728$ nm; en cambio el dicación es incoloro, absorbe en la región ultravioleta del espectro.
3. El monocación es capaz por si solo y separado de la enzima, de oxidar una gran variedad de compuestos incluyendo al: ácido tánico, naranja 7, ácido gálico, azul remazol R, aminoazotolueno, azul brillante G, *p*-cresol y azul índigo.
4. La combinación de la enzima y el ABTS produce reacciones oxidativas más rápidas que la enzima o el ABTS solos. Esto se explica por un rápido mecanismo catalítico tipo cíclico entre la enzima y el sustrato. Este mecanismo se demostró con detalle en la oxidación del índigo, donde el ABTS se recicló aproximadamente 800 veces.
5. Este proceso oxidativo con lacasa y ABTS puede ser útil para decolorar telas teñidas con el azul índigo, como la mezclilla, produciéndose compuestos oxidados de fácil mineralización por medio de procesos microbianos aerobios o anaerobios. Este proceso está en vías de patentarse a beneficio de la UAM
6. Experimentos adicionales mostraron que el ABTS^{•+} fue capaz de oxidar compuestos liposolubles como el Sudán II, usando ya sea mezclas de alcoholes ó sistemas de dos fases (hexano-agua) Condiciones que son desnaturizantes para la enzima.

Los resultados encontrados a lo largo de la presente experimentación indican que se pueden desarrollar sistemas de reacción en dos etapas, una involucrando la enzima que oxide al mediador y la segunda etapa una reacción química para la oxidación del sustrato final. Los reactores se pueden diseñar para funcionar en sistemas de una o de dos fases; en éste último caso se podría separar los productos de reacción de los reactivos distribuyéndolos en las dos fases mediante la variación de los coeficientes de partición por la adición de co-solventes.

Las reacciones enzimáticas, usando lacasa se pueden usar también para el tratamiento de efluentes contaminados con colorantes, como es el caso de la industria textil.

NOMENCLATURA

ABTS	Acido 2,2'-(3-etil benzotiazolin-6-sulfónico)
(EC 1.10.3.1)	La nomenclatura de enzimas sistematizada por la Internacional Enzyme Comisión indica que: el nombre se forma anotando las siglas EC seguida de 4 números separados por puntos. El primer número indica a cual de las seis clases pertenece el enzima (óxido-reductasa, transferasa, isomerasa, liasa, hidrolasa ó ligasa), el segundo se refiere a las distintas subclases dentro de cada grupo, el tercero y el cuarto se refieren a los grupos químicos específicos que intervienen en la reacción
EPR	Resonancia Electrónica Paramagnética. Es el nombre dado al proceso de absorción resonante de radiaciones microondas por moléculas ó iones paramagnéticos con al menos un spin electrónico desapareado y en presencia de un campo magnético estático.
NMR	Resonancia Magnética Nuclear (NMR) Técnica basada en la medición de la resonancia del spin nuclear por un núcleo en un campo magnético fuerte, ya que la absorción de la radiación hace que el spin nuclear se alinie o gire en dirección de mayor energía; ayuda a determinar la estructura de una molécula,
K_M	Constante de Michaelis Menten que indica la concentración de sustrato para la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima. El valor de K_M da idea de la afinidad del enzima por el sustrato: a menor K_M , mayor afinidad del enzima por el sustrato,

k_{cat}	Parámetro cinético importante que indica la velocidad de la reacción enzimática por mol de enzima.
$E_i=0$	Potencial de corriente nula o potencial de circuito abierto. Es el valor del potencial <i>per se</i> de una sustancia sin aplicarle ningún voltaje. Indica el tipo de especies químicas con propiedades redox que se encuentran en solución.
I_{pa}, I_{pc}	Velocidad de transformación electroquímica de una especie química es máxima al someter la muestra a un barrido de potencial. El subíndice a indica que el proceso es de oxidación y el subíndice c indica que la transformación es una reducción de la especie química
U	Unidad internacional (U) de actividad enzimática, se define como la cantidad de la misma que cataliza la transformación de un mol de sustrato por minuto, bajo condiciones definidas: pH, temperatura, concentración de sustrato, etc.
DBO	Demanda Bioquímica de Oxígeno. Cantidad de oxígeno requerida para oxidar biológicamente la materia orgánica contenida en solución en una muestra.
DQO	Demanda Química de Oxígeno. Cantidad de oxígeno necesaria para oxidar químicamente la materia orgánica disuelta en una muestra.

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mezclas de reacción para determinar los parámetros cinéticos de la lacasa con el ABTS medidos a 25 °C.....	20
Tabla 2. Coeficientes de extinción molar calculados para el ABTS ^{I+} (ϵ^A) a 414 y 620 nm y para el azul indigo (ϵ^I) a 414 y 620 nm.....	26
Tabla 3. Composición en las botellas serológicas para realizar la cuantificación de la producción de metano.....	30
Tabla 4. Composición de las 4 series de tubos conteniendo 3 mL de Sudán II disuelto en hexano y 3 mL de disolvente-agua.....	31
Tabla 5. Relaciones molares de p-cresol: ABTS ^{I+} usadas para determinar la estequiometría de la reacción.....	35
Tabla 6. Concentraciones de p-cresol y ABTS ^{I+} usadas para determinar la cinética de la reacción.....	37
Tabla 7. Velocidades de oxidación del índigo con ABTS ^{I+} en presencia y ausencia de lacasa.....	57
Tabla 8. % de materia orgánica oxidada anaeróbicamente.....	67
Tabla 9. Velocidades de oxidación de algunos compuestos con ABTS ⁺⁺ , V_1 (h^{-1}) con 200 nmoles del compuesto y dos nmoles de ABTS ⁺⁺ , V_2 (h^{-1}) con 200 nmoles del compuesto, dos nmoles de ABTS y 4 U lacasa V_3 (h^{-1}) con 200 nmoles del compuesto y 4 U de lacasa	79

INDICE DE FIGURAS

<p>Figura 1. Estructuras redox de a) ABTS en su estado reducido, b) Monocación $ABTS^{1+}$ y c) dicación $ABTS^{2+}$.....</p>	9
<p>Figura 2. Ajuste al modelo de Michaelis Mentel $V=V_{max}[S]/(K_m + [S])$ para la lacasa usando ABTS como sustrato a 40°C.....</p>	49
<p>Figura 3. Efecto de la adición de (a) etanol (n) y (b) acetonitrilo (ê) sobre la actividad de la lacasa usando ABTS como sustrato a 25 °C.....</p>	40
<p>Figura 4. Voltamperogramas del ABTS oxidado Electroquímicamente Iniciando el barrido de potencial en $E_{i=0}$ y en las direcciones (a) negativa y (b)positiva</p>	42
<p>Figura 5. Voltamperogramas de la solución de ABTS oxidada previamente con la lacasa inmovilizada. Iniciando el barrido de potencial en $E_{i=0}$ y en las direcciones (a) negativa y (b) positiva.</p>	44
<p>Figura 6. Espectros espectrofotométricos obtenidos in situ durante la electrólisis del ABTS a $ABTS^{1+}$ realizada de 0.65 V a 0.7 V/Ag-AgCl con una velocidad de barrido de potencial de 0.05 mV/s espectros UV-Visible registrados cada 30 seg.....</p>	45
<p>Figura 7. Espectros espectrofotométricos obtenidos in situ durante la electrólisis del $ABTS^{1+}$ a $ABTS^{2+}$ realizada de 0.65 V a 0.7 V/Ag-AgCl con una velocidad de barrido de potencial de 0.05 mV/s y espectros UV-Visible registrados cada 30 seg. La solución inicial en este caso fue la resultante de los experimentos mostrados en la figura 6</p>	48
<p>Figura 8a. Espectro de absorción de la mezcla de ABTS/$ABTS^{1+}$ a pH 6.5 producida con la enzima inmovilizada</p>	49

Figura 8b. Espectro de absorción de la mezcla de ABTS/ABTS ¹⁺ producida con la enzima inmovilizada a diferentes valores de pH (a) pH 1.3 (●), (b) pH 8.2 (▲).....	50
Figura 9. Estabilidad de la mezcla ABTS/ABTS ¹⁺ obtenida con la enzima inmovilizada, en presencia de 20 % en volumen de metanol, etanol, isopropanol y acetonitrilo. Después de 1 hora (■,) y de 7 horas (□) de haberse mezclado con el disolvente a 25 °C.....	51
Figura 10. Cromatografía en capa fina de la reacción del índigo con el ABTS ¹⁺ . La mancha "a" corresponde a la lacasa, mancha "b" al índigo, mancha "c" a la reacción de ABTS ¹⁺ + índigo y la mancha "d" corresponde al ABTS ¹⁺	52
Figura 11. Barridos espectrofotométricos de las primeras 13 adiciones de 50 μM de índigo a 43.7 mM de ABTS ¹⁺	53
Figura 12. Barridos espectrofotométricos de las últimas 8 adiciones de 50 μM de índigo a 43.7 mM de ABTS ¹⁺	54
Figura 13. Mecanismo de oxidación del índigo hasta isatín, según Campos y Cavaco (2001).....	55
Figura 14. Velocidad de consumo de 0.05 mM de ABTS ¹⁺ con diferentes cantidades de índigo.....	56
Figura 15. Velocidad de oxidación del índigo con (a) 2 nmoles ABTS ¹⁺ , (b) 4 U de lacasa y (c) 2 nmoles de ABTS ¹⁺ y 4 U de lacasa.....	58

Figura 16. Ciclos periódicos del consumo y re-oxidación de 2.5 nmoles de ABTS ¹⁺ al hacer adiciones de 200 nmoles de índigo en presencia de 4 U de lacasa.....	59
Figura 17. Decoloración de la mezclilla usando ABTS y lacasa.....	61
Figura 18. Variación en el parámetro Lighthness de los tres tratamientos aplicados para decolorar la mezclilla.....	62
Figura 19. Escala de colores para determinar el parámetro Hue.....	62
Figura 20. Variación en el parámetro Hue de los tres tratamientos para decolorar la mezclilla.....	63
Figura 21. Variación en el parámetro Chroma de los trozos de tela sometidos a los tres tratamientos para decolorar la mezclilla.....	63
Figura 22. Medición de DBO en el sistema de tratamiento con lodos aerobios para (a) el agua de desecho de la decoloración de la mezclilla, (b) mezcla de ABTS + lacasa y (c) solución de índigo.....	65
Figura 23. Producción de metano en un sistema de biomasa floculada para el tratamiento de (a) acetato, (b) agua de decoloración de la mezclilla y (c) una solución de índigo.	66
Figura 24. Oxidación de diferentes compuestos usando la mezcla de ABTS/ABTS ²⁺ producida por la lacasa inmovilizada (—), con diferentes compuestos, (●) Compuesto a oxidarse y (▲) Mezcla de cada compuesto con ABTS/ABTS ²⁺	68

Figura 25. Distribución del Sudán II en hexano y agua al ir adicionando etanol.....	72
Figura 26. Cromatografía en capa fina de reacción del Sudán II con el $ABTS'^{+}$ mancha (a) lacasa, mancha (b) Sudán II + lacasa, mancha (c) ABTS reducido + Sudán II, mancha (d) $ABTS'^{+}$ + Sudán II, mancha (e) Sudán II, mancha (f) $ABTS'^{+}$ y (g).ABTS.....	74
Figura 27. Cromatografía del Sudán II y del componente que Reaccionó con el $ABTS'^{+}$ mancha (a) Sudán II, mancha (b) Sudán II + $ABTS'^{+}$ mancha (c) Componente de (a) que reaccionó con el ABTS, mancha (d) la mancha (c) + $ABTS'^{+}$	75
Figura 28. Cromatografía en capa fina del p-cresol con el $ABTS^{**}$, (a) corresponde a la lacasa, la mancha (b) corresponde a la mezcla de p-cresol + $ABTS'^{+}$, la mancha (c) es la mezcla de ABTS reducido + Sudán II y la mancha (d) es solución de ABTS/ $ABTS^{**}$	77
Figura 29. Reacción de p-cresol con $ABTS'^{+}$ en presencia y ausencia de lacasa (a) ABTS 3 mM con enzima, (b) ABTS 1.5 mM con enzima, (c)ABTS 0.6 mM con enzima, (d)ABTS 3 mM sin enzima, (e) ABTS 1.5 mM sin enzima, (f) ABTS 0.6 mM sin enzima.....	79

APENDICE 1

Cálculo de la actividad de la lacasa

1. Se colocó en un tubo de ensaye 0.1 mL de ABTS 5 mM y se le adicionó 0.1 mL de dilución de lacasa 1:100 en buffer acetatos y 8 mL de buffer acetatos.
2. Se preparó un blanco con 0.1 mL de lacasa 1:100 en buffer acetatos, 0.1 mL de agua y 0.8 mL de buffer acetatos.
3. Se ajustó a cero el espectrofotómetro a 414 nm con ayuda del blanco
4. Se midió el cambio de absorbancia a 414 nm de la solución preparada en el punto 1, cada 15 segundos.
5. Usando la ecuación de Lambert y Beer se calculó la actividad de la enzima

$$A = \epsilon Cl.$$

Donde A es la absorbancia, ϵ es el coeficiente de extinción molar, C es la concentración y l la longitud de la celda (paso óptico)

5. La pendiente de la recta es la velocidad inicial de reacción
6. Se calculó la actividad de la enzima considerando la definición de U, cantidad de enzima necesaria para oxidar un mol de sustrato por minuto. Considerando que el coeficiente de extinción molar del ABTS es de 36 mM/min y las diluciones realizadas al preparar la mezcla y la dilución de la enzima.

El ajuste de la recta al graficar la absorbancia contra el tiempo fue:

$$Y = 0.384 \text{ mM/min } (X) + 0.021$$

$$U = \frac{1 \text{ U } (0.384 \text{ mM/min})}{36 \text{ mM/min}} = 0.0107 \text{ U}$$

Considerando que en la mezcla de reacción la enzima se diluyó 1:10 y que la solución inicial de enzima fue de una dilución 1:100, se obtuvo una actividad de:

$$10.7 \text{ U lacasa/mL}$$

A continuación se muestra la serie de valores medidos de absorbancia en el tiempo

Tiempo (s)	Absorbancia a 414 nm
0	0.0177
15	0.1138
30	0.2110
45	0.3086
60	0.4060
75	0.5030
90	0.5996
105	0.6950
120	0.7907
135	0.8857
150	0.9797
165	1.0740
180	1.1672

APENDICE 2

Cálculo de los parámetros cinéticos del modelo de Michaelis Menten

1. Para cada concentración de ABTS se midió la velocidad inicial de consumo, siguiendo los pasos 1 a 6 descritos en el apéndice 1.
2. Se calculó la velocidad inicial con el modelo de Michaelis Menten, ajustando las variables V_{max} y K_m para obtener el mejor ajuste que minimice el error ($V_{experimental} - V_{calculada}$)
3. A continuación se muestra la hoja de cálculo obtenida con el programa Solver de Microsoft Excel

	Modelo Ecuación	$V = V_{max}(S/(S+K_m))$ $V = V_{max} (ABTS)/(ABTS+K_m)$	
Vmax	0.0304	1/min	
Km	0.2	mM	
suma errores	0.00066533		

ABTS mM	Velocidad experimental	v calculada	error
0.0025	0.0138	0.000375309	0.00018022
0.05	0.0194	0.00608	0.00017742
0.075	0.0234	0.008290909	0.00022828
0.25	0.0247	0.016888889	6.1013E-05
0.5	0.0258	0.021714286	1.6693E-05
0.75	0.0253	0.024	0.00000169

El mejor ajuste dio como resultado una $K_m = 200 \mu\text{M}$ y $V_{max} = 0.03 \text{ min}^{-1}$

APENDICE 3

Cálculo de la constante cinética de primero orden para la oxidación del índigo

1. Se mezcló el ABTS con cada una de las concentraciones de índigo probadas y para cada mezcla se midió el cambio de absorbancia a 414 nm con el tiempo.
2. Los valores de absorbancia contra tiempo se ajustaron con ayuda del programa solver, a un modelo de primer orden:

$$\ln(S) = \ln(S_0) - kt$$

De tal forma que se obtuviera el mejor valor de S_0 y de k que ajustó a los valores obtenidos, de tal forma que la diferencia $\ln(S)_{\text{experimental}} - \ln(S)$ calculada fuera mínima.

A continuación se muestra la hoja de cálculo obtenida con el programa Solver de Microsoft Excel

Ajuste de modelo 1er orden

$\ln(\text{abs}) = \ln(\text{abs}_0) - kt$

Ao	-3.3177959
K	5.69E-03
suma error	8.9876E-06
coef correl	0.99990522

tiempo (s)	$\ln(\text{abs})_{\text{exper}}$	$\ln(\text{abs})_{\text{calc}}$	error
0	-3.3174692	-3.32E+00	1.0673E-07
1	-3.3230796	-3.32E+00	1.6773E-07
2	-3.3292644	-3.33E+00	6.7152E-09
3	-3.3347856	-3.33E+00	8.1225E-09
4	-3.3407296	-3.34E+00	2.5792E-08
5	-3.3467092	-3.35E+00	1.9969E-07
6	-3.3509797	-3.35E+00	9.525E-07
7	-3.35734	-3.36E+00	9.5434E-08
8	-3.3625377	-3.36E+00	6.4721E-07
9	-3.369295	-3.37E+00	6.7359E-08
10	-3.3743932	-3.37E+00	1.1265E-07

El valor ajustado de k fue 5.69 $\mu\text{M/s}$

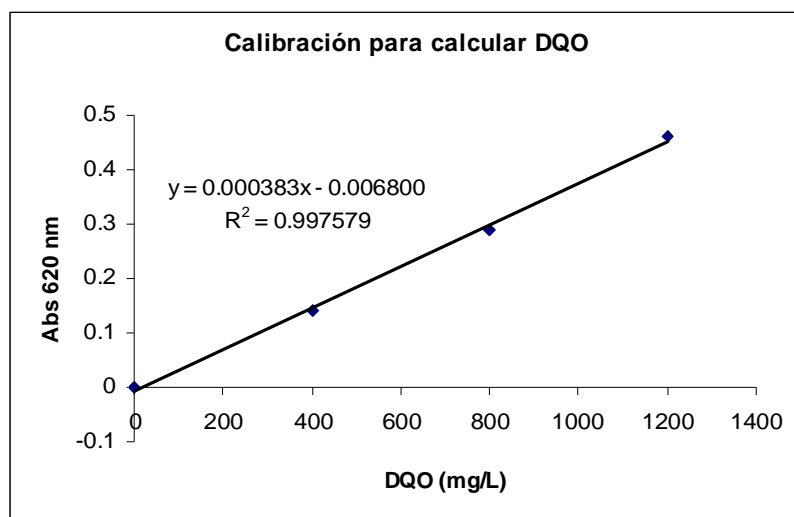
APENDICE 4

Cálculo de la producción de metano

La medición de la producción de metano se realizó por desplazamiento de una solución de NaOH al 3%, durante 72 horas. En seguida se muestra la hoja de cálculo para obtener el acumulado de metano durante las 72 horas para la muestra de agua residual de decoloración de la mezclilla.

FECHA HORA		dt (h)	T	mL de	CH ₄
			acumulado	metano	acumulado
25-Feb-04	18:00	25/02/2004 18:00	0	0.00	0.00
26-Feb-04	10:15	26/02/2004 10:15	16.25	2.20	2.20
26-Feb-04	19:10	26/02/2004 19:10	8.92	2.20	4.40
27-Feb-04	09:50	27/02/2004 09:50	14.67	2.27	6.67
27-Feb-04	20:15	27/02/2004 20:15	10.42	1.91	8.58
28-Feb-04	11:25	28/02/2004 11:25	15.17	1.35	9.93
28-Feb-04	19:00	28/02/2004 19:00	7.58	0.28	10.21

Posteriormente con los cambios de absorbancia de las soluciones problema se calculó la DQO usando la siguiente curva de calibración



Finalmente se calculó por diferencia entre la DQO final y DQO inicial la remoción de DQO que hubo en cada uno de los sistemas

Sistema	Dilución	absorbancia	DQO inicial	DQO final	DQO remoción
agua de decoloración	1	0.105	1000	298.00	702.00
acetatos	1	0.021	1000	77.81	922.19
indigo	1	0.414	1000	1098.69	0.00
ABTS	2	0.139	1000	517.02	482.98
Lacasa	2	0.175	1000	785.00	215.00

BIBLIOGRAFIA

Abadulla E., Tzanov T., Costa S., Robra K., Cavaco P., (2000), Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*, Applied and Environmental Microbiology, 66, pp 3357-3362.

Adlercreutz P. (1991), On the importance of the support material for enzymatic synthesis in organic media. Support effects at controlled water activity. European Journal of Biochemistry, 199, pp. 609-614.

Aliaga C. Lissi E. (2000), A Reactions of the radical cation derived from 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS^{•+}) with amino acids. Kinetics and mechanism. Canadian Journal of Chemistry, 78, pp.1052-1059 .

Balan D., Monteir R. (2001) Decolorization of textile indigo dye by ligninolytic fungi. Journal of Biotechnology, 89, pp. 141-145.

Baohong L. (1997), Characterization of immobilization of an enzyme in a modified zeolite matrix and application to an amperimetric glucose biosensor, Analytical Chemistry, 69, pp. 2343-2348.

Barreca A., Fabbrini M., Galli C., Gentili P., Ljunggren S,(2003), Laccase/mediated oxidation of a lignin model for improved delignification procedures. Journal Molecular Catalysis B-Enzymatic, 26, pp. 105-110.

Bollag J., Shuttleworth K., Anderson D. (1988), Laccase-Mediated Detoxification of phenolic Compounds, Applied and Environmental Microbiology, 54, pp. 3086-3091.

Bourbonnais R., Paice M., (1990), Oxidation of non-phenolic substrates an expanded role for lactase in lignin biodegradation, FEBS, 267, pp 99-102.

Bourbonnais R., Paice M., Freiermuth B., Bodie E., Borneman S. (1997), Reactivities of various mediators and laccases with Kraft pulp and lignin model compounds, Applied and Environmental Microbiology, pp. 4627-4632.

Bourbonnais R., Leech D., Paice M. (1998), Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1379, pp. 381-390.

Campos R., Cavaco-Paul A, (2001), Indigo degradation with laccase from *Polyporus sp. and Sclerotium rolfsii*. *Textile Research Journal*, 71, pp. 420-424.

Chen K., Wua J., Lioua D., Hwang S., (2003), Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains. *Journal of Biotechnology*, 101, pp. 57-68

Collins P., Dobson A., Field J. (1998), Reduction of the 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) action radical by physiological organic acids in the absence and presence of manganese, *Applied and Environmental Microbiology*, 64, pp. 2026-2031.

Colombo J., Cabello M., A. (1996), Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by natural soil microflora and pure cultures of imperfect and lignolytic fungi, *Environmental Pollution*, 94, pp. 355-362.

D'Acunzo, C. Galli, B. Masci, (2002), Oxidation of phenols by laccase and laccase-mediator systems, *European Journal of Biochemistry*, 269, pp 5330-5334.

Duran N., Esposito E., (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review, *Applied Catalysis B Environmental*, 28, pp. 83-99.

Express Textile India's No.1 weekly for the textile industry, march 20, 2003.

Fabbrini M., Galli C., Gentili P., (2002) Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase, *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 16, pp. 231-240.

Fernández-Sánchez A., Tzanko T., Georg M., Gübitzb, Cavaco-Paulo A(2002), Voltammetric monitoring of laccase-catalysed mediated reactions, *Bioelectrochemistry*, 58, pp. 149-156.

Gandolfi C., Obici L., Giatti C., Peralta R.(2004), Decolorization of synthetic dyes by solid state cultures of *Lentinula (Lentinus) edodes* producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzyme, *Bioresource Technology*, 94, pp.107-112.

García H., Vázquez-Duhalt R(1998),. Cuantificación de proteínas: una revisión, *Bio – Tecnología*, 3, pp. 77-88.

Gouka R., M. Van der Heiden,. Swarthoff, T Verrips C(2001), Cloning of a Phenol Oxidase Gene from *Acremonium murorum* and Its Expression in *Aspergillus awamori*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, pp. 2610-2616.

Greca M., Costa-Ferreira M., Pessoa M. (a2001), Decolorization of an anthraquinone-type dye using a laccase formulation, *Bioresource Technology*, 79, pp. 171-177.

Greca M., Pessoa M., Costa Ferreira M. (b2001), Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R. *Journal of Biotechnology*, 89, pp.123-129.

Greca M., Pessoa M., Oliveira-Campos A., Hrdina R., Costa-Ferreira M (a2002), Specificity of phenolic disazo dyes in relation to transformation by laccase, *Enzyme and Microbial Technology*, 30, pp. 607-612.

Greca M., Pessoa M., Hirdina R., Costa-Ferreira M (b2002), Studies on the transformation of novel disazo dyes by laccase, *Process Biochemistry*, 37, pp. 581-587.

Henriquez C., Aliaga C., Lissi E. (1998), Kinetics profiles in the reaction of ABTS derived radicals with simple phenols and polyphenols. *Catalysis B: Environmental*, 18, pp. 307-315

Ho G., Liao Ch. Activation of a siliceous carrier for enzyme immobilization. 1983 United States Patent 4,384,045.

Johannes Ch., Majcherczyk A. (2000), Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator system, *Applied and Environmental Microbiology*, 66, pp. 524-528.

Johannes Ch., Majcherczyk A. (2000), Laccase activity tests and laccase inhibitors. *Journal of Biotechnology*, 78, pp. 193-199

Kim Y., Cho N., Eom T., Shin W., (2002), Purification and characterization of a laccase from *Cerrena unicolor* and its reactivity in lignin degradation, *Bull. Korean Chemistry Society*, 23, pp. 985–989.

Li K., Helm R., Eriksson K. (1998), Mechanistic studies of the oxidation of a non-phenolic lignin model compound by the laccase/I-hydroxibenzotriazole redox system, *Biotechnology Applied Biochemistry*, 27, pp. 239-243.

Lonergan G., Mew E., Schliephake K., Baker W., (1997), Phenolic substrate for fluorometric detection of laccase activity. *FEMS Microbiology Letters*, 153, pp. 485-490.

Medina A., Salagre P., Fabregat A., Sueiras J. (2004), Characterization and activity of copper and nickel catalysts for the oxidation of phenol aqueous solutions. *Journal of the Chilean Chemical Society*. 49, pp. 307-315.

McGuirl M., Dooley D., Cooper (1999), containing oxidases, *Current Opinion in Chemical Biology*, 3, pp. 138-144.

Muñoz C., Guillen F., Martinez A., Martinez M., (1997), Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngu*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn⁺² oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, pp. 2166-2174.

Muralikrishna Ch., Renganathan V., (1995), Phenolic azo dye oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae*, *Applied and Environmental Microbiology*, 61, pp. 4374-4377.

Nishimura N. (1989). Enzyme immobilization on a water insoluble amino group containing carrier. United States Patent no. 4 888 285,

Olson L., Gladfelter E., Burch W. (1993), Decolorizing dyed fabric or garments, United States Patent 5,268,002.

Ota M., Nakamura M., Kamiyama T. (1994), Method for bleaching cloths, United States Patent 5,366,509.

Pereira E. Durran L. (2001), Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*, *Enzyme and Microbial Technology*, 29, pp. 473-477.

Raven E., Çelik A., Cullis P. M., Sangar R. y Sutcliffe M. (2001) J. Engineering the active site of ascorbate peroxidase. *Biochem. Soc. Trans.* 29, pp.105–111

Rodríguez E., Pickard M., Vazquez-Duhalt R., (1999), Industrial dye decolorization by laccase from ligninolytic fungi, *Current Microbiology*, 38, pp. 27-32.

Rohrbach N. (1981), Preparation of support matrices for immobilized enzymes. United States Patent no. 4,250,080,

Susannab L., Wen-Jang Ch. Andreja J. y James H. (1993) Spectroscopic Parameters, Electrode Potentials, Acid Ionization Constants, and Electron Exchange Rates of the 2,2--Azinobis(3-ethylbenzothiazolineine-6-sulfonate) Radicals and Ions, *Journal of. Physic and Chemistry.* 97, pp. 6710-6714.

Sima S. (1989), Microbial enzymes for oxidation of organic molecules. *Critical Reviews in Biotechnology*, 9, pp. 171-257.

Soares G., Costa-Ferreira M., Pessoa de Amorim M. (2001), Decolorization of an anthraquinone-type dye using a laccase formulation, *Bioresource Technology*, 79, pp. 171-177.

Tan N., Lettinga G., Field J. (1999), Reduction of the azo dye mordant orange I by methanogenic granular sludge exposed to oxygen. *Bioresource Technology*, 67, pp. 35-42.

Tan N., Prenafeta-Boldú F., Opsteeg J., (1999),. Biodegradation of azo dyes in cocultures of anaerobic granular sludge with aerobic aromatic amine degrading enrichment cultures. *Applied Microbiology Biotechnology*, 51, pp. 865-871.

Thurston Ch., (1994), The structure and function of fungal laccase, review article. *Microbiology*, 140, pp.19-26.

Tiller J., Berlin P., Klemm D., (1999), A novel efficient enzyme-immobilization reaction on NH₂ polymers by means of L-ascorbic acid. *Biotechnology Applied Biochemistry* 30, pp. 155-162

Tzanov T., Jurgen A., Guebitz G., Cavaco-Paulo A. (2003). Review article: Protein interaction in enzymatic processes in textiles. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6

Vandertol-Vanier H., Vazquez-Duhalt R., Tinoco R., Pickard M. (2002), Enhanced activity by poly (ethylene glycol) modification of *Coriolopsis gallica* laccase. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 29, pp.214-220.

Villaseñor F. (mayo del 2004), Tesis de doctorado en Biotecnología: Oxidación del dibenzotiofeno mediante los sistemas lacasa-ABTS o acido fosfotúngstico-peróxido de hidrógeno y desulfuración oxidativa del diesel, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, México.

Wang D., Cooney C., Demain A., Dunill P., Humphrey A., Lilly M., (1979), Fermentation and enzyme technology. John Wiley and Sons Inc, New York.

Wariishi H., Kabuto M., Mikuni J., Oyadomari M., Tanaka H. (2002), Degradation of water insoluble dyes by microperoxidase-11, an effective and stable peroxidase catalyst in hydrophilic organic media. *Biotechnology Progress*, 18, pp. 36-42

Wesenberg D., Kyriakides I., Agathos S. (2003), White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents *Biotechnology Advances*, 22, pp. 161-187

Wong Y., Yu J. (1999), Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes, *Water Research*, 33, pp. 3512-3520

Xu F. (1996), Oxidation of phenols, anilines and benzenethiols by fungal laccase: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition, *Biochemistry*, 35, pp. 7608-7614

Yaropolov A., Skorobogatko O., Vartanov S., Varfolomeyev S. (1994), Laccase properties, catalytic mechanism and applicability. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 49, pp. 257 –276.

Zinola, C., *Electroquímica Fundamental*, Cap. 5, (DIRAC, eds.) 1999, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, CSIC.