

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

**OXIDACIÓN ENZIMÁTICA DE SUBSTRATOS
UTILIZANDO DIVERSOS MEDIADORES**

TESIS

Para obtener el grado de Maestra en Biotecnología

PRESENTA

María de los Angeles Castro Sampablo

Director

Dr. Gustavo Viniegra González

Diciembre de 2005

**La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana
esta incluida en el Padrón Nacional de Posgrado del CONACYT y además cuenta con
el apoyo del mismo Consejo, con el No. de Registro 0471-0**

Iztapalapa, D. F. a 9 de Diciembre de 2005

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la
tesis

Oxidación enzimática de substratos utilizando diversos mediadores

que presentó

María de los Angeles Castro Sampablo

Comité Tutorial:

Director: Dr. Gustavo Viniegra González

Asesor: Dr. Ignacio González Martínez

Asesor: Dr. Octavio Loera Corral

Jurado:

Presidente: Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

Secretario: Dr. Ignacio González Martínez

Vocal: Dr. Octavio Loera Corral

Vocal: Dr. Víctor Manuel Ugalde Saldívar

ÍNDICE

<i>Contenido</i>	<i>Página</i>
Resumen	1
CAPÍTULO I	2
1.1 INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO II	5
2.0 ANTECEDENTES	5
2.1 IMPACTO AMBIENTAL	5
2.2 EFLUENTES	5
2.3 BIOTECNOLOGÍA Y ALTERNATIVAS	6
2.4 ENZIMAS	7
2.4.1 Nomenclatura y clasificación de las enzimas	8
2.4.2 Cofactores enzimáticos	9
2.5 CATÁLISIS ENZIMÁTICA	9
2.5.1 Ecuación de Michaelis-Menten	9
2.5.1.1 <i>TRANSFORMACIONES DE LA ECUACIÓN DE MICHAELIS-MENTEN</i>	13
2.5.1.2 <i>EFEECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA</i>	14
2.5.1.3 <i>EFEECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LAS REACCIONES ENZIMÁTICAS</i>	14
2.6. ENZIMAS QUE CONTIENEN SITIOS DE COBRE	15
2.6.2.2 <i>LACASAS</i>	16
2.6.2.2.1 <u>Detección y purificación de la lacasa</u>	16
2.6.2.2 <i>PROPIEDADES MOLECULARES DE LA LACASA</i>	18
2.6.2.3 <i>ENZIMOLOGÍA DE LA LACASA</i>	19
2.6.2.4 <i>PREPARACIÓN DE LA LACASA</i>	22
2.7 APLICACIONES DE LA LACASA	23
2.7.1 Biocatálisis industrial	23
2.7.1.1 <i>DELIGNIFICACIÓN DE COMPUESTOS LIGNINOCELULÓSICOS</i>	23

2.7.1.2 <i>ENTRECRUZAMIENTO DE POLISACÁRIDOS CON LACASA</i>	23
2.7.1.3 <i>DETOXICACIÓN Y DESCONTAMINACIÓN DE DESECHOS POR ACCIÓN DE LA LACASA</i>	24
2.7.1.4 <i>TRANSFORMACIÓN DE COLORANTES TEXTILES POR ACCIÓN DE LACASA</i>	25
2.7.1.5 <i>APLICACIONES DE LA LACASA EN LA MEDICINA</i>	25
2.7.1.6 <i>APLICACIONES DE LACASA EN BIOCENSORES Y DIAGNÓSTICO</i>	26
2.7.1.6.1 <u>DetECCIÓN DE FENOLES, ANILINAS, OXÍGENO Y OTRAS SUSTANCIAS</u>	26
2.7.1.7 <i>ENSAYOS INMUNOQUÍMICOS Y ENZIMÁTICOS CON LACASA</i>	27
2.7.1.8 <i>SÍNTESIS ORGÁNICA Y MEDICINAL CATALIZADA POR LACASA</i>	27
2.7.2 <i>Otras aplicaciones</i>	28
2.7.2.1 <i>TRATAMIENTO DE BEBIDAS Y ALIMENTOS</i>	28
2.7.2.2 <i>DESULFURACIÓN DE COMBUSTIBLES FÓSILES</i>	28
2.7.3 <i>Métodos de aplicación de la lacasa</i>	29
2.8 <i>APLICACIONES CON MEDIACIÓN DE COMPUESTOS REDOX</i>	29
2.8.1 <i>Mediadores redox</i>	29
2.8.2 <i>Aplicaciones del sistema los mediadores redox</i>	31
2.9 <i>VENTAJAS DE LA APLICACIÓN DE LA LACASA</i>	32
2.10 <i>PERSPECTIVAS DE LA APLICACIÓN DE LA LACASA</i>	32
CAPÍTULO III	34
3.0 <i>HIPÓTESIS</i>	34
3.1 <i>OBJETIVO GENERAL</i>	34
3.2 <i>OBJETIVOS PARTICULARES</i>	34
CAPÍTULO IV	35
4.0 <i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	35
4.1 <i>REACTIVOS</i>	35
4.2 <i>TÉCNICAS ANALÍTICAS</i>	36
4.2.1 <i>Análisis cuantitativo</i>	36
4.2.1.1 <i>ENZIMA LACASA</i>	37

4.2.1.1.1 <u>Lacasa libre</u>	37
4.2.1.1.1.1 Soluciones amortiguadoras	37
4.2.1.1.1.2 Determinaciones cinéticas	37
4.2.1.1.2 <u>Lacasa inmovilizada</u>	37
4.2.1.1.2.1 Inmovilización de la enzima	37
4.2.1.1.2.1 Determinaciones cinéticas	37
4.2.2 Análisis cualitativo	37
4.2.2.1 <i>CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA</i>	37
4.2.2.2 <i>CARACTERIZACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA</i>	38
4.3 ENZIMA LACASA	38
4.3.1 Purificación de la lacasa	38
4.3.2 Lacasa libre	39
4.3.2.1 <i>PREPARACIÓN DE LACASA LIBRE</i>	39
4.3.2.2 <i>DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA</i>	39
4.3.2.3 <i>DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD Y DE PARÁMETROS CINÉTICOS</i>	39
4.3.3 Lacasa inmovilizada	41
4.3.3.1 <i>FABRICACIÓN DEL SOPORTE (CRISTALES) DE SÍLICA GEL</i>	41
4.3.3.2 <i>INMOVILIZACIÓN DE LA ENZIMA LACASA EN EL SOPORTE DE SÍLICA GEL</i>	41
4.3.3.3 <i>DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD Y DE PARÁMETROS CINÉTICOS</i>	42
4.4 MEDIADORES Y SUBSTRATOS	42
4.4.1 Caracterización electroquímica	42
4.4.2 Caracterización espectrofotométrica	43
4.5 SISTEMA LACASA-MEDIADOR	44
4.5.1 Lacasa libre-mediador	44
4.5.2 Lacasa inmovilizada en soporte de sílica-mediador	44
4.6 SISTEMA MEDIADOR-SUBSTRATO	45
4.7 ESTEQUIOMETRÍA DE LA REACCIÓN MEDIADOR-SUBTRATO	45
CAPÍTULO V	46
5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46

5.1 PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA LACASA	46
5.2 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA	46
5.3 ENZIMA LIBRE EN SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE ACETATOS	46
5.3.1 Determinación de actividad	46
5.3.2 Determinación de parámetros cinéticos	48
5.4 ENZIMA LACASA INMOVILIZADA EN SOPORTE DE SÍLICA GEL	53
5.4.1 Determinación de actividad y cantidad de proteína	54
5.4.2 Determinación de parámetros cinéticos	55
5.5 MEDIADORES Y SUBSTRATOS	58
5.5.1 Caracterización electroquímica	58
5.5.1.1 <i>MEDIADORES</i>	59
5.5.1.1.1 <u>Voltamperogramas de ABTS</u>	59
5.5.1.1.2 <u>Voltamperogramas del <i>p</i>-cresol</u>	61
5.5.1.1.3 <u>Voltamperogramas de sulfato ferroso</u>	63
5.5.1.1.4 <u>Voltamperogramas de la hidroquinona</u>	64
5.5.1.1.5 <u>Voltamperogramas del ácido tánico</u>	66
5.5.1.1.6 <u>Voltamperogramas de la ferroína</u>	67
5.5.1.2 <i>SUBSTRATOS</i>	69
5.5.1.2.1 <u>Voltamperogramas del índigo</u>	70
5.5.1.2.2 <u>Voltamperogramas del aminoazotolueno</u>	71
5.6 CARACTERIZACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA	73
5.6.1 Mediadores	74
5.6.1.1 Espectro de absorción electrónica ultravioleta-visible del ABTS	74
5.6.1.2 Espectro de absorción electrónica ultravioleta-visible de la hidroquinona	74
5.6.1.3 Espectro de absorción electrónica ultravioleta-visible de la ferroína	75
5.6.2 Espectros de absorción electrónica ultravioleta-visible de substratos	77
5.6.1.4 Espectro de absorción electrónica ultravioleta-visible del índigo	77
5.6.1.5 Espectro de absorción electrónica ultravioleta-visible del aminoazotolueno	78
5.7 SISTEMA LACASA-MEDIADOR	79
5.7.1 Sistema lacas libre-mediador	79
5.7.2 Sistema lacasa inmovilizada-mediador	82

5.8 SISTEMA MEDIADOR-SUBSTRATO	84
CAPÍTULO VI	85
6.0 CONCLUSIONES	85
CAPÍTULO VII	86
7.0 BIBLIOGRAFÍA	86

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura</i>	<i>Descripción</i>	<i>Página</i>
Figura 1	Estructura y ciclo catalítico de la enzima lacasa	21
Figura 2	Representación gráfica de los datos experimentales de absorbancia a 728 nm como función del tiempo, para la determinación de la actividad de lacasa (libre) empleando ABTS como sustrato en disolución de acetatos 0.1 M a pH=5	48
Figura 3	Representación gráfica característica de la ecuación de M-M, que indica la variación de la velocidad inicial (V_0 en mM/min) con respecto a [ABTS en mM], para la determinación de los parámetros cinéticos K_m y V_{max} , en la reacción enzimática de lacasa libre con ABTS en concentraciones variables, en una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH= 5.	49
Figura 4	Gráfica del recíproco de la ecuación de Michaelis-Menten (tratamiento de Linewaver-Burk), para la evaluación de K_m y V_{max} en la reacción de lacasa libre con ABTS	50
Figura 5	Sistema lacasa-mediador-sustrato (L-M-S)	57
Figura 6	Esquema de potenciales redox del sistema L-M-S	57
Figura 7	Estructura de los compuestos seleccionados como posibles mediadores y sustratos.	58
Figura 8	Representación gráfica de los potenciales de la lacasa y del mediador	59
Figura 9	Voltamperogramas cíclicos típicos del ABTS 0.4 mM a 100 mV/s sobre un electrodo de carbón vítreo (0.706 cm ²) empleando como electrolito soporte, una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH= 5, iniciando el barrido de potencial en dirección (a)— positiva y (b) ----negativa.	60
Figura 10	Voltamperogramas cíclicos típicos del <i>p</i> -cresol 1 mM a 100 mV/s sobre un electrodo de carbón vítreo (0.706 cm ²) empleando como electrolito soporte, una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH= 5, iniciando el barrido de potencial en dirección (a)— positiva y (b) ----negativa.	62
Figura 11	Voltamperogramas cíclicos típicos del FeSO ₄ 1 mM a 100 mV/s sobre un electrodo de carbón vítreo (0.706 cm ²) empleando como electrolito soporte, una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH= 5, iniciando el barrido de	64

	potencial en dirección (a)— positiva y (b) ----negativa.	
Figura 12	Voltamperogramas cíclicos típicos de hidroquinona 1 mM a 100 mV/s sobre un electrodo de carbón vítreo (0.706 cm ²) empleando como electrolito soporte, una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH= 5, iniciando el barrido de potencial en dirección (a)— positiva y (b) ----negativa.	65
Figura 13	Voltamperogramas cíclicos típicos del ácido tánico 1 mM a 100 mV/s sobre un electrodo de carbón vítreo (0.706 cm ²) empleando como electrolito soporte, una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH= 5, iniciando el barrido de potencial en dirección (a)— positiva y (b) ----negativa.	67
Figura 14	Voltamperogramas cíclicos típicos del ferroína 1 mM a 100 mV/s sobre un electrodo de carbón vítreo (0.706 cm ²) empleando como electrolito soporte, una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH= 5, iniciando el barrido de potencial en dirección (a)— positiva y (b) ----negativa	68
Figura 15	Voltamperogramas cíclicos típicos del índigo 1 mM a 100 mV/s sobre un electrodo de carbón vítreo (0.706 cm ²) empleando como electrolito soporte, una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH= 5, iniciando el barrido de potencial en dirección (a)— positiva y (b) ----negativa..	70
Figura 16	Voltamperogramas cíclicos típicos del aminoazotolueno 1 mM a 100 mV/s sobre un electrodo de carbón vítreo (0.706 cm ²) empleando como electrolito soporte, una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH= 5, iniciando el barrido de potencial en dirección (a)— positiva y (b) ----negativa.	72
Figura 17	Espectro de absorción electrónica ultravioleta-visible del ABTS	74
Figura 18	Espectro de absorción electrónica ultravioleta-visible de la hidroquinona	75
Figura 19	Espectro de absorción electrónica ultravioleta-visible de la ferroína	76
Figura 20	Espectro de absorción electrónica ultravioleta-visible del índigo	77
Figura 21	Espectro de absorción electrónica ultravioleta-visible del aminoazotolueno	78
Figura 22	Espectro de absorción electrónica ultravioleta-visible de la reacción ferriína con índigo evaluada a 613 nm y a 508 nm, longitudes de onda características de cada compuesto.	85
Figura 23	Gráfica de absorbancia a 513 nm (UA) contra el volumen de índigo 2.4 X10 ⁻¹ M (μL), adicionado en cantidades estequiométricas a una disolución de ferriína	86

2×10^{-4} M, ambos preparados en una disolución reguladora de acetatos 0.1 M a pH= 3.7. El coeficiente estequiométrico se indica gráficamente y su valor es de 4.21 a 513 nm de longitud de onda.

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla</i>	<i>Descripción</i>	<i>Página</i>
Tabla 1	Clasificación de las enzimas que contienen cobre	15
Tabla 2	Bacterias, hongos e insectos que presentan actividad de lacasa	17
Tabla 3	Algunas propiedades de los reactivos líquidos utilizados.	35
Tabla 4	Algunas propiedades de los reactivos sólidos utilizados.	36
Tabla 5	Valores de K_m , V_{max} y k_{cat} , para la enzima libre empleando ABTS como sustrato, en disoluciones reguladoras de acetatos 0.1 M a pH=5.0, 4.0 y 3.7.	55
Tabla 6	Actividad y contenido de proteína para diferentes cantidades de soporte con lacasa utilizando como sustrato ABTS	54
Tabla 7	Valores de K_m y k_{cat} obtenidos para la enzima lacasa inmovilizada en soporte de sílica empleando ABTS como sustrato y disoluciones reguladoras de acetatos 0.1 M a pH= 5.0, 4.0 y 3.7.	56
Tabla 8	Datos experimentales de actividad para lacasa libre e inmovilizada en soporte de sílica, a pH= 5.0, 4.0 y 3.7.	56
Tabla 9	Potenciales redox determinados para los compuestos que pueden funcionar como mediadores en una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH= 5.0.	69
Tabla 10	Potenciales redox determinados para los compuestos que pueden funcionar como sustratos en una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH= 5.0.	73
Tabla 11	Longitudes de onda (nm) de máxima absorción de mediadores, en el espectro de absorción electrónica ultravioleta-visible.	76
Tabla 12	Longitudes de onda de máxima absorción de sustratos, en el espectro de absorción electrónica ultravioleta-visible	79
Tabla 13	Parámetros cinéticos experimentales para la reacción lacasa libre-hidroquinona, lacasa libre-ferroína y lacasa libre-ABTS, determinados en una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH=5.0, 4.0 y 3.7.	80
Tabla 14	Parámetros cinéticos experimentales para la reacción lacasa inmovilizada-hidroquinona, lacasa inmovilizada-ferroína y lacasa inmovilizada-ABTS, determinados en una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH=5.0, 4.0 y 3.7.	83
Tabla 15	Eficiencias [k_{cat}/K_m (mMmin) ⁻¹] de la lacasa libre y lacasa inmovilizada en sílica	84

utilizando como substrato ABTS, ferroína e hidroquinona, en una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH= 5, 4 y 3.7.

RESUMEN

Los colorantes empleados en la industria textil para dar el acabado final a sus productos, son en general de origen sintético, los cuales resultan de difícil degradación debido a la complejidad química presentan, e inclusive los productos de descomposición resultan ser sustancias tóxicas. La resolución de este problema, considera procesos físicos y químicos en el tratamiento de efluentes, sin embargo los resultados obtenidos han sido poco satisfactorios. Por esta razón, se recurre al uso de la enzima lacasa, como alternativa en el tratamiento de efluentes. La lacasa es una fenoloxidasa (1.10.3.2), que actúa sobre substratos fenólicos y su eficiencia se incrementa con la utilización de mediadores como el ABTS y el HBT. Estos compuestos son eficientes gracias por un lado a su tamaño molecular, que les permite difundir más rápidamente hacia el centro activo de la enzima y, por otro al valor adecuado de potencial redox. Estas características favorecen la velocidad de reacción con el substrato e incrementan la variedad de substratos sobre los que actúa el sistema enzima-mediador.

En consecuencia, la efectividad del sistema lacasa-mediador-substrato depende de los procesos redox involucrados en la selección de cada uno de ellos. Por lo que es conveniente realizar una caracterización electroquímica de los posibles mediadores y substratos, para discriminar cuales de ellos pueden considerarse para los estudios cinéticos complementarios. Dado el alto costo de los mediadores como ABTS y HBT, en este trabajo se muestran los criterios seguidos para la selección de compuestos alternativos y de bajo costo, que tengan posibilidades de funcionar como mediadores. La selección de estos compuestos y de posibles substratos se realizó empleando voltamperometría cíclica y espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-Vis).

De los resultados obtenidos, y a partir de los criterios de selección utilizados, se encontró que la hidroquinona y la ferroína, podrían funcionar como mediadores. Sin embargo, de estos mediadores, solamente la ferroína presenta una eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) a pH= 3.7 superior a la observada con ABTS a pH= 4 y 5. los resultados catalíticos positivos obtenidos para la ferroína, en comparación con el ABTS, permiten validar los criterios de selección propuestos en este trabajo, para explorar la utilización de un nuevo grupo de compuestos, que puedan presentar eficiencias catalíticas superiores a las del ABTS.

CAPÍTULO I

1.0 INTRODUCCIÓN

La industria textil se caracteriza por utilizar gran cantidad de colorantes para dar el acabado final a sus productos, los cuales incluyen prendas de vestir, telas, tejidos, hilos y estambres. Los colorantes empleados son generalmente compuestos químicamente complejos generados a través de procesos químicos sintéticos que utilizan sustancias orgánicas, inorgánicas, aminoácidos y péptidos [1-4]. Una vez que estos colorantes han sido utilizados y sus residuos se incorporan a los efluentes de la industria textil, son difíciles de degradar debido a su complejidad y llegan a constituir una fuente importante de contaminación [2, 3]. Los métodos convencionales empleados por la industria textil para degradar a los colorantes utilizados son poco eficientes, lo que ha motivado la búsqueda de alternativas que involucren procesos biodegradables. A mediados de los años 90's se implementó la eliminación de los colorantes de los efluentes provenientes de la industria textil, por métodos biológicos que utilizaban bacterias en condiciones anaerobias [5-7]. Sin embargo, este proceso resultó costoso y poco eficiente, por lo que se recurrió al empleo de enzimas, siendo particularmente utilizada la enzima lacasa para la biodegradación de colorantes [3, 8-29].

La lacasa es una enzima producida principalmente por hongos y plantas; esta enzima ha sido identificada y clasificada como *p*-fenol oxidasa (EC 1.10.3.2), forma parte del grupo de enzimas denominado proteínas azules de cobre, por los cuatro centros activos que contiene de este elemento. Tiene habilidad para oxidar compuestos fenólicos en presencia de oxígeno que, posteriormente es reducido para formar agua, además de generar radicales como productos finales de la reacción catalizada [24-39]. En 1990 Bourbonnais y colaboradores, al trabajar en procesos de delignificación en la industria del papel, demostraron que la actividad de la enzima podría extenderse hacia sustratos no fenólicos, por medio de la adición de compuestos de bajo peso molecular y generalmente de origen orgánico, a los que se denominó mediadores. Esto permitió el uso de la enzima en diversos procesos como la conservación de alimentos, tratamiento de vinos, eliminación de contaminantes como los fenoles, plaguicidas e hidrocarburos que se encuentran en el suelo,

procesos de deslignificación en la industria del papel y la madera, decoloración de efluentes textiles entre otros [24-29,40-51].

Algunos de los trabajos realizados en colorantes de uso en la industria textil, indican la utilización de la enzima lacasa de *Trametes hirsuta* para oxidar azocolorantes (azul 71 y negro 5), en donde se informa que la actividad oxidativa de la enzima fue de un 20 %, porcentaje que llegó hasta un 80% cuando se empleó como mediador 1-hidroxibenzotriazol (HBT) y el ácido 2,2' azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato de amonio) (ABTS) [19, 26, 49-51,53]. Solís en 2004 realizó la oxidación del colorante índigo en condiciones de laboratorio utilizando la enzima lacasa de *Myceliophthora termophila* clonada en *Aspergillus oryzae* y como mediador el ABTS [52].

El ABTS es el compuesto más utilizado como mediador y está ampliamente informado en la literatura, se caracteriza por presentar las siguientes ventajas: (1) incrementa el intervalo de sustratos sobre los que actúa la enzima, (2) acelera la velocidad de las reacciones que cataliza la lacasa y (3) la cantidad de sustrato transformada con relación a la cantidad de mediador empleada es grande, indicando que se trata de un mediador sumamente eficiente. Sin embargo, es un compuesto muy costoso, por lo que es necesario encontrar mediadores que lleven a cabo el mismo esquema de reacción que realiza el ABTS, pero que sea de menor costo y que conserve las ventajas de este compuesto. En la literatura se reporta el sistema lacasa-mediador-sustrato (L-M-S), que es el esquema de trabajo en el que se integra el ABTS; en éste se indica que la enzima es oxidada por acción del oxígeno por extracción de un par de electrones generando una molécula de agua. La lacasa después de ser oxidada actúa sobre el mediador reducido extrayendo un electrón y este mediador así oxidado es el que actúa sobre el sustrato (colorante) reducido, oxidándolo también por extracción de un electrón. El mediador recupera su electrón, reduciéndose nuevamente, y de esta forma, se encuentra disponible para ser oxidado nuevamente por la lacasa, integrándose posteriormente a un ciclo catalítico con la enzima.

En este trabajo se propuso que para que este esquema funcionara adecuadamente para la reacción lacasa-mediador-sustrato, debía de satisfacer la condición energética de los potenciales redox (E) que se definió como: potencial redox de lacasa (E_{lacasa}) mayor que el

potencial del mediador ($E_{mediador}$) y éste a su vez mayor que el potencial del sustrato ($E_{sustrato}$). Entonces para seleccionar un mediador y un sustrato adecuado, se propone evaluar los potenciales redox de compuestos químicos susceptibles de ser utilizados como mediadores y como sustratos.

La evaluación experimental de los potenciales redox de los diferentes compuestos se realizó en medio acuoso en el que son estables, el estudio se llevó a cabo utilizando voltamperometría cíclica.

De los diferentes compuestos químicos estudiados se seleccionaron grupos de mediadores y de sustratos que cumplieran el orden de potencial redox propuesto en este trabajo.

Los compuestos seleccionados se caracterizaron espectrofotométricamente, para seleccionar las zonas libres de interferencias espectrales, región en donde se evaluarían posteriormente las reacciones lacasa-mediador y mediador-sustrato. Por otro lado, se hizo la caracterización enzimática de la lacasa en estado libre en una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH= 5, 4 y 3.7 e inmovilizada en un soporte de sílica.

Con estos resultados, se realizó la caracterización de las reacciones lacasa-mediador y mediador-sustrato, determinándose los parámetros cinéticos propios de cada reacción.

CAPÍTULO II

2.0 ANTECEDENTES

2.1 IMPACTO AMBIENTAL

Los compuestos aromáticos, incluyendo fenoles y aminas aromáticas, constituyen una de las principales clases de contaminantes y son estrictamente regulados en varios países. Una gran diversidad de estas sustancias se han encontrado en los efluentes de una amplia variedad de industrias como: la de conversión del carbón; refinerías de petróleo; fábricas de resinas y plásticos; tratamiento de madera; industria metalúrgicas; fábricas de colorantes, pigmentos y compuestos químicos; industrias textiles e industria de la pulpa y del papel. La mayor parte de los compuestos aromáticos son tóxicos y deben de removerse de los efluentes antes de descargarlos al ambiente [47-51].

2.2 EFLUENTES

La industria textil utiliza alrededor de 1×10^7 toneladas de colorantes por año en todo el mundo, estos colorantes son compuestos sintéticos, estructuralmente complejos y difíciles de degradar. La aplicación de estas sustancias a los productos finales de la industria textil, implica la eliminación del exceso de colorante, con la correspondiente incorporación a los efluentes industriales. El tratamiento posterior de estos colorantes presentes, tiene como objetivo principal eliminar la coloración y disminuir la toxicidad [1-4].

Los tratamientos convencionales aplicados a los efluentes de la industria textil, están basados en los métodos fisicoquímicos de separación, la filtración, coagulación-filtración, precipitación-evaporación y precipitación por adición de compuestos químicos, lo que en algunos casos origina otro tipo de problemas asociados a los colorantes que se tratan, la filtración, coagulación-filtración, precipitación-evaporación. Estos tratamientos presentan las siguientes características: tiempos de retención, al aplicar el reactivo precipitante o solvente, al modificar la temperatura y pH; presencia de reacciones colaterales, cuando se trata una mezcla de colorantes; las velocidades de degradación de colorantes son muy variables dependiendo de tipo de colorante, por lo tanto el tiempo de procesamiento no está regulado; y finalmente, los costos de los tratamientos son altos. Estas características determinan la economía del proceso

y el tiempo total del mismo. La eficiencia que tienen estos sistemas es de alrededor del 70 % en promedio [48-50].

Otro de los aspectos relevantes de estos sistemas y que es posterior al tratamiento de los efluentes, se refiere a la generación de productos y sustancias derivadas aún más tóxicas, que los colorantes tratados. El caso más sobresaliente es el tratamiento de los azocolorantes (enlace azo $N=N$), en donde el proceso de decoloración elimina entre un 60 y 70 % del colorante, sin llegar a la mineralización total del compuesto, y además favorece la formación de aminas, que son compuestos orgánicos altamente tóxicos y sobre todo carcinogénicos. Lo anterior demuestra que algunos de los procesos aplicados al tratamiento de fluentes en la industria textil, además de resultar poco eficientes pueden llegar a generar sustancias más tóxicas que las sometidas a tratamiento [24, 25, 81].

Esta eficiencia es considerada poco satisfactoria para la industria y se ha buscado otras alternativas para el tratamiento de sus efluentes; entre estas alternativas se encuentra la aplicación de bacterias, para la degradación de los colorantes, lo que puede realizarse solo en condiciones anaerobias, por otra parte este proceso genera acumulación de biomasa y tiempos largos de retención, comparados con los métodos convencionales [4-7]. Algunos trabajos informan que la aplicación de bacterias anaerobias no es factible cuando se tratan efluentes en donde se encuentran mezclas de colorantes, ya que las bacterias actúan de forma muy específica sobre los grupos cromóforos y posteriormente degradan el colorante. En general los tratamientos que emplean bacterias anaerobias son más largos que los tratamientos convencionales, su eficiencia es menor y el costo del tratamiento es más alto [5-7].

2.3 BIOTECNOLOGÍA Y ALTERNATIVAS

Durante las últimas décadas se han desarrollado nuevas tecnologías, entre ellas, se encuentra a la biotecnología y uno de los aspectos más importantes de esta área es la aplicación de las enzimas. Existen múltiples investigaciones acerca de las nuevas posibilidades que ofrecen las enzimas para el tratamiento de desechos y residuos sólidos presentes en los efluentes industriales. Las razones del interés en los procesos enzimáticos son las siguientes: (1) la velocidad de introducción de compuestos xenobióticos y recalcitrantes orgánicos se incrementa de forma alarmante, y la estabilidad de estos compuestos contaminantes dificulta

su remoción del efluente, cuando se emplean métodos químicos convencionales y procesos biológicos. Esto indica que es necesario el desarrollo de métodos alternativos de tratamiento que sean más rápidos, económicos, sencillos de implementar y de acoplarse a procesos de degradación; (2) hay un interés creciente en el uso de las enzimas para el tratamiento específico de contaminantes atribuible a su gran selectividad, y (3) los recientes avances en la biotecnología permiten la producción de enzimas de bajo costo, de mayor disponibilidad a través de los procesos de purificación y aislamiento enzimático [50-51].

Los procesos aplicados al tratamiento de desechos se caracterizan por ser tratamientos fisico-químicos o biológicos. El tratamiento enzimático se clasifica en medio de estas dos categorías tradicionales, porque involucra procesos químicos basados en la acción de la catálisis biológica. Las ventajas potenciales del tratamiento enzimático comparado con los tratamientos convencionales incluyen: la aplicación a compuestos biorefractorios; la operación a altas y bajas concentraciones de contaminantes; su operación en un amplio intervalo de pH, temperatura y salinidad; la ausencia de efectos por volumen; la ausencia de retrasos asociados con la aclimatación de biomasa (tiempos de retención); no se presenta la disminución en el volumen de trabajo (no se genera biomasa); los procesos son fáciles y sencillos de controlar.

Considerando las ventajas que presentan las enzimas, las investigaciones más recientes se han enfocado al desarrollo de procesos enzimáticos para el tratamiento de efluentes, desechos sólidos, residuos peligrosos y tratamiento de suelos contaminados [53-57].

2.4 ENZIMAS

Las enzimas son proteínas especializadas en la catálisis de las reacciones biológicas, se encuentran entre las más notables biomoléculas, conocidas debido a su especificidad y gran poder catalítico; que es mucho mayor que el de los catalizadores químicos. El nombre de enzima (en la levadura) no se empleó hasta 1877, pero muchos años antes ya se sospechaba que ciertos catalizadores biológicos intervenían en la fermentación del azúcar para formar alcohol (de aquí el nombre inicial de fermentos). La primera teoría general sobre la catálisis química, publicada por J. Berzelius en 1835 incluía un ejemplo de la enzima conocida actualmente como diastasa de la malta, y señalaba que la hidrólisis del almidón es catalizada por la diastasa con más eficacia que por acción del ácido sulfúrico [58-61].

Aunque Louis Pasteur reconoció que la fermentación es catalizada por enzimas, postuló en 1860 que éstas se hallaban ligadas de modo inextricable con la estructura y la vida de las células de la levadura. Constituyó por ello, un logro importante en la historia de la investigación enzimática para que en 1897, E. Büchner consiguiera extraer las enzimas que catalizan la fermentación alcohólica de las células de la levadura [58, 61]. Este hecho demostraba claramente que la importancia de las enzimas, que catalizaban una ruta metabólica principal productora de energía, también pueden actuar independientemente de la estructura celular. Sin embargo, fue hasta muchos años después cuando se aisló por vez primera una enzima en forma cristalina, ello lo consiguió J. B. Summer en 1926, con la ureasa aislada de extractos de la alubia *Cannavalia enzyformis* demostrando además que se trataba de una proteína. Fue durante el periodo comprendido entre 1930-1936 que Northrop aisló la pepsina, tripsina y quimotripsina, quedando finalmente establecida la naturaleza protéica de las enzimas. En la actualidad se han identificado más de 2000 enzimas diferentes, muchas de ellas aisladas en forma pura, de éstas alrededor de 200 han sido cristalizadas [59-61].

2.4.1 Nomenclatura y clasificación de las enzimas

El nombre de varias enzimas ha sido designado añadiendo el sufijo *-asa* al nombre del substrato, es decir, la molécula sobre la cual la enzima ejerce su acción catalítica. Esta nomenclatura, no siempre ha resultado práctica, ocasionando que se conserven los nombres triviales de las enzimas. Por esta razón y porque el número de enzimas que se descubren aumenta rápidamente, se ha adoptado una nueva clasificación sistemática de las enzimas, según recomendación de la comisión internacional de enzimas. El nuevo sistema divide a las enzimas en seis clases principales, cada una de las cuales se divide en subclases, de acuerdo con el tipo reacción catalizada. Cada enzima es designada con un nombre recomendado, corto y apropiado para su uso habitual, por un nombre sistemático que identifica la reacción que cataliza, y por un número de clasificación (EC), que se emplea cuando se precisa la identificación inequívoca de la enzima. (ejemplo: lacasa, polifenol oxidasa, EC 1.10.3.2) [1, 60, 61].

2.4.2 Cofactores enzimáticos

La actividad de varias enzimas depende solamente de su estructura como proteína, mientras que otras necesitan, además de uno o más componentes no protéicos, llamados cofactores. El cofactor puede ser un ión metálico, o bien una molécula orgánica llamada coenzima, algunas enzimas requieren ambos. Los cofactores son generalmente estables al calor, mientras que muchas proteínas enzimáticas pierden la actividad por efecto del calor [60].

En las enzimas que requieren iones metálicos como cofactores, el metal tiene varias funciones como las siguientes: constituyen el centro catalítico primario, actúan como grupo puente para reunir al sustrato con la enzima formando un complejo de coordinación enzima-sustrato [ES] y finalmente son los agentes estabilizantes de la conformación de la proteína enzimática en su forma catalíticamente activa. Las enzimas que poseen esta propiedad se les conoce como metaloenzimas y en algunas de ellas el componente metálico, por sí solo, ya posee una actividad catalítica primaria, que se incrementa significativamente en presencia de la proteína enzimática [59-61].

2.5 CATÁLISIS ENZIMÁTICA

2.5.1 Ecuación de Michaelis-Menten

Los principios generales de la cinética de las reacciones químicas son aplicables a las reacciones catalizadas por las enzimas, pero estas muestran un rasgo característico que no se observa en las reacciones no enzimáticas: la saturación por el sustrato. El efecto de la concentración del sustrato, sobre la velocidad de la reacción catalizada por una enzima se puede describir esquemáticamente de la siguiente forma: $A \rightarrow P$, a una concentración baja de sustrato, la velocidad inicial de la reacción V_0 es casi proporcional a la concentración de sustrato y la reacción por lo tanto es aproximadamente de primer orden con respecto al mismo. Sin embargo, a medida que la concentración de sustrato aumenta, la velocidad inicial (V_0) de la reacción disminuye y deja de ser aproximadamente proporcional a la concentración de sustrato, en esta zona el orden de reacción es mixto. Con un aumento posterior de la concentración del sustrato, la velocidad de la reacción llega a ser independiente de la concentración del sustrato y se aproxima asintóticamente a una velocidad constante. En este

intervalo de concentraciones de sustrato, la reacción es esencialmente de orden cero con respecto al sustrato, y se dice que la enzima se halla saturada por su sustrato. Las concentraciones de sustrato que se requieren para saturar a la enzima, varían ampliamente entre el tipo de enzima y aún entre enzimas homólogas que provienen de diversas fuentes. El efecto de saturación condujo a J. Brown y a V. Henry, a formular la hipótesis de que la enzima y el sustrato reaccionan reversiblemente para formar un complejo, como etapa esencial en la reacción catalizada [58-59].

L. Michaelis y M. L. Menten desarrollaron en 1913 una teoría general acerca de la acción y cinética de las enzimas la cual, fue ampliada posteriormente por G. E. Briggs y J. B. S. Haldane. Esta teoría es fundamental para el análisis cuantitativo de todos los aspectos de la cinética de las enzimas y de la inhibición, se ha desarrollado plenamente para la reacción en la cual está presente un solo sustrato. La teoría de Michaelis–Menten (**M-M**) supone que la enzima **E** se combina en primer lugar con el sustrato **S** para formar el complejo enzima-sustrato [**ES**]; a continuación este último se escinde en una segunda etapa, para formar a la enzima libre y producto **P**.



Se supone que ambas reacciones son reversibles, las constantes de velocidad para las reacciones directa e inversa (k_1 y k_{-1}). La ecuación de **M-M** expresa la relación matemática entre la velocidad lineal de una reacción catalizada por una enzima, la concentración del sustrato y ciertas características de la enzima. La ecuación de **M-M** es la ecuación de velocidad para las reacciones catalizadas por enzimas que solo actúan sobre un sustrato. En la deducción debida a Briggs y Haldane, **E** representa la concentración de la enzima libre o no combinada, **ES** la concentración del complejo enzima-sustrato, **E_T** es la concentración total de la enzima (suma de las formas libre y combinada). La concentración del sustrato se representa por **S**, la cual se supone que es mucho mayor que **E**, de modo que la cantidad de **S**

unida a **E** en cualquier instante, es despreciable si se compara con la concentración total de **S** [58-61].

Esta deducción tiene como objeto definir una expresión general para V_0 , que es la velocidad inicial de una reacción catalizada enzimáticamente, suponiendo que las reacciones de esta clase transcurren en dos etapas, tal como muestran las ecuaciones 1 y 2. La velocidad inicial es igual a la velocidad de ruptura del complejo **ES**, de acuerdo con la ecuación 2, se puede escribir la ecuación de velocidad de primer orden.

$$V_0 = k_1[ES] \dots\dots\dots(\text{ecuación 3})$$

Como k_2 y **ES** no pueden determinarse directamente se debe de encontrar una expresión para V_0 en función de otras variables que puedan medirse con más facilidad. Para ello se expresa la ecuación de velocidad de segundo orden para la formación de **ES** a partir de **E** y de **S** partiendo de la ecuación 1:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E_T][S] \dots\dots\dots(\text{ecuación 4})$$

En donde k_1 es la constante de velocidad de segundo orden. Aunque **ES** puede obtenerse también a partir de **E** y de **P** como se indica en la ecuación (2), la velocidad de la reacción inversa puede despreciarse, ya que se considera que la reacción se realiza en el sentido directo, cuando **S** es muy grande y **P** es cero o próximo a este valor [60-61]

La ecuación de velocidad para la descomposición de **ES** está dada por la suma de dos reacciones en primer lugar, la reacción que rinde el producto (reacción directa) y después la reacción que produce **E + S** (la inversa de la ecuación 1), expresada como:

$$-\frac{d[ES]}{dt} = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \dots\dots\dots(\text{ecuación 5})$$

Por otra parte, cuando la velocidad de formación del complejo **ES** es igual a la velocidad de desaparición, el sistema ha alcanzado el estado estacionario y por lo tanto la concentración de **ES** se mantiene constante, entonces la ecuación (5) se transforma en la siguiente expresión:

$$k_1[E_T][S] - [ES][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \dots\dots\dots(\text{ecuación 6})$$

Reordenando la ecuación (6), se obtiene:

$$\frac{\{[S][E_T] - [ES]\}}{[ES]} = \frac{\{k_1 + k_2\}}{k_1} = K_m \dots\dots\dots(\text{ecuación 7})$$

La constante global K_m que substituye al término $\frac{\{k_1 + k_2\}}{k_1}$ se llama constante de Michaelis—Menten.

A través de las transformaciones adecuadas de la ecuación (7), se llega a la expresión siguiente:

$$V_o = \frac{V_{max}[S]}{\{K_m + [S]\}} \dots\dots\dots(\text{ecuación 8})$$

Que es la ecuación de Michaelis—Menten, expresión de la velocidad para una reacción de un solo sustrato, catalizada enzimáticamente. Relaciona la velocidad inicial, la velocidad máxima y la concentración inicial del sustrato a través de la constante de **M-M**. Esta ecuación aparentemente no contiene los términos para la concentración de la enzima, en realidad ésta se halla contenida en el término V_{max} que igual a $k_2 [E_T]$ [58-60].

De la ecuación **M-M** se deriva la relación para que la velocidad inicial de la reacción sea exactamente la mitad de la velocidad máxima, es decir, cuando $V_o = 0.5 V_{max}$

$$\frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max}[S]}{\{K_m + [S]\}} \dots\dots\dots(\text{ecuación 9})$$

Al dividir por V_{max} se obtiene: $\frac{1}{2} = \frac{[S]}{\{K_m + [S]\}} \dots\dots\dots(\text{ecuación 10})$

Reordenando:

$$K_m + [S] = 2[S], K_m = [S] \dots\dots\dots(\text{ecuación 11})$$

En la constante de **M-M**, K_m es igual a la concentración de sustrato en la que la velocidad inicial de la reacción es la mitad de la velocidad máxima. Las dimensiones de K_m para una reacción de un solo sustrato, son mol sobre litro, y la constante es independiente de la concentración de la enzima [58].

Puede obtenerse con facilidad, una aproximación al valor de K_m a partir de una serie de experimentos sencillos en los que la velocidad inicial de la reacción se mide a diferentes concentraciones iniciales de sustrato, con una concentración de enzima constante. El valor aproximado de K_m se obtiene gráficamente, al representar la velocidad inicial frente a la concentración inicial del sustrato, que sigue una función hipérbola rectangular. A concentraciones de sustrato muy bajas, la velocidad inicial V_o es proporcional a la $[S]$, la reacción muestra esencialmente un comportamiento de primer orden. A concentraciones de

substrato muy elevadas la velocidad de la reacción se aproxima asintóticamente a la V_{\max} y es de orden cero, o prácticamente independiente de la concentración del substrato [58-61].

La constante K_m no es un valor fijo, sino que puede variar con la estructura del substrato, con el pH y con la temperatura, de igual forma varía la V_{\max} para cada reacción catalizada enzimáticamente [60].

La constante de Michaelis de una enzima constituye una característica útil e importante que es fundamental para la descripción de la cinética enzimática y para la determinación cuantitativa de la actividad de la enzima [58].

La constante $K_m = \{k_{-1} + k_2\} / k_1$, en algunas reacciones enzimáticas k_{-1} es muy grande en comparación con k_2 , la cual es despreciable en este caso, por lo tanto $K_m = k_{-1} / k_1$, en donde K_m es igual a la constante de disociación del complejo enzima-substrato K_s , que también se conoce como constante del substrato: $K_s = [E][S] / [ES]$.

Las constantes K_m y K_s no son equivalentes, a menos que se tenga disponible información que confirme que el valor de k_2 es muy pequeño comparado con k_{-1} [58-60].

2.5.1.1 TRANSFORMACIONES DE LA ECUACIÓN DE MICHAELIS-MENTEN

La ecuación de **M-M** puede transformarse algebraicamente en otras formas que son más útiles para la expresión de los datos experimentales. Una de las transformaciones más adecuadas se obtiene, tomando los recíprocos de ambos miembros de la ecuación de

Michaelis-Menten:
$$\frac{1}{V_o} = \frac{\{K_m + [S]\}}{\{V_{\max}[S]\}} \dots\dots\dots(\text{ecuación 12})$$

Reordenando:

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{\max}[S]} + \frac{[S]}{V_{\max}[S]} \dots\dots\dots(\text{ecuación 13})$$

La expresión final es:

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left\{ \frac{1}{[S]} \right\} + \frac{1}{V_{\max}} \dots\dots\dots(\text{ecuación 14})$$

Esta última expresión corresponde a la ecuación de Lineweaver-Burk, cuando $1/V_o$ se representa gráficamente frente a $1/[S]$, se obtiene una línea recta. La pendiente de la recta es K_m/V_{\max} , la intersección sobre el eje $1/[S]$ es $-1/K_m$. La representación de doble recíproca tiene la ventaja de permitir una determinación más exacta del valor de V_{\max} , ya que en la

representación sencilla de V_o contra $[S]$, sólo se obtiene su valor aproximado, puesto que es un valor límite a una concentración del sustrato infinita. La representación doble recíproca puede proporcionar también información acerca de la inhibición enzimática [60-61].

2.5.1.2 EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La mayoría de las enzimas poseen un pH característico al cual su actividad es máxima, por arriba o por debajo de ese pH la actividad disminuye. Aunque los perfiles de las curvas de actividad en función del pH de muchas enzimas son en forma de campana, pueden variar considerablemente de forma. La relación entre el pH y la actividad de cualquier enzima depende del comportamiento ácido-base de la enzima y del sustrato, así como de otros factores que en general son difíciles de analizar cuantitativamente. La forma de la curva actividad-pH varía con la concentración del sustrato, ya que el valor de K_m también varía con el pH en varias enzimas. El pH óptimo de una enzima no es necesariamente igual al de su entorno, por lo tanto este es un factor de control de la actividad enzimática [60-64].

2.5.1.3 EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LAS REACCIONES ENZIMÁTICAS

Al igual que para la mayoría de las reacciones químicas, la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas se incrementa en general con la temperatura, dentro del intervalo en el que la enzima es estable y permanece totalmente activa. La velocidad de muchas reacciones se duplica aproximadamente por cada 10 °C de aumento de la temperatura, sin embargo, el coeficiente de temperatura varía de una enzima a otra, según la energía de activación de la reacción catalizada, es decir de la altura de la barrera de energía para pasar al estado de transición. Aunque las reacciones catalizadas por las enzimas poseen una temperatura óptima resultante de dos procesos: (1) el incremento de la velocidad de reacción con la temperatura y, (2) el incremento en la velocidad de desnaturalización térmica de la enzima, al sobrepasar una temperatura crítica [58-62].

Gran parte de las enzimas se inactivan a temperaturas comprendidas entre 55 y 60 °C, algunas son completamente estables y conservan su actividad a temperaturas superiores.

2.6 ENZIMAS QUE CONTIENEN SITIOS DE COBRE

Los principales avances que se han realizado durante 1997 a 1998, han determinado la estructura cristalina y función, de los sitios activos de las oxidasas que contienen cobre (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de las enzimas que contienen sitios de cobre

SITIOS DE COBRE MONONUCLEAR	
Amino oxidasa	Catalizan la deaminación oxidativa de aminas primarias por dioxígeno para producir aldehídos, peróxido de hidrógeno y amonio [46].
Glucosa oxidasa	Es la enzima mejor caracterizada, a partir de <i>Fusrium sp</i> , en esta familia se incluye las glioxal oxidasas de los hongos y a las enzimas procarióticas. En esta enzima el ión Cu(II), se encuentra ligada ecuatorialmente a His 496, His 586, Tir 272 y una molécula de solvente [46, 49]
peptidilglicina- α -hidroxil monooxigenasa (PHM) Dopamina- β -monooxigenasa (DBM) o dopamina- β -hidrosilasa	Estas enzimas catalizan la hidroxilación de un carbón no reactivo en los péptidos de un aminoácido glicina o dopamina, con la reducción de oxígeno a agua, poseen una alta homología, especialmente en sus sitios de enlace del cobre [46].
SITIOS DE COBRE MULTINUCLEAR	
Tirosinasa	Son también conocidas como fenolasas o catecolasas. Los estudios espectroscópicos de esta enzima muestran que se encuentra acoplada a un sitio binuclear de cobre que es la parte activa de la tirosinasa. Los substratos son fenoles, <i>p</i> -hidroxifenoles y los ácidos dihidroxifenilpropiónicos [46-51], se caracteriza por catalizar dos reacciones consecutivas: (1) la hidroxilación de monofenoles con oxígeno molecular formando <i>o</i> -difenoles y (2) la deshidrogenación de <i>o</i> -difenoles con oxígeno para formar quinonas. Las quinonas son inestables y son polimerizadas de forma no enzimática produciéndose una sustancia insoluble en agua y que es fácilmente removida por filtración simple [49].
Lacasa	Polifenol oxidasa con EC (1.10.3.2), cataliza la reducción de O ₂ a H ₂ O.

Estas enzimas catalizan la oxidación de una amplia variedad de sustratos, en un intervalo que incluye moléculas pequeñas como el Fe^{2+} solvatado y el metano, hasta grandes péptidos, con la reducción de oxígeno a agua o peróxido de hidrógeno. Las investigaciones realizadas para determinar la estructura y función de estas enzimas, han avanzado significativamente, sobre todo en el análisis de las oxidasas de cobre, que contienen centros mononucleares y trinucleares de este elemento (Tabla 1), adicionalmente a la estructura de las proteínas de cobre.

A través de estudios de biología molecular se han establecido secuencias de datos característicos para cada enzima, y por medio de ellos se han determinado las relaciones evolutivas; que existen entre esta clase de proteínas [39, 49, 51].

2.6.1 LACASAS

La lacasa (1.10.3.2) es producida por varios hongos y vegetales principalmente, y es capaz de disminuir la toxicidad de compuesto fenólicos a través de procesos de polimerización, es relativamente específica y puede inducir el acoplamiento cruzado de contaminantes fenólicos, estos compuestos son fácilmente oxidados por la enzima con la producción de los correspondientes radicales aniónicos libres los cuales son altamente reactivos [46-51].

2.6.1.1 DETECCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LACASA

La lacasa (EC 1.10.3.2 *p*-difenol: dioxígeno oxidoreductasa) es una familia de multicobre oxidasas que catalizan la oxidación de un intervalo de sustancias aromáticas (particularmente fenoles) e inorgánicas con la reducción concomitante de O_2 a H_2O .

Las enzimas multicobre, incluyen entre otras ácido ascórbico oxidasa y seruplasmina. La lacasa fue descrita por Yoshida en 1883 y caracterizada por Bertrand en 1985, como una oxidasa que contenía un metal. Esto facilitó la descripción de la lacasa como una de las enzimas más antiguas, la cual ha sido detectada en varias especies de plantas incluyendo el árbol de la laca como lo informó Huttermann y colaboradores en el 2001, en mango, durazno, pino lo realizó Sato en 2001 así como en sicamoro y ciruela. Harvey y Walker, en 1999, Solomon y colaboradores en 1996, presentaron reportes con resultados semejantes a los

informados realizados por Wosilait y colaboradores en 1954 que indican la presencia de la enzima en las hojas de *Aesculus parviflora* y en los retoños del té verde. Ranocha y colaboradores en 1999 reportaron la presencia de cinco enzimas lacasas en el xilema de *Populus euramericana*. La presencia de lacasa informada en bacterias, insectos y hongos, se resume en la tabla 2.

Tabla 2. Bacterias, insectos y hongos que presentan actividad de lacasa.

Presencia de lacasa en diversos organismos	Especies
Bacterias	<i>Azospirillum lipoferum</i> [Claus y Filip, 1997, Givaudan y colaboradores 1993]
Insectos	<i>Bómbix, Calliphora, Diptera, Drosophila, Lucilia, Manduca, Musca, Oryctes, Papilio, Phormia, Rhodnius, sarcophaga, Schistocerca</i> y <i>Tenebrio</i> [Diamantidis 2001, Hopkins y Kramer, 1992, 2001]
Hongos	<i>Agaricus, Antrodiella, Armillaria, Aspergillus, Bjerkandera, Botrytis, Ceriporiopsis, Cerrena, Chaetomium, Coprinus, Cryphonectria, Cryptococcus, Curvularia, Cyathus, Geotrichum, Daedalea, Fomes, Fusarium, Halosarpheia, Lactarius, Lentinus, Monocillium, Myceliophthora, Neurospora, Penicillium, Phanerochaete, Phellinus, Phlebia, Pholiota, Pleurotus, Podospora, Pycnoporus, Pyricularia, Rhizoctonia, Rigidoporus, Schizophyllum, Sclerotium, Scytalidium, Sporotrichum, Stagonospora, Thermoascus, Trametes</i> y <i>Trichoderma</i> .

Se ha postulado que la lacasa está involucrada en varias actividades celulares y microbianas, por lo cual se han realizado estudios recientes sobre la función fisiológica de la enzima que incluyen entre otros la biosíntesis de la pared celular vegetal, fitopatogénesis, degradación de madera y humificación, esclerotización de insectos, melanización bacteriana, y la presencia de melanina en los procesos virulentos propios del ser humano [46-51].

Hasta la fecha la caracterización y purificación de lacasa se ha realizado en más de veinte organismos diferentes. La estructura primaria se ha determinado para la lacasa de catorce organismos, las principales son: *Agaricus bisporus, Myceliophthora thermophila, Neurospora crassa, Pleurotus ostreatus, Trametes versicolor*, y un basidiomicete designado como PM1 [46, 51].

2.6.1.2 PROPIEDADES MOLECULARES DE LA LACASA

Varias de las lacasas estudiadas son proteínas extracelulares, aunque existen lacasas intracelulares que se han detectado en varios hongos e insectos. En general las lacasas fúngicas tienen puntos isoeléctricos (pI) en un intervalo de 3 a 7 pero en los vegetales los intervalos varían entre 7 y 9. Bajo condiciones no desnaturizantes los datos de filtración en gel sugieren que alguna de estas enzimas tienen estructura cuaternaria. En el análisis PAGE, las lacasas han mostrado movilidades correspondientes al peso molecular de 60-100 kDa de los cuales de 10 a 50 % puede atribuirse a la glicosilación. La información disponible indica que la manosa es uno de los principales componentes de los carbohidratos unidos a la lacasa. La glicosilación en la lacasa juega un papel importante en la secreción, susceptibilidad proteolítica, actividad, retención de cobre y estabilidad térmica. Las lacasas purificadas exhiben una apariencia azul característica de su absorción electrónica alrededor de 600 nm. El espectro ultravioleta visible (UV-Vis) típico de la lacasa muestra dos puntos máximos a 280 nm y 600 nm, así como una pequeña señal en 330 nm. La relación de absorbancias entre la absorción en 280 nm y en 600 nm es generalmente de 14 a 30 y entre 330 nm y 600 nm, los valores son de 0.5 a 2 [1, 32, 33, 63-66].

En la forma de holoenzima varias lacasas tienen cuatro átomos de cobre por monómero, aunque la lacasa de *Phlebia sp* se informó con dos átomos de cobre y una quinona pirroloquinolina como grupo prostético. Entre los cuatro átomos de cobre, uno de ellos pertenece al cobre azul tipo 1, sitio que tiene una fuerte absorción electrónica en 600 nm, una señal característica en la resonancia paramagnética electrónica (RPE), otro pertenece al cobre tipo 2 sitio que presenta una señal en RPE, y dos cobres que están fuertemente acoplados y que son propios del sitio 3 que presenta una débil absorción en el espectro UV-Vis a 330 nm y la señal en RPE solo es activa cuando hay alguna perturbación, por efecto de aniones fuertemente enlazados. Se ha indicado que los sitios tipo 2 y tipo 3 constituyen un agrupamiento trinuclear con centros de cobre. Los potenciales redox de los cobres activos evaluados para varios hongos, están en un intervalo de 0.4 a 0.9 V contra el electrodo normal de hidrógeno. El potencial redox del sitio de cobre tipo 1 en las lacasas de varias plantas y hongos, se han medido como una función del pH y se ha demostrado un cambio de potencial total de 0.33 V/ENH en un intervalo de pH de 3 a 9 [1, 46, 51, 63].

La estructura primaria de más de veinte lacasas (de más de catorce organismos) se ha determinado por secuenciación de proteínas o de DNA.

2.6.1.3 ENZIMOLOGÍA DE LA LACASA

La enzimología de dos lacasas representativas *Rhus vernicifera* y *Trametes versicolor* ha sido investigada exhaustivamente. La lacasa puede catalizar la oxidación de varias sustancias reducidas químicas orgánicas e inorgánicas, anilinas, tioles y especialmente fenoles. Aunque la lacasa tiene una fuerte preferencia por O₂ como su agente oxidante (K_m a niveles submilimolares), usualmente presenta baja especificidad para reducir substratos. En general, el pH óptimo de la actividad de la lacasa depende del tipo de substrato. Para los fenoles, el pH óptimo puede estar en el intervalo de pH entre 3 y 7 para lacasas fúngicas y superior a 9 para lacasas de plantas [49-51, 63-66].

En general se ha establecido que la catálisis de la lacasa involucra (1) la reducción del cobre tipo 1 por el substrato, (2) la transferencia interna de electrones del cobre tipo 1 al cobre tipo 2 y al cobre tipo 3, y (3) la reducción de O₂ a H₂O en el sitio del cobre tipo 2 y tipo 3. La oxidación de un substrato por lacasa involucra la pérdida de un solo electrón y la formación de un radical libre (catión). El radical es en general inestable y posteriormente es oxidado por la enzima (formando quinonas a partir de los fenoles) o bien suelen presentarse reacciones no enzimáticas (polimerización, desproporción). La transferencia de electrones del substrato al cobre tipo 1, esta probablemente controlado por la diferencia en los potenciales redox. Parece ser que el sitio de enlace para la reducción del substrato (sitio cobre tipo 1), es bastante bajo y esta limitado por efecto estérico en el caso de un substrato fenólico simple. En comparación, el sitio de enlace del O₂ (sitio de cobre tipo 2 y tipo 3) parece restringir el acceso a otros agentes oxidantes (Figura 1). La activación del oxígeno involucra químicamente la formación de enlaces con el grupo del cobre trinuclear. Bajo estas condiciones, el paso limitante para la transformación del substrato puede ser la oxidación de éste, aunque por otra parte lo es la transferencia de electrones en los sitios correspondientes [1, 46-51].

Otra de las propuestas que trata de explicar el mecanismo se relaciona con la estructura cristalina de la lacasa activa y los centros de cobre, en la estructura se presenta una geometría bien definida de los cuatro cobres distribuidos en sitios específicos. La lacasa de *Trametes*

versicolor es la enzima mejor caracterizada, en ella se ha encontrado que los agrupamientos trinucleares y el ambiente circundante, son propiedades muy semejantes a las lacasas de otros organismos. En la estructura enzimática hay dos canales de acceso uno para el oxígeno molecular y otro para eliminar la molécula de agua formada en el núcleo T2/T3, así como para conservar el tripéptido Histidina-Cistina-Histidina, que se encuentra involucrado en la transferencia de electrones entre el cobre T1 y el agrupamiento trinuclear T2/T3. La conservación de la estructura enzimática refleja un mecanismo de reacción común para la oxidación del cobre y la reducción del oxígeno en esta enzima. La reoxidación del cobre ocurre exactamente a la misma velocidad $5 \times 10^{-6} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ tanto en la lacasa como en la ascorbato oxidasa. La situación es diferente para la reactividad y la especificidad que se tiene cuando se reduce el sustrato, por acción de las multicobre oxidasas o lacasas. La especificidad del sustrato está definida por su geometría y naturaleza química. El sitio activo posee un ambiente adecuado para que se forme el enlace entre la enzima y el sustrato, además también se generan intermediarios que están involucrados en el proceso oxidativo [49-51]. El mecanismo de reacción de la lacasa parte del sitio de cobre T1 un lugar de enlace que tiene efectos sobre el potencial redox, y la reactividad de la enzima está relacionada con estos potenciales. El sitio T1 está constituido por dos histidinas, una cisteína y una metionina en posición axial, presentando por consiguiente cuatro plegamientos, la posición axial de los aminoácidos se considera como el factor que afecta mayormente al potencial redox de las enzimas de cobre [51].

El mecanismo de reacción involucra la transferencia de cuatro electrones a partir de la reducción del oxígeno molecular en el centro de cobre trinuclear en la lacasa. En el intermediario, los cobres tipo 1 y tipo 2 son oxidados y los dos cobres tipo 3 se encuentran enlazados a través de un ión hidróxido u óxido. Por otro lado, la fuente de protones para la formación de agua o de iones hidróxidos, es el volumen de agua del entorno o los aminoácidos cercanos al sitio activo, los cuales se encuentran en una segunda esfera de coordinación en el sitio del cobre trinuclear, de aquí, que se considere que los radicales intermediarios están en equilibrio con H^+ y dependen del pH [46-51].

Aún cuando, no se ha determinado cuáles son los dos electrones de las especies reducidas, se supone que son los provenientes del oxígeno enlazado a los cobres del tipo T3, la formación de este enlace tiene lugar cuando uno de los átomos de oxígeno está parcialmente

involucrado con la formación del puente de ión hidróxido (u óxido) y otro oxígeno se enlaza a las especies radicales en el centro trinuclear. La reacción se completa por la transferencia final de electrones a los radicales intermediarios, para formar un ión hidróxido o moléculas de agua e unidas al cobre tipo T2. Este se constituye como un ligando no proteico que se intercambia con agua del entorno de la enzima. La transferencia de electrones en el sitio trinuclear es muy rápida por lo que el estudio en esta sitio es complicado [46-51].

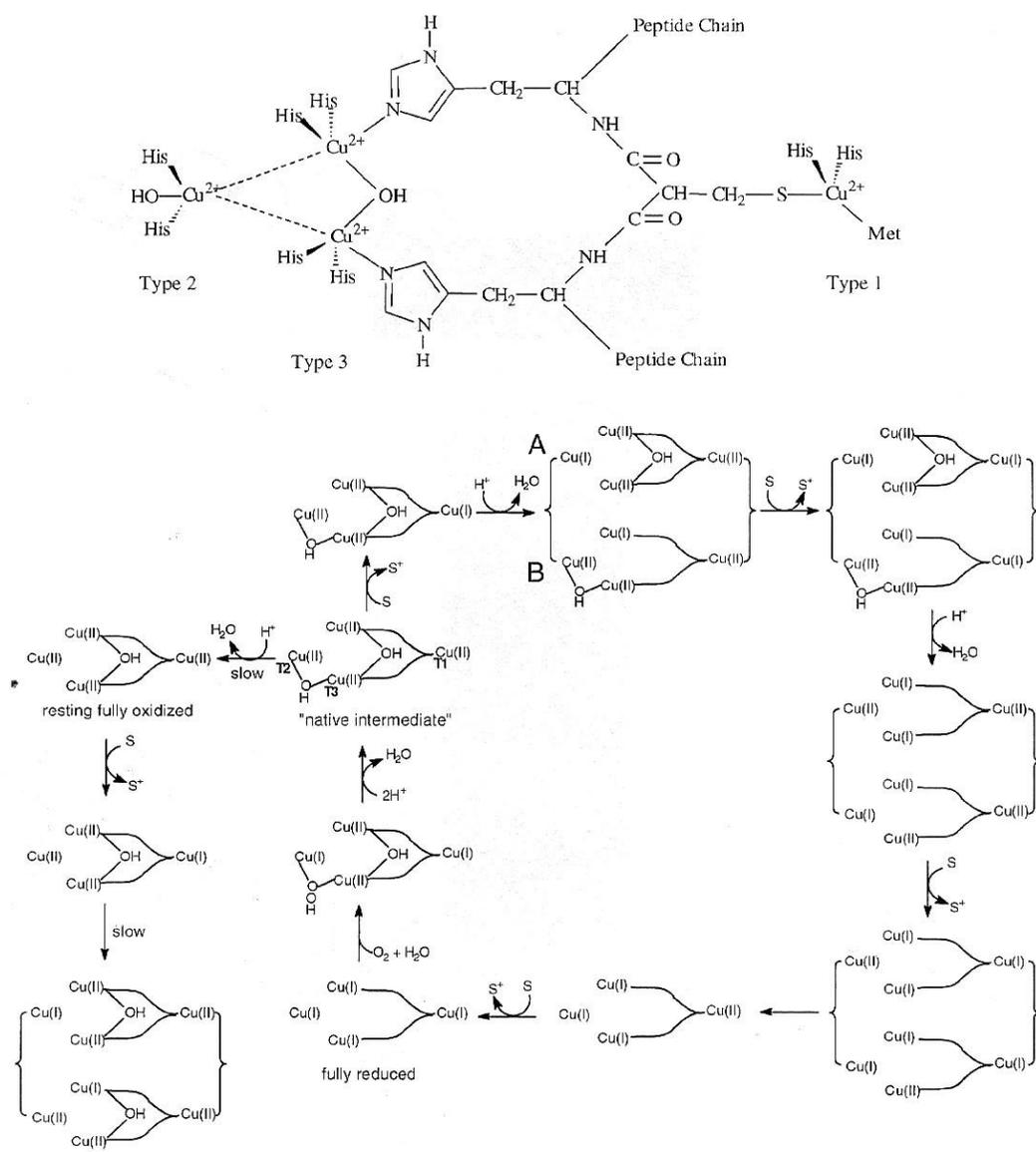


Figura 1. Estructura y ciclo catalítico de la enzima lacasa

La lacasa es inhibida por varios reactivos, que incluyen aniones pequeños como los haluros (excluyendo el yoduro), azida, cianida e hidróxidos enlazados al sitio del cobre tipo 2 y tipo 3, lo que da como resultado la interrupción de la transferencia interna de electrones e inhibición de la actividad. Otros inhibidores incluyen iones metálicos (Hg^{2+}), ácidos grasos, sulfhidrilos, hidroxiglicina, ácido Kojic, desferal y detergentes cuaternarios de amonio. La lacasa es generalmente más estable a pH alcalino que a pH ácido. Bajo condiciones idénticas las lacasas fúngicas termofílicas son en general más termoestables que las lacasas mesofílicas [46-51].

2.6.1.4 PREPARACIÓN DE LACASA

Generalmente la lacasa de los vegetales se obtiene de la savia o por extractos de tejidos, aún cuando la lacasa fúngica es extracelular son purificadas en medios de cultivo (caldo de fermentación), de los organismos seleccionados. Ciertos inductores aromáticos o fenólicos (como ácido ferúlico, xilidina y *p*-anisidina o antraquinona), pueden ser usados en algunos casos para inducir la producción de la enzima. Varias técnicas de purificación de proteína son empleadas frecuentemente para purificar lacasa. Los protocolos típicos de purificación involucran la ultrafiltración, intercambio iónico, filtración en gel, interacción hidrofóbica así como otras técnicas electroforéticas y cromatográficas. Otro proceso que aumenta la eficiencia de la purificación de la enzima es la técnica de la afinidad cromatográfica que emplea un grupo fenólico como ligante. La pureza de la preparación de lacasa es medida frecuentemente por el método de PAGE (método de secuenciación de proteínas con base en el peso molecular), y por la relación de la absorbancias entre la absorción a 280 nm y la de 600 nm. La transcripción de la lacasa o la expresión puede detectarse por medio de hibridación de DNA-RNA o por ensayo inmunoquímico con anticuerpos antilacasa, por otra parte la actividad de la lacasa se detecta con substratos cromogénicos característicos, tales como siringaldazina y ácido 2,2'-azino bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) son frecuentemente usados. El ABTS es muy utilizado y es conveniente su uso porque producto de oxidación por transferencia de un electrón es soluble en agua, estable y de color verde intenso. Varias lacasas silvestres, incluyendo las de *Pyricularia oryzae*, el consorcio de *Trametes (coriolus)* y el de *Trametes versicolor*, están comercialmente disponibles [46-51].

2.7 APLICACIONES DE LA LACASA

2.7.1 BIOCATÁLISIS INDUSTRIAL

2.7.1.1 DELIGNIFICACIÓN DE COMPUESTOS LIGNOCELULÓSICOS

Los métodos convencionales de delignificación o decoloración de la pulpa de papel involucran entre otros, el tratamiento basado en la oxidación química que emplea cloro y oxígeno (ClO_2 y O_3). Estos métodos son efectivos pero tienen serias desventajas como son la disposición de los productos clorados o la pérdida de fibras de celulosa. Los sistemas enzimáticos o microbianos de delignificación que eliminan estos inconvenientes y pueden ser fácilmente adaptados a las líneas de producción de la pulpa, son alternativas interesantes para el proceso de delignificación [40-42, 67-69].

En recientes revisiones se ha propuesto que la lacasa participa en la delignificación natural de la pulpa. Varias lacasas han sido capaces de degradar lignina de forma natural (astillas de madera y pulpa Kraft) o modelos sintéticos de lignina. Estas lacasas pueden oxidar directamente componentes fenólicos expuestos en la lignina o indirectamente en la presencia de mediadores redox propios del sistema que oxidan componentes fenólicos heterogéneos y no fenólicos (especialmente metoxibenceno). Como resultado de la oxidación de la lacasa se generan radicales en la lignina, con la subsecuente ruptura de los enlaces C-C en los componentes alifáticos o aromáticos con la posterior depolimerización [40-42].

Como agente de “biopulpeo” la lacasa puede aplicarse a las astillas de madera antes del pulpeo. El pretratamiento con lacasa puede parcialmente degradar lignina y romper la estructura del compuesto, de esta manera el pulpeo se realiza eficientemente. Como agente de “bioblanqueo” la lacasa puede aplicarse (como una alternativa convencional a los oxidantes químicos), a la pulpa. La lignina residual se puede degradar por lacasa lo que da como resultado la decoloración de la pulpa [40-42, 68].

2.7.1.2.1 ENTRECruzamiento de polisacáridos con lacasa

Los sacáridos polimerizados son materiales útiles para producir partículas maderables, sin embargo, se emplean sustancias químicas aplicadas en la polimerización convencional como la urea, formaldehído, isocianato y resinas petroquímicas que suelen ser peligrosas.

Basados en las propiedades de oxidación de la lacasa sobre lignina, esta enzima puede ser aplicada reemplazando a las sustancias químicas y servir como un agente de “biopegamento”. Para iniciar o incrementar el procesamiento de enlace eficiente, la lacasa debe de ser usada de tres formas, la primera es la oxidación directa de las partículas de madera o pulpa para generar más radicales para continuar con entrecruzamiento de enlaces, el segundo punto es hacer funcionales las partículas de madera o pulpa con pequeños compuestos (aromáticos, carboxilos, isocianato y acrilamidas), que actúan como agentes de entrecruzamiento y finalmente el tercer punto se refiere a la transformación aislada de lignina (frecuentemente por un producto del pulpeo) a almidón, polisacáridos fenólicos, proteínas o en radicales ricos en material adhesivo, no tóxico, útil para la composición de la madera. Tales aplicaciones pueden reemplazar adhesivos químicos costosos y también transformar desechos como la lignina en la industria del papel como un producto con un valor agregado extra [46-51].

2.7.1.3 DETOXIFICACIÓN Y DESCONTAMINACIÓN DE DESECHOS POR ACCIÓN DE LA LACASA

La lacasa ha sido utilizada para la detoxificación oxidativa y para la remoción de varios xenobióticos aromáticos y contaminantes encontrados en los desechos industriales, que contaminan el suelo y el agua. La catálisis de la enzima puede dar como resultado la degradación directa o polimerización de algunos compuestos tóxicos. Algunos de los procesos en los que se aplica este tipo de degradación son los siguientes: declorinación de clorofenoles, rompimiento de anillos aromáticos, mineralización de hidrocarburos policíclicos aromáticos, decoloración de pulpa o de efluentes del tratamiento del algodón y blanqueo de colorantes textiles. El proceso incluye la polimerización entre los contaminantes o bien la copolimerización con otras sustancias no tóxicas (como los materiales húmicos), la polimerización de los contaminantes después de hacerlos insolubles o inmovilizarlos, esto facilita la remoción de los compuestos pero también requiere de un medio de adsorción, sedimentación o filtración que son procesos adicionales que complican el proceso y elevan su costo [14, 54, 69-80].

2.7.1.4 TRANSFORMACIÓN DE COLORANTES TEXTILES POR ACCIÓN DE LACASA

Se ha informado que la lacasa favorece la decoloración de colorantes y de impresiones textiles, para ello como parte de la solución de lavado, la enzima puede blanquear rápidamente el exceso de colorantes que se eliminan de las telas, esto tiene como consecuencia la reducción del tiempo de proceso, energía y gasto de agua, elementos necesarios para producir materiales textiles de alta calidad [69-80].

En la industria textil la enzima lacasa cataliza el blanqueo del colorante por favorecer el rompimiento de los grupos cromóforos de estos compuestos y también se aplica en los procesos de tinción final en la industria del algodón actuando como un sistema de fijación del color, por medio del acomplejamiento del colorante con el mordente (enzima lacasa) sobre los tejidos. El empleo de la lacasa como sistema de blanqueo, puede reemplazar a los oxidantes químicos convencionales (hipoclorito), utilizados en los textiles. Otro ejemplo del sistema basado en la lacasa, es el utilizado para blanquear el colorante índigo aplicado a la mezclilla para dar la apariencia de deslavado [75-80].

En general, la aplicación de la enzima en el campo textil se refiere a la transformación oxidativa y el acoplamiento posterior del precursor del colorante en una matriz de colágeno, bajo las condiciones de catálisis los precursores de los colorantes solubles pueden absorberse, oxidarse y polimerizarse produciéndose el efecto de coloración deseado. Los procesos enzimáticos como el de la lacasa incrementan la eficiencia del colorante y reducen los costos de los colorantes (los precursores son de bajo costo) [46, 63, 66].

2.7.1.5 APLICACIONES DE LA LACASA EN LA MEDICINA

Las dermatitis ocasionadas por la savia de algunos vegetales como la hiedra, sauce y otros se genera por contacto y la posterior irritación de la piel por acción de una toxina en cuya composición se encuentra un derivado del catecol (urisiol), la lacasa actúa sobre el compuesto oxidándolo, polimerizándolo y detoxificando el compuesto, reduciendo con esto el efecto sobre la piel [46, 49-51].

Otra aplicación potencial de la lacasa, en el campo se basa en que esta enzima genera yodo *in situ*, un reactivo ampliamente utilizado como desinfectante. La aplicación de la lacasa-sal binaria de yoduro para esterilización tiene varias ventajas sobre la utilización directa del yodo, primero la sal de yodo es más estable y más segura que el I₂ en términos de almacenamiento, transporte y manipulación, segundo, la eliminación del yodo del sistema lacasa-yodo es fácilmente controlado por medio del ajuste de la concentración de la lacasa. Este sistema puede ser usado en la industria, medicina, uso doméstico, en el tratamiento de agua potable, agua de albercas y otras aplicaciones, menores [49-51].

Generalmente se ha aplicado para la decoloración del cabello o en procesos de lavado que frecuentemente involucran sustancias oxidativas o aditivos que son de olor desagradable, son irritantes casi siempre dañinos para los tejidos o son difíciles de manipular. Un sistema de lacasa puede eliminar estos inconvenientes reemplazando las sustancias químicas empleadas y operando en condiciones medias (pH y disolventes). La oxidación, transformación y entrecruzamiento de los precursores (fenoles y anilinas), catalizados por la enzima se han informado con resultados satisfactorios en la tinción o decoloración del cabello. Además proporciona un procedimiento adecuado y útil que también puede complementar el efecto cosmético (tipo de color, opacidad y compatibilidad con el tipo de cabello), lo que tiene una mayor ventaja sobre los tratamientos convencionales [46, 49-51].

2.7.1.6 APLICACIONES DE LACASA EN BIOSENSORES Y DIAGNÓSTICO

2.7.1.6.1 Detección de fenoles, anilinas, oxígeno y otras sustancias

La catálisis de la lacasa (acoplada con varios instrumentos físicos), puede ser útil como biosensor para detectar O₂ y una amplia variedad de substratos reductores (especialmente fenoles o anilinas). Dos tipos de lacasa sensibles al O₂ son ampliamente utilizadas, el monitoreo de los cambios espectrales visibles a 600 nm de la lacasa, estos cambios son generados por la reoxidación del cobre tipo 1 por acción del O₂. Otro tipo de monitoreo está relacionado con las variaciones de corrientes o cambio de voltaje en un electrodo de oxígeno en el cual la reducción de O₂ se incrementa bajo el efecto de la electrocatálisis de la enzima inmovilizada. Para la detección de fenoles, anilinas y otros substratos, existen tres tipos de sensores basados en la lacasa, uno de estos detectores es de cambios fotométricos que resultan

de la oxidación de un sustrato cromogénico, otro de estos detectores es el que emplea el monitoreo del cambio de concentración del O₂ que está acoplado a la oxidación del sustrato y el detector que emplea un electrodo que reemplaza al O₂ como aceptor del flujo de los electrones a partir del sustrato [49-51, 63, 66].

2.7.1.7 ENSAYOS INMUNOQUÍMICOS Y ENZIMÁTICOS CON LACASA

La catálisis de la enzima lacasa es utilizada para ensayar la aplicación de otras enzimas, en estos ensayos alguna de las enzimas de interés catalizan la producción de un compuesto que posteriormente es oxidado por la lacasa, generando con ello cambios químicos detectables o bien, en un producto de la catálisis de lacasa (este producto también se acompaña de un cambio químico observable); los resultados son comparados con la actividad de la enzima investigada. Esta prueba ha sido aplicada en varias enzimas incluyendo amilasas, aminopeptidasas, fosfatasa alcalina, angiotensina I, arilamilasa, celobiasa, oxidasa, quimotripsina, glucosidasplasma, trombina y factor X (factor de coagulación). La lacasa está conjugada con un anticuerpo o antígeno y se emplea en esta forma como marcador enzimático para ensayos inmunoquímicos. En su aplicación en anticuerpo o antígeno enlazados a su contraparte inmunológica se detecta por medio de la actividad de la lacasa en un gel o en una membrana. Bajo ciertas condiciones el enlace antígeno anticuerpo la función de la lacasa conjugada, permite la detección inmunoquímica a través de la actividad modulada de la enzima [46, 63, 66].

2.7.1.8 SÍNTESIS ORGÁNICA Y MEDICINAL CATALIZADA POR LACASA

La catálisis de esta enzima también se emplea para sintetizar varios compuestos orgánicos funcionales que incluyen polímeros con especificidad mecánica, eléctrica o propiedades ópticas, pigmentos cosméticos, agentes saborizantes, aldehídos aromáticos, plaguicidas y compuestos heterocíclicos (fenoxacina). La enzima puede utilizarse para la síntesis de agentes medicinales de alta complejidad que incluyen antiinflamatorios, analgésicos estimulantes del sistema nervioso central, sedante, antibióticos, neoplásicos, entre otros. La lacasa actúa en la síntesis de péptidos, catalizando la oxidación en condiciones ambientales (temperatura, pH y disolventes), puede incrementar la regioselectividad, con lo

que se facilita el control del proceso y los efectos tóxicos en la producción convencional, se eliminan [46-51].

2.7.2 Otras aplicaciones

2.7.2.1 TRATAMIENTO DE BEBIDAS Y ALIMENTOS

El oscurecimiento y la formación de partículas en los jugos y vinos durante el procesamiento y almacenamiento son uno de los principales problemas para la industria. Los compuestos fenólicos que están involucrados en este proceso son adsorbidos y removidos por varios agentes aglutinantes (gelatina, bentonita) los cuales usualmente tienen baja especificidad, pueden afectar el color, aroma y generar problemas de disposición. La lacasa puede ser usada para remover o modificar la problemática de los sacáridos fenólicos incrementando la claridad, el color, sabor, aroma y estabilidad del jugo y bebidas que contienen alcohol [46, 49-51, 63-79].

El tratamiento que emplea a la lacasa oxida y polimeriza (o precipita) las sustancias fenólicas que posteriormente son removidas por acción de los silicatos o por filtración [63].

La actividad de la lacasa ha sido cuestionada en cuanto a que tiene un papel indeseable en el procesamiento de algunos alimentos o bebidas, la actividad excesiva de la enzima o no controlada, y su interacción con otras fenoloxidasas, puede causar el oscurecimiento de alimentos enlatados o vegetales, deteriorar la calidad del vino o jugo, o bien, participar en la patogénesis de algunas frutas. En este caso, la inhibición de la actividad de la enzima es de importancia económica. Los inhibidores potenciales incluyen ácido ferúlico, ácido oxálico y cucurbitáceas, por otro lado el tratamiento de los alimentos y bebidas enlatadas involucra principalmente la eliminación del O₂ [46].

La lacasa puede aplicarse a procesos que incrementan o modifican el color, la apariencia de un alimento o bebida [46, 51].

2.7.2.2 DESULFURACIÓN DE COMBUSTIBLES FÓSILES

La reducción de las emisiones tóxicas del azufre presente en los combustibles fósiles (petróleo, carbón y gas natural), por lo tanto la desulfuración es necesaria durante la poscombustión o especialmente, en los procesos de precombustión de los combustibles. Los tratamientos físicos y químicos convencionales para la desulfuración (oxidación y

solubilización inorgánica de pirita por sales férricas o cloro), tienen baja eficiencia para los compuestos orgánicos de azufre, lo que requiere de la aplicación de condiciones extremas (temperaturas y presiones altas, y equipo adecuado para evitar la corrosión), y de una gran infraestructura y de altos costos de mantenimiento. Como una alternativa a los métodos químicos, la desulfuración enzimática puede desarrollarse en condiciones ambientales, no requiere de una gran infraestructura y la remoción de los azufres orgánicos es más efectiva, los compuestos orgánicos e inorgánicos del azufre son oxidados por la lacasa, solubilizados en agua y posteriormente separados en forma de sólidos (desulfurizados) o como partículas de carbón [54, 62, 74, 78-81].

2.7.3 Métodos de aplicación de la lacasa

Aunque las funciones de la lacasa nativa se han determinado generalmente en estado libre en disolución, la forma más adecuada de la enzima para su aplicación en varios procesos industriales o de diagnóstico, es en estado inmovilizado o soportada en matrices no líquidas. Esto incluye la encapsulación en gel (hidrogel, alginatos, sílica gel), entrapamiento en micelas o inmovilización (covalente o no covalente) sobre materiales sólidos (cristales, zeolita, carbón activo, arcilla y otros). En general, la inmovilización o la encapsulación no alteran de forma drástica la actividad específica de la enzima. La enzima inmovilizada, esta disponible para sus aplicaciones en medio no acuoso (lo que no es posible con la enzima libre), la enzima de esta forma tratada es fácilmente reciclada y hay una reducción en la cantidad (costos) de enzima utilizada, por otro lado los procesos pueden operar de forma continua y se elimina la necesidad de inactivar a la enzima residual después del tratamiento [46-51].

2.8 APLICACIONES CON MEDIACIÓN DE COMPUESTOS REDOX

2.8.1 Mediadores redox

Un mediador de óxido reducción es un compuesto al cual la enzima le puede sustraer electrones convirtiéndolo en un radical libre, el cual a su vez oxida a otros compuestos (substratos) dependiendo de su potencial de oxidoreducción (redox), sin la participación directa de la enzima en esta última reacción. Algunos compuestos que funcionan como mediadores son los siguientes: ABTS {ácido 2,2'-azinobis-(3-etil

benzotiazolina—6—sulfónico}}, 1-hidroxibenzotriazol (HBT), benzotriazol (BT), azul brillante de ramazol (RBB), cloropromazina (CPZ), ácido 1-nitroso-2-naftol-3,6-disulfónico (NNDS) y ácido-2-nitroso-1-naftol-4-sulfónico (HNNS). Estos compuestos pueden incrementar significativamente la catálisis enzimática a través de la transferencia de electrones entre la lacasa y el sustrato, efecto que también modifica la capacidad de la enzima para oxidar indirectamente a los compuestos que normalmente no son sustratos de ésta [40-42, 56, 63, 68, 72, 82-91].

Bourbonnais y colaboradores en 1997, 1998 y 2004; han revisado las propiedades electroquímicas y de reactividad de diversos mediadores principalmente ABTS, 1-HBT y sus intermediarios, aplicados al proceso de delignificación de la lignina, indicando que el mediador más eficiente en este proceso, es el ABTS, compuesto que ha sido caracterizado ampliamente [40-42].

El ácido 2,2'-azinobis-(3-etil benzotiazolina—6—sulfónico), es un compuesto orgánico, cuya estructura aromática está constituida por anillos fenólicos, es utilizado e informado como mediador en gran variedad de trabajos. Su oxidación genera dos radicales catiónicos $ABTS^{•+}$ que se caracteriza por ser estable y $ABTS^{2+}$ radical poco estable, ambos se diferencian por su color característico en solución, que se ha determinado por espectrofotometría de absorción electrónica ultravioleta-visible (UV-Vis), se ha informado que el monocatión es de color verde oscuro a 728 nm de longitud de onda, que es una región libre de interferencia espectrales con el ABTS, en la región ultravioleta-visible, el dicatión no absorbe en esta región, y como se trata de un radical inestable se reduce rápidamente a $ABTS^{•+}$ [53]. Otros autores indican diferentes longitudes de onda para caracterizar al ABTS en el espectro UV-Vis [41-43, 100] sin embargo, el trabajo realizado por Solís en 2005 dio evidencia suficiente del comportamiento del ABTS indicado anteriormente, y su valor de coeficiente de extinción molar es de $36000 M^{-1}cm^{-1}$. La eficiencia del ABTS como mediador se atribuye a los potenciales redox de los dos procesos de oxidación de los sistemas $ABTS/ABTS^{•+}$ y $ABTS/ABTS^{2+}$. Ambos se han caracterizado electroquímicamente determinando los potenciales redox, para cada sistema: $ABTS/ABTS^{•+}$ $E^{\circ} = 0.414 V/AgCl-Ag$ y $ABTS/ABTS^{2+}$ $E^{\circ} = 0.828 V/AgCl-Ag$ [41-43, 53, 100]. Otro aspecto importante de este compuesto, es el relacionado a su comportamiento ante los cambios de pH, el ABTS es neutro a pH menor a 3.5 y aniónico a pH mayor a este valor [100], otro punto que se considera para explicar su eficiencia con la enzima lacasa en intervalos

de pH de 3 a 9 (intervalo de pH en donde se encuentra la máxima actividad de las lacasas dependiendo de la fuente de extracción de éstas) [40-41, 60, 63, 68, 82, 84, 100].

El ABTS, es el mediador mayormente estudiado por Bourbonnais a lo largo de la década de los 90's. Los trabajos publicados en los años 1990, 1996, 1997, 1998 y 2004, informan los resultados obtenidos en el proceso de delignificación, empleando ABTS como substrato de la enzima lacasa, y también se describe el posible comportamiento del mediador. El ABTS es oxidado por la lacasa al radical catión $ABTS^{*+}$ y posteriormente al radical dicatión $ABTS^{2+}$, ambas especies, proponían estos trabajos que eran relativamente estables y electroquímicamente reversibles. En la investigación realizada por Solís en 2005, se demostró que el $ABTS^{2+}$ es inestable y permanece en solución solamente $ABTS^{*+}$, que es el ión que actúa con la enzima, y que tiene la capacidad de oxidar por si mismo sin requerir la presencia de la lacasa [40-42].

Xu en los trabajos realizados en 1996, 1998 y 2001, hace un análisis acerca del efecto de los potenciales redox de la enzima lacasa, sobre las velocidades de reacción y su reactividad frente a cambios de pH, indicando que la actividad de la lacasa de *Myceliophthora termophila* clonada con *Aspergillus oryzae* se incrementa en un intervalo de pH de 3.5 a 5, y a un pH mayor, la actividad disminuye por que se presentan efectos de inhibición [82, 83]. Estos resultados se relacionan con los potenciales redox de la enzima, encontrando que el potencial se modifica en los mismos intervalos de pH, aumentando en un valor de 0.1 V por unidad de pH [63, 82, 83].

2.8.2 Aplicaciones lacasa-mediadores redox

A través del empleo de los compuestos indicados como mediadores, la enzima lacasa adquiere la habilidad para realizar la oxidación de compuestos aromáticos, sobre los que normalmente la enzima no actúa por si misma, o bien no son substratos característicos de la lacasa.

Como consecuencia de lo anterior la enzima aumenta el intervalo de sus aplicaciones, siendo utilizada en la industria de la pulpa de papel, en la industria textil, en el tratamiento de jugos y bebidas, en la eliminación de contaminantes orgánicos y de plaguicidas en el suelos, en cosmetología, en el tratamiento de efluentes de diversas industrias, y en procesos

industriales en donde, es necesaria la biodegradación de los compuestos recalcitrantes y de otros materiales [40-43, 78-91].

2.9 VENTAJAS DE LA APLICACIÓN DE LA LACASA

Las ventajas de la aplicación de la lacasa se refieren a: la insensibilidad de la enzima a muchos compuestos o microorganismos que son tóxicos, su compatibilidad con un amplio rango de condiciones ambientales (no requiere de nutrientes específicos o de condiciones operacionales óptimas), presenta una especificidad controlada, es efectiva en términos de difusión, permeabilidad y movilidad, finalmente es capaz de acoplarse al sistema o proceso en tiempos relativamente cortos [40-42, 63, 66, 78-91].

2.10 PERSPECTIVAS DE APLICACIÓN DE LA LACASA

Como cualquier oxidasa, la lacasa puede ser utilizada en muchas aplicaciones industriales y medicinales en donde la oxidación o derivatización oxidativa están involucradas. En general las investigaciones acerca de la enzima se han enfocado en la biooxidación, transformación, generación de biosensores y síntesis enzimática. Sin embargo solo se han realizado a nivel de laboratorio o de planta piloto y es necesario considerar un factor importante que previene las aplicaciones de la enzima a gran escala y es la gran dosificación de lacasa y mediador a emplear, lo que puede reducirse probablemente por medio de la optimización de la catálisis [63, 66].

Para eliminar este inconveniente se necesita comprender mejor el mecanismo de la reacción de interés, analizar el proceso natural, revisar la ingeniería del proceso para optimizar la actividad catalítica de la enzima en varias aplicaciones, desarrollar una enzima que presente una mejor actividad a pH alcalino a altas temperaturas. Por otra parte la ingeniería de proteínas facilita la obtención de información acerca de la estructura tridimensional de la enzima, así como deducir la correlación entre la función-estructura que controlan los potenciales redox y los perfiles de actividad-pH para la enzima [63, 66, 82, 83].

El compuesto de origen orgánico ABTS, empleado como mediador y ampliamente informado en la literatura, tiene las ventajas siguientes: acelera considerablemente la velocidad de reacción en donde interviene con la enzima lacasa, incrementa el intervalo de substratos sobre los que actúa la enzima, es un compuesto sumamente eficiente (la cantidad de reactivo

empleada por cantidad de sustrato transformado, es muy pequeña), además su interacción con la lacasa hace factible su reciclamiento como mediador, sin embargo, este compuesto es costoso (aproximadamente 40 dólares por gramo), por otra parte los compuestos utilizados e informados como mediadores, son en general de origen orgánico, en este trabajo se plantea el reto de buscar un compuesto de tipo inorgánico, que funcione como posible mediador, conservando las ventajas que posee el ABTS al reaccionar con la enzima, y sobre todo que su costo sea significativamente menor que el del ABTS.

A partir de lo anterior, un grupo de compuestos se caracterizaron electroquímicamente, seleccionando posteriormente a aquellos cuyo potencial redox fue menor al potencial de la enzima, a los compuestos seleccionados se les hizo un estudio espectrofotométrico por espectrofotometría de absorción electrónica ultravioleta-visible, para determinar las longitudes de onda de máxima absorción características de cada uno de ellos. Por otra parte se realizó la caracterización de la enzima, inicialmente se requirió de la enzima purificada, lo que se hizo a través del método de precipitación en acetona fría. A continuación, se determinó el contenido de proteína y finalmente se evaluaron los parámetros cinéticos de la enzima en estado libre, utilizando una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH= 5, 4 y 3.7. La reutilización de la enzima necesitó de su inmovilización en un soporte, para ello se fabricaron cristales de sílica gel, en donde la enzima se fijó con glutaraldehído al 10 %.

La previa selección de los compuestos y la caracterización de la enzima lacasa, proporcionaron las bases experimentales para realizar las reacciones propias del sistema lacasa-mediador y mediador-sustrato.

Para la realización de este trabajo experimental, se plantearon los objetivos indicados en el siguiente capítulo.

CAPÍTULO III

La hipótesis y los objetivos propuestos para la elaboración de este trabajo de tesis se indican a continuación.

3.0 HIPÓTESIS

Existen compuestos que pueden funcionar como mediadores y formar parte del sistema lacasa-mediador-substrato. Las reacciones que constituyen este sistema integran un ciclo catalítico eficiente, en donde el potencial redox de la enzima es mayor que el potencial del mediador, y éste es mayor que el potencial del sustrato.

Para demostrar la hipótesis indicada, se proponen los siguientes objetivos:

3.1 OBJETIVO GENERAL

Seleccionar a aquellos compuestos que puedan funcionar como mediadores con base en sus propiedades redox e integrarlos al sistema de reacción lacasa-mediador-substrato.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Caracterización electroquímica del grupo de compuestos de interés (ferroína, hidroquinona, ABTS, anilina, *p*-cresol, HBT, FeSO₄, CuSO₄, azul brillante G, rojo cresol, naranja 7, azul de metileno, ácido tánico, aminoazotolueno, índigo).

3.2.2. Selección de los posibles mediadores y sustratos con base en sus propiedades redox.

3.2.3 Caracterización por espectrofotometría UV-Vis de los compuestos seleccionados, a partir de la caracterización electroquímica.

3.2.4. Caracterización de la enzima lacasa libre e inmovilizada a pH= 5.0, 4.0 y 3.7 utilizando como sustrato el ABTS.

3.2.5. Determinación de los parámetros cinéticos de las reacciones enzima-mediador a pH= 5.0, 4.0 y 3.7:

a) enzima libre-mediadores seleccionados

b) enzima inmovilizada-mediadores seleccionados

3.2.6. Evaluación de la reacción mediador seleccionado-sustrato seleccionado.

CAPÍTULO IV

4.0 MATERIALES Y MÉTODOS

La enzima lacasa fue purificada y se determinó el contenido de proteína presente en su composición, posteriormente se evaluó la actividad y se caracterizó cinéticamente a la lacasa (parámetros K_m y V_{max}), la cual se trabajó en dos modalidades primero en el estado libre y por otra parte, considerando las ventajas adicionales cuando se fija a un soporte, se estima pertinente inmovilizar a la lacasa en sílica gel, que fue preparada y empleada como soporte.

La caracterización de un grupo de compuestos elegidos arbitrariamente se realizó para discriminar y seleccionar los reactivos más útiles para el trabajo experimental y posteriormente se hicieron una serie de reacciones constitutivas del sistema lacasa-mediador, mediador-substrato y finalmente lacasa-mediador-substrato.

Estas caracterizaciones de la enzima lacasa y de los compuestos se hicieron empleando técnicas analíticas convencionales como son la voltamperometría cíclica y la espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-Vis) cuya aplicación se indica en la sección 3.2.

4.1 REACTIVOS

Algunas de las propiedades físicas y químicas de cada uno de los reactivos utilizados se describen en las tablas 3 y 4.

Tabla 3. Algunas propiedades de los reactivos líquidos utilizados.

Nombre del compuesto	Fórmula	Color	Peso molecular (g mol ⁻¹) y pureza	Número CAS proveedor
3-aminopropiltrietoxisilano 4 %,	C ₉ H ₂₃ NO ₃ Si	líquido incoloro	221.37 99 %	[919-30-2] Sigma-Aldrich
Acetona, 2-propanona	CH ₃ COCH ₃	líquido incoloro volátil	58 99.5%	[67-64-1] Sigma-Aldrich
Ácido acético	CH ₃ COOH	líquido incoloro	60 99.9 %	[64-19-7] Sigma-Aldrich
Ácido clorhídrico	HCl	líquido incoloro, corrosivo,	36.5 38%	[7647-01-0] Sigma-Aldrich
Ácido nítrico	HNO ₃	líquido incoloro, corrosivo	63 99 %	[7697-37-2] J. T. Baker
Ferroína, 1,10 fenantrolina hierro (II) sulfato	[Fe(C ₁₂ H ₈ N ₂) ₃] SO ₄	líquido rojo	864.9	[14634-91-4] Sigma-Aldrich
Glutaraldehído	C ₅ H ₈ O ₂	líquido incoloro	100.12 50 %	[111-30-8] Sigma-Aldrich
Tetraetilortosilicato	SiC ₈ H ₂₀ O ₄	líquido incoloro	208.33 98 %	[78-10-4] Sigma-Aldrich

Tabla 4. Algunas propiedades de los reactivos sólidos utilizados.

Nombre del compuesto	Fórmula	Color	Peso molecular (g mol ⁻¹) y pureza	Número CAS proveedor
ABTS: ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato de amonio)	C ₁₈ H ₁₈ N ₄ O ₆ S ₄ (NH ₄) ₂	sólido verde-azulado	548.7 98 %	[30931-67-0] Sigma Aldrich.
Ácido tánico	C ₇₆ H ₅₂ O ₄₆	sólido incoloro	1701.23 98 %	[1401-55-4] J. T. Baker.
Amino azotolueno, 4'-amino-2,3'-dimetil azobenceno	CH ₃ C ₆ H ₄ N=NC ₆ H ₃ (CH ₃)NH ₂	sólido amarillo intenso	225.30 97 %	[97-56-3]
Anilina, p-cloroanilina	ClC ₆ H ₄ NH ₂	sólido incoloro	127.57 98 %	[106-47-8] Sigma-Aldrich
Azul brillante G, azul de coomassie	C ₄₇ H ₄₈ N ₃ O ₇ S ₂ Na	sólido azul oscuro	854 95 %	[6104-58-1] Sigma-Aldrich
Cloruro de hierro (III) hexahidratado	FeCl ₃ •6H ₂ O	sólido amarillo-naranja higroscópico	270.3 97 %	[10025-77-1] J. T. Baker
HBT, 1- hidroxibenzotriazol	C ₆ H ₅ N ₃ O	sólido incoloro	135.1 95 %	[2592-95-2] Sigma-Aldrich
Hidroquinona, 1,4 bencenodiol	C ₆ H ₆ O ₂	sólido incoloro	110.1 99 %	[123-31-9] Sigma—Aldrich
Hidróxido de sodio	NaOH	sólido incoloro, higroscópico	40.1 98.8 %	[1310-73-2] J. T. Baker
Índigo	C ₁₆ H ₈ N ₂ Na ₂ O ₈ S ₂	sólido azul-violeta oscuro	466.36 85 %	[860-22-0] Sigma-Aldrich
o-fenantrolina 1,10 fenantrolina monohidrato	C ₁₂ H ₈ N ₂ •H ₂ O	sólido incoloro higroscópico	198.20 99 %	[5144-89-8] Sigma-Aldrich
p-cresol,4- metil fenol	C ₇ H ₈ O	sólido incoloro, higroscópico	108.1 99 %	[106-44-5] Sigma-Aldrich
Sulfato de cobre (II) heptahidratado	CuSO ₄ •7H ₂ O	sólido azul rey	285.546 98 %	[782-63-1] J. T. Baker
Sulfato de hierro (II) heptahidratado	FeSO ₄ •7H ₂ O	sólido incoloro	280 98 %	[7782-63-0] J. T. Baker

4.2 TÉCNICAS ANALÍTICAS

4.2.1 Análisis cuantitativo

Se purificó y determinó el contenido de proteína de la enzima lacasa para ello se empleó como solución estándar el reactivo de Bradford y una solución de seroalbúmina bovina para realizar la curva de calibración, posteriormente se determinó el cambio de absorbancia (UA) a 595 nm empleando un espectrofotómetro marca Beckman ultravioleta-visible modelo DU-600.

4.2.1.1 Enzima lacasa

4.2.1.1.1 Lacasa libre

4.2.1.1.1.1 Soluciones amortiguadoras.- Se prepararon disoluciones amortiguadoras de acetatos con los siguientes valores pH= 3.7, pH= 4.0 y pH= 5.0. Los ajustes de pH se hicieron bajo condiciones ambientales de presión y de temperatura, empleando un potenciómetro con electrodo de vidrio. La calibración previa del equipo antes de cada ajuste de pH se realizó con soluciones amortiguadoras a pH= 7.0 y pH= 4.0.

4.2.1.1.1.2 Determinaciones cinéticas.- Se determinaron la actividad y los parámetros cinéticos (K_m y V_{max}) de la lacasa empleando las soluciones amortiguadoras de acetatos 0.1 M a pH= 5.0, 4.0 y 3.7, empleando como substrato ABTS. Se determinó la variación en la concentración (mM) con respecto al tiempo (minutos), para ello se empleó un espectrofotómetro con arreglo de diodos, ultravioleta-visible marca Hewlett Packard HP8452, las mediciones se hicieron en celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico en el intervalo de longitud de onda (λ) de 180 nm a 1100 nm.

4.2.1.1.2 Lacasa inmovilizada

4.2.1.1.2.1 Inmovilización de la lacasa.- Para inmovilizar a la lacasa en el soporte de sílica se requirió de la preparación de la sílica gel, lo que se hizo de acuerdo al procedimiento informado por Ho [92].

4.2.1.1.2.1 Determinaciones cinéticas.- la determinación de la actividad y de los parámetros cinéticos (K_m y V_{max}) para la lacasa inmovilizada en el soporte de sílica gel, se hicieron en forma semejante a las determinaciones para la enzima libre. También se emplearon las disoluciones amortiguadoras de acetatos 0.1 M a pH= 5.0, 4.0 y 3.7, con cantidades específicas de soporte con enzima.

4.2.2 ANÁLISIS CUALITATIVO

4.2.2.1 Caracterización electroquímica

Las mediciones electroquímicas se hicieron para cada uno de los compuestos, utilizando un equipo potencióstato-galvanostato EG&G PAR modelo 273, empleando celdas de 10 mL

de capacidad, con un sistema de tres electrodos electrodo de trabajo (carbón vítreo), electrodo de referencia (AgCl-Ag) y electrodo auxiliar (Pt) en una solución reguladora de acetatos 0.1 M a pH= 5.0 como electrolito soporte.

4.2.2.2 Caracterización espectrofotométrica

Se obtuvieron los espectros de absorción electrónica ultravioleta-visible (280 nm a 1100 nm), para cada uno de los compuestos seleccionados con base en los resultados obtenidos en 3.2.2.1, empleando la solución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH= 5.0, las mediciones de hicieron en celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico utilizando el espectrofotómetro de arreglo de diodos HP8452.

4.3 ENZIMA LACASA

4.3.1 Purificación de lacasa

La enzima utilizada fue obtenida de Novo Nordsisk, el producto comercial DeniLite II S contiene a la enzima lacasa de *Myceliophthora termophila* clonada con *Aspergillus oryzae*.

La enzima fue purificada a partir de la preparación comercial, el proceso de purificación se llevo a cabo por precipitación con acetona fría, para lo cual se disolvió el producto DeniLite II S (1g/10mL) en agua destilada y se mantuvo en agitación durante tres horas, después se refrigeró durante 12 horas a 4 °C. Posteriormente se centrífugo a 10000 rpm, durante un periodo de 60 minutos. El sobrenadante se separó por decantación, desechando el precipitado, el líquido obtenido se filtró con papel de 1 µm y con membrana 0.45 µm para eliminar residuos. El líquido filtrado se colocó en un vaso de precipitados y se tapó con papel aluminio y se refrigeró a 4 °C durante una hora. A esta disolución de enzima fría se le agregó acetona a -80 °C y se agitó para eliminar la coloración característica del producto DeniLite II S, se lavó varias veces con acetona fría hasta obtener un precipitado blanco que corresponde a la enzima purificada. El sobrenadante incoloro se eliminó y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente.

4.3.2 Enzima lacasa libre

4.3.2.1 Preparación de la lacasa libre

Del precipitado enzimático que se obtuvo en la sección 3.3.1, se pesaron 3 gramos y se disolvieron en 10 mL de la disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH= 3.7, esta disolución se mantuvo en agitación suave hasta que el precipitado se disolvió completamente. La lacasa disuelta en la disolución amortiguadora de acetatos (extracto enzimático), se refrigeró a 4 °C para conservarla. Este extracto de lacasa se utilizó posteriormente para realizar las reacciones del sistema lacasa-mediador y mediador-sustrato.

Este procedimiento se aplicó para disolver la enzima lacasa en cada una de las soluciones amortiguadoras de acetatos 0.1 M a pH= 5.0, 4.0 y 3.7 respectivamente.

3.2.2 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA

A 800 µL del extracto enzimático, diluido en la disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M, pH= 5.0, se le añadieron 200 µL del reactivo de Bradford (Bio-RAD), manteniendo una agitación constante durante cinco minutos y posteriormente se determinó la variación de la concentración de proteína por espectrofotometría visible, determinando el valor de absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. La cantidad de proteína se calculó a partir de una curva patrón utilizando como reactivo seroalbúmina bovina a las siguientes concentraciones: 2 µg mL⁻¹, 4 µg mL⁻¹, 6 µg mL⁻¹, 8 µg mL⁻¹ y 12 µg mL⁻¹ utilizando una disolución de NaCl 0.15 M para diluir.

4.3.2.3 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD Y PARÁMETROS CINÉTICOS

La actividad de la enzima libre se determinó con ABTS, midiendo el cambio de absorbancia (UA) en función del tiempo (minutos) a las longitudes de onda siguientes: 300 nm, 396 nm, 414 nm, 650 nm, 720 nm, 800 nm. La mezcla de reacción estaba constituida por: ABTS 0.1 M y 0.054 µg mL⁻¹ de proteína enzimática en la solución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH= 5.0, pH = 4.0 y pH= 3.7.

Debido a la pérdida de actividad de la enzima durante su almacenamiento, esta se determinó antes de realizar cada experimento. Los parámetros cinéticos K_m y V_{max} se

obtuvieron de acuerdo con el siguiente procedimiento: a diferentes disoluciones que contenían enzima purificada en las condiciones de pH antes indicadas se les agregó ABTS hasta alcanzar las concentraciones finales 5 mM, 2.5 mM, 1 mM, 0.5 mM, 0.25 mM, 0.1 mM, 0.05 mM y 0.025 mM, los cambios de concentración en la reacción se determinaron por espectrofotometría UV—Vis (de 280 nm a 1100 nm). La velocidad de la reacción de oxidación de ABTS reducido a ABTS^{•+} por la enzima lacasa, se determinó a través del método de las velocidades iniciales (V_o en mM/minuto), siguiendo la aparición del producto (ABTS^{•+} en mM) en función del tiempo (minutos), la pendiente de esta curva de avance de la reacción corresponde a velocidad inicial (V_o en mM/minuto). Este método tiene la ventaja de garantizar que en las etapas iniciales la cantidad de producto formado es mínima y la mayor parte del sistema de reacción esta en la forma del complejo enzima substrato **ES** o complejo de Michaelis-Menten (enzima lacasa saturada por ABTS) y se supone estado estacionario (Haldane- Briggs) para el sistema. Las consideraciones anteriores permiten el uso de la ecuación de la velocidad o de Michaelis-Menten (**M-M**) que se aplica para un solo substrato, cuya expresión relaciona los parámetros cinéticos: velocidad inicial (V_o), velocidad máxima (V_{max}) y concentración del substrato [S].

$$V_o = \frac{V_{max}[S]}{\{K_m + [S]\}} \dots\dots\dots \text{ecuación de Michaelis-Menten (M-M)}$$

De la expresión de **M-M** se obtiene un valor aproximado de **K_m** y V_{max} al representar gráficamente la velocidad inicial (V_o) frente a la concentración del substrato {[S]= ABTS}, la gráfica obtenida corresponde a una hipérbola rectangular lo que dificulta la estimación real de los valores de **K_m** y V_{max}, por lo tanto a partir de la ecuación de **M-M** se han desarrollado transformaciones más útiles para la expresión de los datos cinéticos. Una de las transformaciones más útiles es la que se obtiene tomando los recíprocos de ambos miembros de la ecuación de **M-M**. De donde se obtiene la expresión conocida como la ecuación de Lineweaver-Burk:

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{max}} \left\{ \frac{1}{S} \right\} + \frac{1}{V_{max}}$$

De acuerdo con la ecuación general para una línea recta:

$$y = m * X + b$$

Y considerando que:

$$y = \frac{1}{b}, \quad m = \frac{K_m}{V_{max}} \quad \text{y} \quad b = \frac{1}{V_{max}}$$

A partir de esta expresión se obtuvo una determinación más exacta del valor de V_{max} y de K_m con base en los datos experimentales.

4.3.3 Enzima lacasa inmovilizada

4.3.3.1 FABRICACIÓN DEL SOPORTE (CRISTALES) DE SÍLICA GEL

La fabricación del soporte de sílica gel se realizó mezclando volúmenes iguales de etanol (25 mL), agua destilada (25 mL) y tetraetilortosilicato (25 mL), se agitó suavemente la mezcla para homogeneizar. Se formaron dos fases en el seno de la disolución, a las cuales se agregaron algunas gotas de HCl concentrado, para formar una sola fase. La disolución final obtenida es homogénea e incolora. Ésta disolución se dejó evaporar a temperatura ambiente durante cinco días, el proceso de evaporación favoreció la formación de los cristales de sílica gel, cuyo tamaño se determinó posteriormente y antes de fijar la enzima lacasa.

4.3.3.2 Inmovilización de la enzima lacasa en el soporte de sílica gel

Los cristales de sílica gel se colocaron en 50 mL de una disolución de NaOH 1 M, durante una hora a temperatura ambiente, después de transcurrido este tiempo se separaron por decantación y se lavaron con agua destilada, posteriormente se colocaron en 50 mL de HNO₃ 1 M durante tres minutos a temperatura ambiente y más tarde, se separaron por decantación y se lavaron con agua destilada. Los cristales de sílica se hicieron reaccionar con 10 mL de una disolución de aminopropiltriétoxosilano al 50 % en etanol durante tres horas, transcurrido el periodo de tiempo, se separaron por decantación los cristales y se lavaron con agua destilada, más tarde se mezclaron con glutaraldehído al 10 % y la mezcla de reacción se mantuvo durante tres horas. Después se separaron y finalmente se lavaron varias veces con agua destilada.

El soporte preparado de esta forma se pone en contacto con 25 mL de una solución de enzima con una concentración de 0.5 mg mL⁻¹ en solución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH = 5.0 por un periodo de 12 horas, transcurrido este tiempo los cristales se separaron por decantación y se lavaron con agua destilada, la presencia de lacasa en el agua de los lavado se

evaluó añadiendo ABTS para observar la aparición de un color característico azul-verde del ABTS oxidado ($\text{ABTS}^{\cdot+}$), se hicieron varios lavados hasta que la reacción lacasa-ABTS fue negativa.

4.3.3.3 Determinación de actividad y parámetros cinéticos

Inicialmente se determinó la actividad (U/mg) con cantidades variables del soporte con enzima (80 mg, 100 mg, 120 mg, 160 mg, 180 mg y 200 mg) empleando como sustrato el ABTS, con el objeto de seleccionar la cantidad de soporte con enzima (180 mg) que presentará los valores más altos de actividad (U/mg), esto como consecuencia de que la fijación de la enzima en el soporte es heterogénea y la actividad disminuye como efecto de cambios conformacionales en la enzima lacasa [92-96, 99-101].

Los valores de los parámetros cinéticos se determinaron de la siguiente forma: se pesaron 180 mg del soporte con enzima, y se colocaron en la celda convencional para espectrofotometría Uv-Vis, se agregaron 1.8 mL de buffer de acetatos 0.1 M, pH= 4.0, y se agitó manualmente para homogeneizar la fracción soluble, finalmente se adicionaron 200 μL de una disolución de ABTS 100 mM, se mezcló perfectamente y se procede a determinar los valores de absorbancia (UA) en las longitudes de onda de 300 nm, 396 nm, 414 nm, 650 nm, 720 nm y 800 nm. Se registraron los espectros cada 15 segundos durante 3 horas. Este proceso se realizó utilizando diferentes concentraciones de ABTS (5 mM, 2.5 mM, 1 mM, 0.5 mM, 0.25 mM, 0.01 mM 0.05 mM y 0.025 mM). El experimento se realizó nuevamente empleando una solución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH=5.0 y 3.7. La determinación de los parámetros cinéticos K_m y V_{\max} se realizó como se indica en la sección 4.3.2.3.

4.4 MEDIADORES Y SUBSTRATOS

4.4.1 Caracterización electroquímica

Se realizó la caracterización electroquímica empleando la técnica de voltamperometría cíclica de disoluciones 1 mM de los siguientes compuestos: azul brillante G, rojo cresol, naranja 7, azul de metileno, ácido tánico, amino azotolueno, índigo, ferroína, hidroquinona, ABTS, anilina, *p*-cresol, HBT, FeSO_4 y CuSO_4 . La caracterización de cada compuesto se realizó por separado haciendo barridos de potencial en sentido positivo y negativo partiendo

de un potencial de corriente nula ($E_{i=0}$) y empleando una velocidad de barrido de 100 mV/s. El estudio pretende identificar los procesos de oxidación y reducción característicos de cada reactivo para posteriormente hacer la determinación del potencial redox utilizando los valores de potencial de pico anódico (E_{pa}) y catódico (E_{pc}) de los procesos de oxidación y reducción respectivamente. A partir de este valor se seleccionan a los mediadores y substratos que satisfagan con la condición siguiente: el potencial redox de la enzima lacasa (E_{lac}) cuyo valor teórico varía de acuerdo con su origen y se encuentra en un intervalo de 0.400 V/AgCl-Ag a 0.680 V/AgCl-Ag, debe de ser mayor que el potencial del mediador (E_{med}) y este a su vez debe ser mayor que el potencial de cada substrato (E_{sub}), es decir $E_{lac} > E_{med} > E_{sub}$; el cumplimiento de esta condicionante predice la espontaneidad de la reacción entre el mediador seleccionado y la enzima y por lo tanto del sistema mediador-substrato.

Todas las mediciones se realizaron en un Potenciostato-Galvanostato, modelo PAR 273, EG&G, con un sistema de tres electrodos empleando una disolución reguladora de acetatos 0.1 M a pH=5.0 como electrolito de soporte. Como electrodo de trabajo se utilizó un disco de carbón vítreo (0.706 cm²), como electrodo auxiliar un alambre de platino y como electrodo de referencia KCl_(sat)-AgCl_(s)-Ag. El electrodo de trabajo se pulió hasta un acabado de espejo con alúmina para garantizar la homogeneidad de la superficie.

4.4.2 Caracterización espectrofotométrica

Con base en los criterios previamente establecidos en la sección 3.4.1 se seleccionaron los compuestos ABTS, ferroína, hidroquinona, aminoazotolueno, ácido tánico, p-cresol e índigo y se realizó una caracterización por espectrofotometría UV-Vis. Los compuestos seleccionados se prepararon a una concentración 50 mM en una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH= 5.0. Para obtener los espectros de absorción ultravioleta-visible (UV-Vis) de cada compuesto, se hicieron diluciones de cada uno de ellos en la disolución amortiguadora de acetatos, para posteriormente obtener el espectro de absorción UV-Vis en el intervalo de longitudes de onda de 280 nm a 1100 nm. A partir de las representaciones gráficas obtenidas se determinaron las longitudes de onda (nm) de máxima absorción, características de cada compuesto con sus correspondientes coeficientes de extinción molar (M⁻¹cm⁻¹).

Esta caracterización espectrocópica de cada uno de los compuestos, se realizó con objeto de determinar la longitud (es) de onda de máxima absorción de cada uno de ellos, y evitar las zonas de interferencias espectrales que se puedan presentar al realizar la reacción lacasa-mediador y mediador—substrato. Y de esta forma garantizar que los resultados obtenidos no se interpreten de forma errónea.

4.5 Sistema lacasa-mediador

La caracterización del sistema lacasa-mediador, se realizó a partir del conocimiento que se tiene de la actividad y parámetros cinéticos de la lacasa utilizando como substrato el ABTS. Esta evaluación se hizo con la finalidad de determinar la afinidad de la enzima (K_m), por el substrato (ferroína e hidroquinona), velocidad de formación del complejo ES (V_{max}) y finalmente la eficiencia del sistema lacasa-mediador, comparándolo con el sistema lacasa-ABTS, los resultados obtenidos proporcionaron evidencias suficientes para determinar si estos compuestos pueden ser competitivos con el ABTS, y de esta manera sustituirlo como mediador.

4.5.1 Lacasa libre- mediador

Los parámetros cinéticos de la lacasa con cada mediador (ferroína e hidroquinona) se determinaron experimentalmente en la disolución amortiguadora de acetatos a pH= 5.0, 4.0 y 3.7 respectivamente. Estos parámetros se determinaron como se indica en la sección 3.3.2.3 y los datos obtenidos se utilizaron para caracterizar posteriormente a la reacción lacasa-mediador.

4.5.2 Lacasa inmovilizada en soporte de sílica-mediador

Después de haber caracterizado a la enzima inmovilizada utilizando como substrato el ABTS se procedió a realizar la reacción de lacasa inmovilizada—mediador (hidroquinona y ferroína), para ello se realizó el procedimiento descrito en la sección 3.3.3.3. Los parámetros cinéticos de la lacasa en presencia de estos nuevos mediadores se determinaron como se indica en la sección 3.3.2.3. Los valores que se obtienen se emplearon para la evaluación cuantitativa de la reacción entre el mediador y el substrato.

Este mismo procedimiento se aplicó cuando se emplearon disoluciones amortiguadoras de acetatos 0.1 M a pH= 4.0 y 3.7 respectivamente.

4.6 Sistema mediador-substrato

La reacción en el sistema mediador-sustrato se realizó de acuerdo con lo informado. La reacción representativa del sistema es ABTS-índigo, sin embargo, como ya esta bien caracterizada [52] no se realizó nuevamente. La reacción mediador-substrato se realizó empleando al índigo como modelo y a la ferroína $[\text{Fe}(\text{fen})_3^{2+}]$ como mediador.

4.7 ESTEQUIOMETRÍA DE LA REACCIÓN MEDIADOR-SUBSTRATO

Para evaluar la reacción ferroína $[\text{Fe}(\text{fen})_3^{3+}]$ -índigo, se calculó la concentración del mediador que reaccionaría con una cantidad equimolar del índigo para lo cual se colocaron en una celda de cuarzo 2.5 mL de una disolución de ferroína a una concentración 2×10^{-4} M preparada en la disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH= 3.7, se hicieron veinte adiciones de 50 μL del índigo preparado a una concentración 2.4×10^{-1} M en la disolución amortiguadora de acetatos 0.1M a pH= 3.7, después de hacer cada adición de índigo, se agitó la mezcla para homogeneizarla, se dejó reposar algunos segundos y se obtuvieron los espectros correspondientes de absorción electrónica UV-Vis en el intervalo de longitudes de onda de 190 nm a 820 nm, para cada adición.

El análisis de datos absorbancia (UA) contra volumen de índigo agregado, se realizó a 608 nm y 513 nm, que son las longitudes de onda características para la absorción electrónica de índigo y ferroína $[\text{Fe}(\text{fen})_3^{2+}]$ respectivamente. Con estos resultados se realizó el correspondiente estudio estadístico para determinar la estequiometría de la reacción.

CAPÍTULO V

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA LACASA

La enzima lacasa de *Miceliophthora termophila* clonada en *Aspergillus oryzae* (EC 1.10.3.2) se purificó y concentró a partir del producto comercial DeniLite II S de la compañía Novo Nordisk, a través del procedimiento indicado en la sección 4.3.1

5.2 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA

La preparación de la enzima y la posterior determinación de proteína se realizaron como se indica en las secciones 4.3.2.1 y 4.3.2.2 respectivamente.

La enzima lacasa tratada presentó un contenido de proteína de 269.0 µg/mL, cantidad proteica que concuerda con la información indicada por Li y colaboradores en 1999 [33], quién trabajó con la misma enzima de *Miceliophthora termophila*.

5.3 ENZIMA LIBRE EN SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE ACETATOS

5.3.1 Determinación de actividad

La actividad de la enzima se determinó, empleando disolución diluidas del extracto enzimático obtenido en la sección 4.1 en una disolución de 0.1 M de ABTS disuelto en una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH= 5.0, la concentración de ABTS tuvo como finalidad saturar el sitio activo de la enzima, para formar el complejo [ES] y garantizar que toda la enzima se encontrara en esta forma. La lacasa se evaluó a diferentes diluciones 1:100, 1:1000 y 1:10000 del extracto enzimático, estas diluciones se hicieron en la disolución amortiguadora indicada anteriormente.

Para determinar la actividad enzimática, se colocaron en una celda de reacción (celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico), 1700 µL de la disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH= 5.0, y se agregaron 200 µL de una disolución 0.1 M de ABTS, agitando para homogeneizar la mezcla, finalmente se adicionaron 100 µL de la dilución del extracto de lacasa, esta mezcla se homogeneizó. Para obtener los cambios de concentración de ABTS a

ABTS^{•+}, se obtuvieron los espectros de absorción electrónica, cada tres segundos, a las longitudes de onda de 396 nm, 414 nm, 650 nm, 728 nm y 810 nm.

Se sabe que la absorbancia obtenida a 414 nm presenta una interferencia espectral debido a la interacción de ABTS^{•+} con ABTS de acuerdo con [41-43]; sin embargo, Solís en el 2005 demostró que el, ABTS^{•+} presenta una absorción específica a 650 nm, 728 nm y 810 nm, sin existir interferencia espectral de otro compuesto químico. A partir de esta referencia se analizaron los datos experimentales obtenidos a 650 nm, 728 nm y 810 nm.

La tendencia de los datos absorbancia (UA) contra tiempo (minutos) en cada caso es lineal, por lo que se realizó una regresión lineal, que se ajustó de acuerdo con la ecuación de una línea recta (figura 2):

$$y = m * X + b$$

A partir de los resultados se determinó la actividad enzimática, empleando el valor de la pendiente (m) del ajuste lineal, los cálculos correspondientes se presentan en la siguiente ecuación:

$$Actividad = \frac{m}{36000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}} * [diluciónEnzima] [dilución[ABTS]] \frac{1}{[proteínaenzimática]}$$

Donde:

m= pendiente, ε= coeficiente de extinción molar del ABTS 36000 M⁻¹cm⁻¹

Dilución enzimática= dilución de lacasa en la solución reguladora de acetatos 0.1 M, pH= 5.0

Diluciones de ABTS= dilución de ABTS en la celda utilizando la solución reguladora de acetatos 0.1 M a pH= 5.0

Contenido de proteína enzimática= contenido de proteína enzimática de lacasa

La actividad experimental calculada fue de 0.59 U mL⁻¹, a 728 nm, que es la longitud de onda que presenta la mejor correlación (0.9964). Este valor se encuentra dentro del intervalo de actividades reportadas por Xu en 1996 y 1998 [48,61] de 0.2 a 14 U mL⁻¹, para la enzima lacasa de *Miceliophthora termophila* clonada en *Aspergillus oryzae*, actividades que se determinaron bajo condiciones ambientales. Otros trabajos informan resultados de actividad mayor, como Li en 1999 [63], que indica valores en un intervalo de 80 a 200 U mL⁻¹ a una temperatura de 70 °C, para la enzima de *Miceliophthora termophila* sin clonar. Probablemente la disminución de actividad de la enzima clonada obedece a la posible modificación de la

secuencia de aminoácidos que se encuentran unidos al sitio activo, afectando la efectividad de la unión con el substrato [1, 49-51].

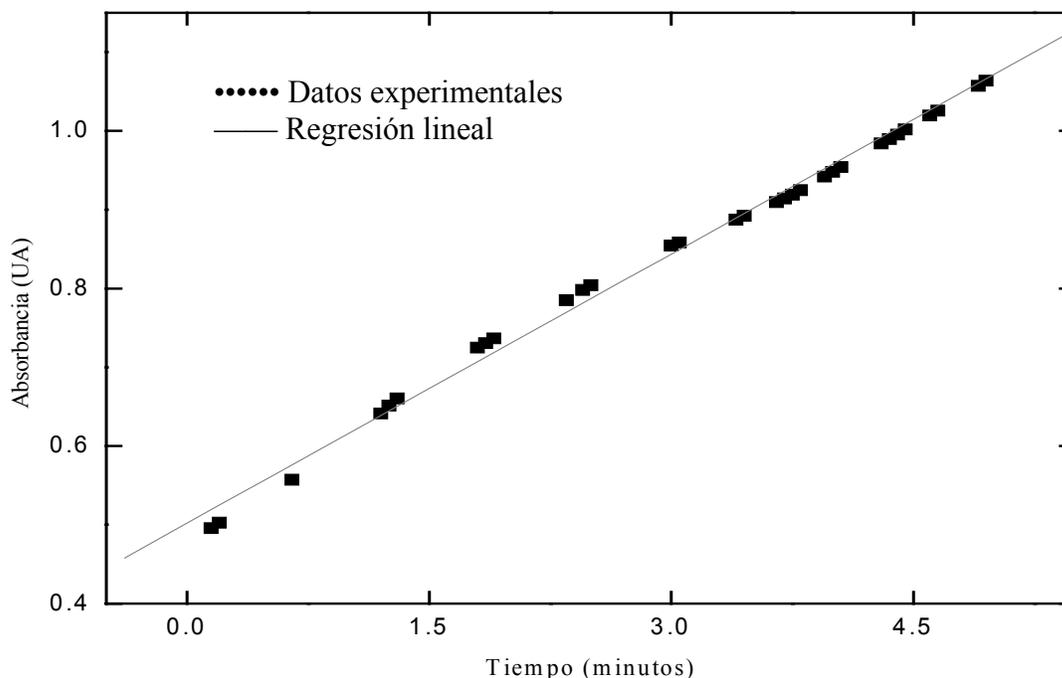


Figura 2. Representación gráfica de los datos experimentales de absorbancia a 728 nm como función del tiempo, para la determinación de la actividad de lacasa (libre) empleando una disolución 0.1 M de ABTS como substrato en una disolución de acetatos 0.1 M a pH= 5.0 y una dilución 1:10000 del extracto enzimático. Curva semejante a las obtenidas para la absorbancia a 650 y 810 nm.

5.3.2 Determinación de parámetros cinéticos

La determinación de la actividad de la lacasa, es el parámetro a través del cual se establece la cantidad de enzima que se va a utilizar, para evaluar experimentalmente los parámetros cinéticos K_m y V_{max} . Con esta información se puede hacer una estimación teórica acerca de la velocidad de reacción y estabilidad de la enzima en condiciones dadas. La determinación experimental de los valores de K_m y V_{max} , como parámetros cinéticos, reviste particular importancia porque a partir de ellos se sabe como es la afinidad de la enzima por el substrato (K_m), y a qué velocidad se transforma el complejo ES (V_{max}) en producto. También es posible evaluar la eficiencia catalítica del sistema (k_{cat}), indicando la efectividad de la enzima como catalizador en la reacción investigada.

Los parámetros cinéticos se determinaron, empleando diferentes concentraciones de ABTS y una concentración constante de lacasa, las diversas mezclas de reacción estuvieron constituidas por lacasa libre y ABTS, ambos en una solución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH= 5.0.

El avance de cada reacción se evaluó por espectrofotometría de absorción electrónica UV-Vis, de forma semejante a las determinaciones realizadas en la sección 5.3.1, obteniéndose en cada caso figuras semejantes a la figura 2. El análisis de estos datos se realizó siguiendo una cinética de primer orden para determinar el valor de V_o , que representa la pendiente de la gráfica $\ln [\text{ABTS}^{++}]$ en función del tiempo.

Los resultados obtenidos para V_o se representaron gráficamente como V_o (mM/minuto) contra $[\text{ABTS}]$ en mM] (figura 3). A partir de esta curva es difícil de determinar los valores de K_m y V_{\max} , por lo que se recurre al tratamiento matemático de Lineweaver-Burk, como se indica en la sección correspondiente, finalmente se obtiene la gráfica (figura 4) ($1/V_o$ contra $1/[\text{ABTS}]$, recíprocos inversos de la figura 3), a partir de donde se calcula el valor de K_m y V_{\max} , de acuerdo a las ecuaciones descritas en la sección 4.3.2.3.

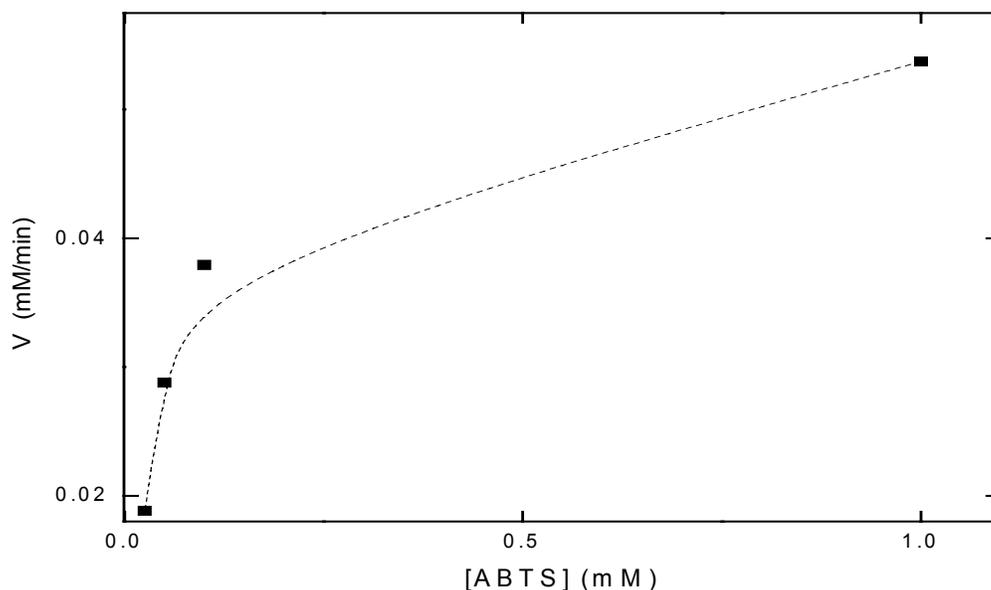


Figura 3. Representación gráfica característica de la ecuación de M-M, que indica la variación de la velocidad inicial (V_o) en mM/minuto con respecto a $[\text{ABTS}]$ en mM, para la determinación de los parámetros cinéticos K_m y V_{\max} , en la reacción enzimática de lacasa libre con $[\text{ABTS}]$, en una disolución reguladora de acetatos 0.1 M a pH= 5.0.

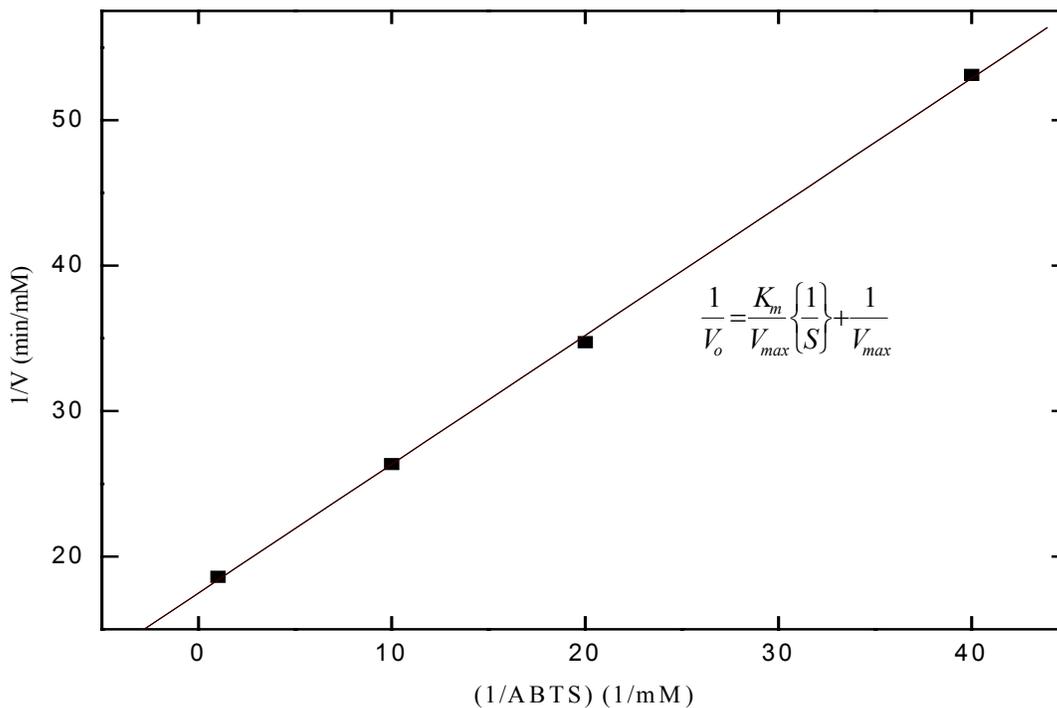


Figura 4. Gráfica del recíproco de la ecuación de Michaelis-Menten (tratamiento de Lineweaver-Burk), para la evaluación de K_m y V_{max} en la reacción de lacasa libre con ABTS.

El valor de K_m para la reacción de ABTS con lacasa, fue de 1.01 mM y se conoce como la constante de Michaelis, la cual se asocia a la afinidad de la enzima por el substrato. Los valores grandes de K_m indican alto grado de disociación con baja afinidad. Los valores pequeños de K_m , indican alta afinidad enzima-substrato y bajo grado de disociación. En este caso, el valor de K_m es grande comparado con el informado por Li y colaboradores en 1999 ($K_m = 0.2$ mM) [63], para lacasa del mismo organismo no clonado; por lo tanto, se tiene una mayor afinidad ES en este sistema. Quan y colaboradores en 2005 [96], informan un valor de K_m de 160 mM para el mismo organismo clonado, un valor muy grande, que indica una muy baja afinidad de la enzima por el substrato, lo que los autores han atribuido a la afinidad de la molécula de ABTS, por el sitio activo de la enzima modificada. El análisis de estos parámetros indican que la manipulación genética de la enzima al clonarla, modifica en algún grado el sitio activo de la enzima, lo que tiene una consecuencia directa sobre la afinidad de la enzima por el substrato, ABTS, en este caso.

El valor de V_{max} que se obtienen es de 0.074 mM/minuto y se refiere a la velocidad de formación del complejo ES, este dato se encuentra dentro del intervalo informado en la

literatura por Xu y colaboradores en 1996 y 1998 [61, 84], que incluye valores de 0.051 mM/minutos a 200 mM/minutos, para esta misma lacasa, indicando que estos valores varían en función del pH y de la temperatura. La eficiencia catalítica de la enzima fue k_{cat} de 85.03 min^{-1} , una eficiencia relativamente baja para esta enzima; en las determinaciones realizadas por Xu y colaboradores en 1998 [61] se informan eficiencias mínimas de 100 min^{-1} , para la misma lacasa del organismo clonado. Li en 1999 [63], para la enzima no clonada indica un valor de 713 min^{-1} , pero Villaseñor en 2004 [112] y López en 2005 [comunicación personal], presentan resultados de 713 min^{-1} , iguales a los informados por Li en 1999 [63], para la enzima del organismo clonado. Estas variaciones de eficiencia catalítica para la lacasa de *Myceliophthora termophila* clonada en *Aspergillus oryzae*, son debidas probablemente a los métodos de purificación y concentración de la enzima, empleados por Villaseñor y López [112.comunicación personal].

Los valores de actividad y parámetros cinéticos se realizaron en una disolución reguladora de acetatos 0.1 M a un valor de pH= 5.0. Las reacciones que se llevaron a cabo entre la enzima libre y el ABTS fueron poco cuantitativas y sumamente lentas a este valor de pH, este resultado se atribuye principalmente al posible impedimento de la enzima para la efectiva interacción con el ABTS. La necesidad de encontrar alternativas para este trabajo, llevó a la modificación de las condiciones experimentales, para mejorar la velocidad de la reacción mediador-enzima. En los diversos trabajos informados por Xu y colaboradores en 1996, 1998 y 2001 [61, 84, 103] y Bourbonnais y colaboradores en el 2004 [20-23], muestran el incremento en la actividad catalítica de la enzima con la disminución del pH, probablemente debido a un cambio en el potencial redox de la enzima. Los trabajos informan que estos cambios se presentan en un intervalo de pH de 3.5 a 9.0, para lacasa obtenida de *Myceliophthora termophila* clonada en *Aspergillus oryzae*, y se atribuye a la presencia de grupos ionizables en torno al sitio activo de la enzima, así como al número y tipo de aminoácidos cisteína e histidina presentes en el sitio [20-23].

A partir de esta información se procedió a la caracterización de la enzima utilizando como substrato al ABTS a dos valores más de pH, 4.0 y 3.7. Los resultados fueron obtenidos en procedimientos similares al anterior (pH= 5.0) y los valores para estos casos, se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Valores de K_m , V_{max} y k_{cat} para la enzima libre empleando ABTS como sustrato, en disoluciones reguladoras de acetatos 0.1 M a pH= 5.0, 4.0 y 3.7.

Parámetro	ABTS pH=5.0	ABTS pH=4.0	ABTS pH= 3.7
Actividad (U/mg)	192	303	1682
V_{max} (mM/min)	0.070	0.074	0.156
K_m (mM)	0.240	1.005	0.053
k_{cat} (min) ⁻¹	0.703	85.03	15.80
k_{cat}/K_m (mM min) ⁻¹	2.930	84.64	300.3

Los datos experimentales obtenidos a pH= 4.0 y 3.7 son de 303 y 1682 U mg⁻¹, respectivamente muestran que la actividad se incrementa 5 veces aproximadamente, de pH 4.0 a 3.7, y se presenta un aumento de actividad de alrededor de 8 veces, de pH 5.0 a 3.7. El aumento de actividad al modificar el pH, se explica por el efecto de la modificación del sitio activo de la enzima. Xu en 1996, 1998 y 2001 [61, 84, 103], en los diversos trabajos realizados acerca de la enzima, indica el efecto del pH sobre el sitio activo, indicando que este sitio queda más expuesto al disminuir el pH, en un intervalo de 5.0 a 3.5, estableciendo que a valores mayores a 5, se presentan efectos de inhibición, que tienden a disminuir la actividad enzimática [49-51]. Por lo tanto, el incremento de actividad de lacasa al disminuir el pH de 5.0 a 4.0 y 3.7, son congruentes con la información de la literatura.

Las velocidades de formación del complejo **ES**, V_{max} no se modifican drásticamente como sucede con la actividad como se muestra en la tabla 5. A pH= 5.0 y 4.0, las V_{max} son prácticamente iguales (0.070 y 0.074 mM min⁻¹, respectivamente), la variación más notable de V_{max} , es la que hay de pH= 5.0 a 3.7, en donde la velocidad de formación del complejo **ES** se duplica, como efecto del aumento de actividad de la lacasa y de la mayor exposición del sitio activo y en consecuencia un incremento en la interacción entre la lacasa y el ABTS, que favorece la formación del complejo **ES**.

La K_m conocida como la constante de Michaelis, se asocia con la afinidad de la enzima por el sustrato. Por lo tanto, los valores grandes de K_m indican alto grado de disociación con

baja afinidad de la enzima por el sustrato, los valores pequeños de K_m , indican alta afinidad enzima-sustrato y bajo grado de disociación de este complejo.

Los valores de la constante de Michaelis K_m experimentales, presentan variaciones al disminuir el pH (tabla 5). Hay una mayor afinidad de la enzima a pH= 3.7 ($K_m= 0.053$ mM) que a pH= 4.0 ($K_m= 1.005$ mM) y 5.0 ($K_m= 0.240$ mM); pero la afinidad a pH= 5.0 es mayor que a pH= 4.0. Estos cambios, no siguen un patrón definido, lo que es posible, sea debido a la modificación del sitio activo y de los aminoácidos que se encuentran en torno a éste, lo que afecta la afinidad de la enzima por el sustratos (ABTS) [1, 49, 51].

La constante catalítica ($k_{cat}= V_{max}/[E_T]$) o número de recambio, es el número de procesos de reacción (recambio) que cataliza el sitio activo por unidad de tiempo y está en función de la concentración de proteína enzimática $[E_T]$. El valor de esta constante al relacionarse con la afinidad de la enzima por $[S]$, y que corresponde al valor de K_m , en la relación k_{cat}/K_m , define la eficiencia del sistema y por lo tanto, la transformación enzimática de las moléculas de sustrato por minuto (k_{cat}/K_m). En general esta expresión tiene su máximo valor cuando la formación del producto a partir del complejo **ES** es más rápida que su descomposición hacia los reactivos iniciales sustrato y enzima, lo que indica que la enzima cataliza la reacción cada vez que se une a una molécula de sustrato.

Los resultados obtenidos para la eficiencia del sistema estudiado, se incrementan al disminuir el pH de 5.0 a 4.0 y a 3.7, aumentando de 2.930 (mM minuto)⁻¹, a 84.64 (mM minuto)⁻¹ y 300.3 (mM minuto)⁻¹, valores que se relacionan directamente con la afinidad de la enzima por el sustrato y la velocidad de formación del complejo **ES**, por lo tanto el análisis anterior de K_m y V_{max} , justifica el incremento de la eficiencia de la enzima.

5.4 ENZIMA LACASA INMOVILIZADA EN SOPORTE DE SÍLICA GEL

La caracterización de la lacasa libre en una disolución de acetatos, es un punto de referencia para continuar con la inmovilización de la enzima, que tiene las ventajas siguientes: la reutilización de la enzima, aumento de la estabilidad y disminución de costos del proceso al ser reciclada la enzima.

Estos son factores que la enzima libre no posee, por lo que se decidió inmovilizar a la lacasa en un soporte de sílica gel. Por lo tanto, es necesario caracterizar a la enzima inmovilizada, proteica y cinéticamente, además de determinar su actividad.

5.4.1 Determinación de actividad y cantidad de proteína

La cantidad de proteína se determinó en diferentes cantidades de soporte, que se colocaron en un celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico, se agregó solución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH= 5.0, se homogeneizó adecuadamente y se adicionó finalmente el ABTS, se mezcló adecuadamente, procediendo a registrar los cambios de concentración de ABTS⁺⁺, en forma semejante a lo realizado con la enzima libre (sección 4.3). La actividad se determinó utilizando cantidades variables de sílica gel, con el objeto de identificar la cantidad más adecuada de soporte con enzima. Para lo cual, se busca el resultado con el mayor contenido de proteína que presente mayor actividad. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 6. Se puede observar que la mayor actividad y contenido de proteína se encuentran en los 160 mg y 180 mg de soporte respectivamente, lo que indica que la distribución de los sitios activos de la enzima en el soporte, es sumamente heterogénea [100-111]; por lo tanto, la actividad y el contenido de proteína no son constantes. Es importante aclarar que la evaluación de los parámetros se hizo en cantidades de soporte superiores a los 180 mg, pero el soporte colocado en la celda, interfirió con el haz de luz del equipo y el registro de las lecturas generaba imprecisiones en la medición, limitando la cantidad de soporte empleado para hacer las determinaciones; obteniéndose registros libres de interferencia con la cantidad máxima de 180 mg de soporte.

Tabla 6. Actividad y contenido de proteína para diferentes cantidad de soporte con lacasa, utilizando como sustrato ABTS, en una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH= 5.

CANTIDAD DE ENZIMA INMOVILIZADA	CANTIDAD DE PROTEÍNA (1X10⁻³) (µg)	ACTIVIDAD (1X10⁻⁶) (U/ mg)
180	1.21	20.4
160	1.08	24.5
140	0.94	12.0
120	0.81	2.40
100	0.68	1.36
80	0.54	2.36

5.4.2 Determinación de parámetros cinéticos

Una vez que se determinó la cantidad de soporte con enzima más adecuada, que tuviera la mayor actividad, se realizó la caracterización de la enzima inmovilizada en el soporte de sílica gel. Los valores de actividad obtenidos se emplearon como referencia para determinar los parámetros cinéticos V_{\max} y K_m , a partir de ellos se hizo la estimación indirecta acerca de las velocidades de reacción para un sistema dado.

Considerando lo anterior, una vez que se determinó la actividad enzimática, se hizo la evaluación de los parámetros cinéticos, lo cual se realizó empleando diferentes concentraciones de ABTS y una cantidad constante del soporte con lacasa. Las diversas mezclas de reacción estuvieron constituidas por soporte con lacasa y ABTS, ambos en una solución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH= 5.0, esta caracterización se realizó también a pH 4.0 y 3.7, tal como se indica en la sección 4.3.2.4.

La determinación de los parámetros cinéticos en la enzima inmovilizada se hizo a los tres valores de pH indicados, tomando como referencia la cantidad de soporte con enzima seleccionado de los datos presentados en la sección 5.4.1. La evaluación de los datos experimentales se realizó, de manera similar a la que se indica en la sección 5.3.1 y 5.3.2 para la enzima libre. Los valores de actividad y parámetros cinéticos para la enzima inmovilizada en un soporte de sílica gel se determinaron inicialmente a un valor de pH= 5.0 en buffer de acetatos 0.1 M. Sin embargo, las reacciones que se llevaron a cabo entre la lacasa inmovilizada y el ABTS fueron poco cuantitativas y sumamente lentas, a este valor de pH (tabla 7). Esta disminución está asociada a la modificación que sufre la conformación natural de la enzima, como consecuencia del efecto de fijarla al soporte de sílica gel [49-51, 92], así como también al acoplamiento incompleto de la molécula de ABTS, con el sitio activo de la enzima [94]. Al igual que la caracterización de la enzima libre, el mismo procedimiento se aplicó a la enzima inmovilizada en el soporte de sílica a pH= 4.0 y 3.7. Los parámetros cinéticos y actividad de la enzima inmovilizada, se obtienen a pH= 5.0, 4.0 y 3.7, se presentan en la tabla 7. Los valores de estos parámetros se incrementan al disminuir el valor de pH, confirmando la información de la revisión bibliográfica [63, 82, 83].

Tabla 7. Valores de K_m , V_{max} y K_{cat} obtenidos para la enzima lacasa inmovilizada en soporte de sílica empleando ABTS como sustrato y disoluciones reguladoras de acetatos a pH= 5.0, 4.0 y 3.7.

Parámetro	ABTS pH= 5.0	ABTS pH= 4.0	ABTS pH= 3.7
Actividad (U/mg)	24.5	222	774
V_{max} (mM/min)	0.01	0.05	0.06
K_m (mM)	1.90	0.99	0.90
k_{cat} (min) ⁻¹	4.22	65.2	65.1
k_{cat}/K_m (mM min) ⁻¹	2.21	66.1	72.6

Sin embargo los resultados cinéticos y de actividad son menores en todos los casos cuando son comparados con los obtenidos para la enzima libre (tabla 8). Los datos que son representativos del efecto de la inmovilización sobre la actividad de la enzima son los referidos a la actividad por mg de proteína como lo informa Li en 1999 [63] y Xu en 2001 [103], estos datos se presentan en la tabla 8.

Tabla 8. datos experimentales de actividad para lacasa libre e inmovilizada en soporte de sílica, a pH= 5.0, 4.0 y 3.

Parámetro	Actividad (U mg⁻¹)		
pH	5.0	4.0	3.7
Lacasa libre	192	303	1682
Lacasa inmovilizada	24.5	222	774

La caracterización de la enzima lacasa en estado libre e inmovilizada en el soporte de sílica, proporcionó la información necesaria para conocer la afinidad de la enzima hacia el sustrato (ABTS). Para posteriormente evaluar los parámetros cinéticos requeridos para hacer la cinética enzimática. Conociendo estas características de lacasa con ABTS (mediador), se consideró importante investigar la actividad, afinidad y velocidad de acomplejamiento con otros sustratos diferentes al ABTS.

Las reacciones indicadas anteriormente forman parte del sistema lacasa-mediador-substrato establecido en la literatura (Figura 5), el cual está constituido por una serie de reacciones, que como se propone en este trabajo deben de cumplir con la condición energética de los potenciales redox (Figura 6): $E_{lacasa} > E_{mediador} > E_{substrato}$, por lo tanto, es importante conocer las características redox de los compuestos que integran el sistema y para ello, se decidió iniciar el trabajo con la caracterización electroquímica de un grupo de compuesto, buscando satisfacer la condición de potenciales establecida, en donde el potencial redox de la enzima ($E_{lac} = 0.680 \text{ V/AgCl-Ag}$) [63] es mayor que el potencial del mediador (E_{med}), además se buscó que se tratará de sistemas reversibles, y con base en estos resultados, seleccionar a aquellos posibles compuestos que funcionan de forma similar al ABTS, compuesto utilizado, como el mediador de referencia en este trabajo.

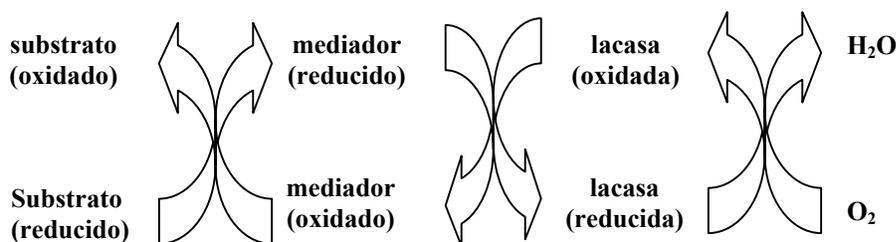


Figura 5. Sistema lacasa-mediador-substrato

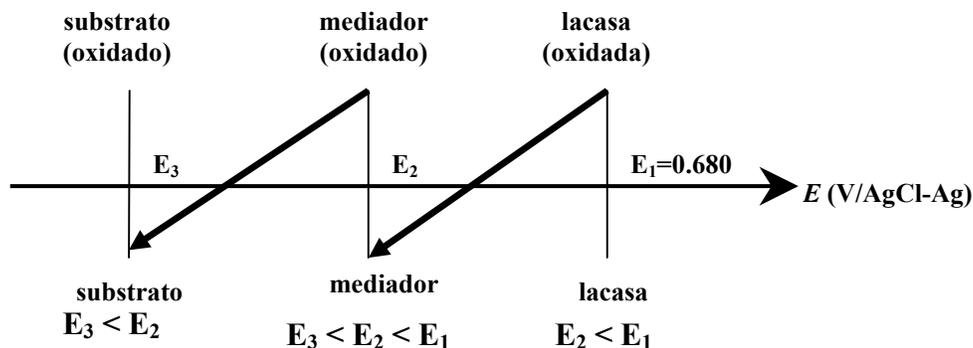


Figura 6. Esquema de potenciales redox en donde se indica el orden de las reacciones que proceden espontáneamente.

5.5 MEDIADORES Y SUBSTRATOS

5.5.1 Caracterización electroquímica

Para conocer los procesos electroquímicos que presenta cada uno de los compuestos estudiados como posibles mediadores (ácido tánico, *p*-cresol, FeSO₄, hidroquinona, ABTS, y ferroína) (figura 7) y sustratos (índigo, aminoazotolueno, azul brillante G) (figura 7), se realizó la caracterización electroquímica de cada uno de ellos, con objeto de conocer los procesos de oxidación y reducción de cada compuesto, y establecer los potenciales característicos de cada uno de ellos, así como, verificar la reversibilidad del sistema

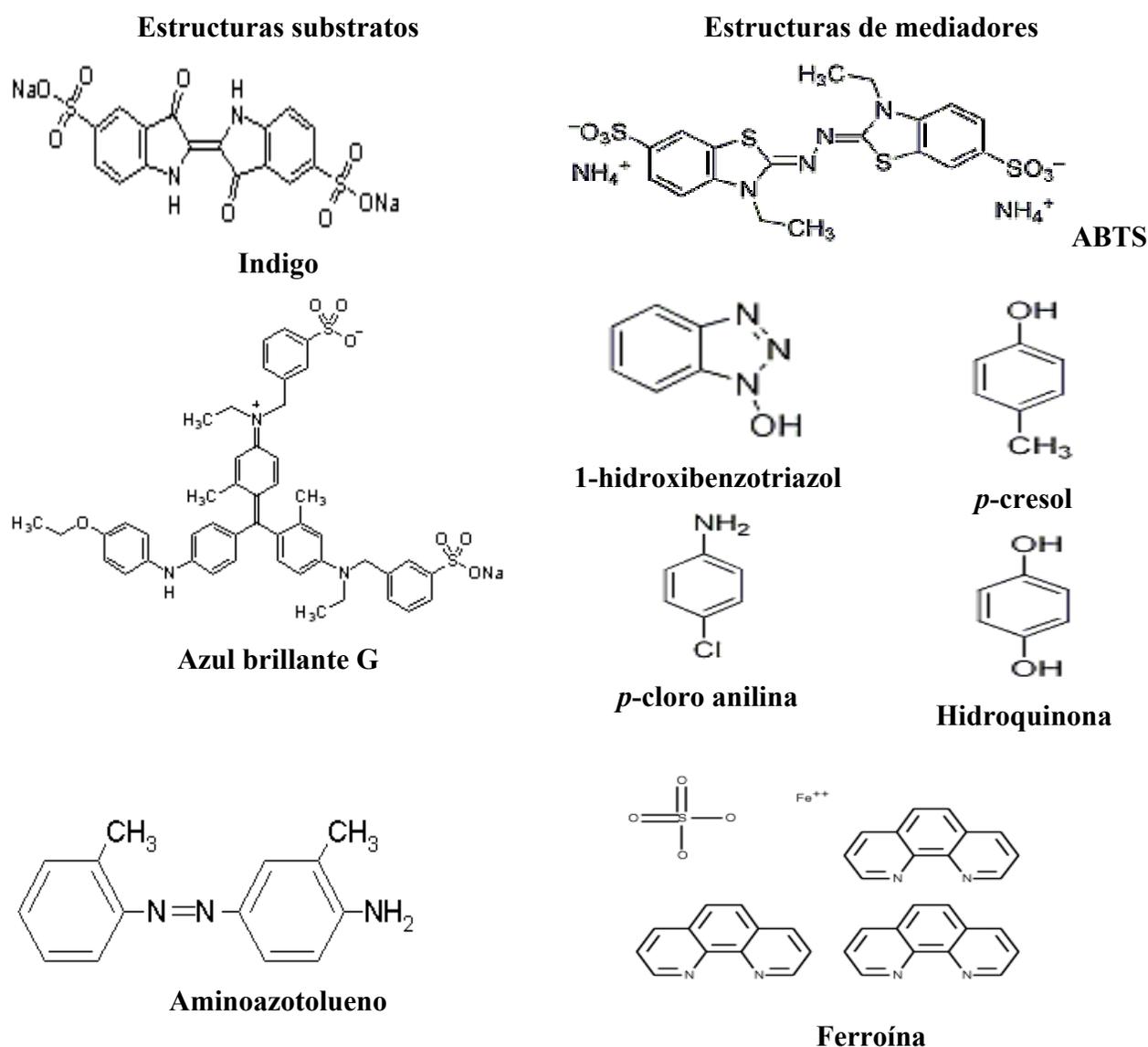


Figura 7. Estructuras de los compuestos seleccionados como posibles mediadores y sustratos.

Con base en los resultados de esta caracterización, se seleccionó a aquellos compuestos que presentaban un proceso de oxidación y su correspondiente valor de potencial de media onda fuera inferior al potencial redox de la enzima lacasa ($E_{lac} = 0.680 \text{ V/AgCl-Ag}$), que fue la condición esencial propuesta, para que la reacción procediera de forma espontánea, en el sistema lacasa-mediador, como se indica en la figura 8, se presenta gráficamente, el potencial del mediador de referencia ($E_{ABTS} = 0.440 \text{ V/AgCl-Ag}$) y el potencial de la lacasa ($E_{lac} = 0.680 \text{ V/AgCl-Ag}$).

La otra condición no menos importante, fue la de tener sistemas con mediadores electroquímicamente reversibles, para establecer un proceso cíclico en donde se pudiera recuperar al compuesto que funciona como mediador.

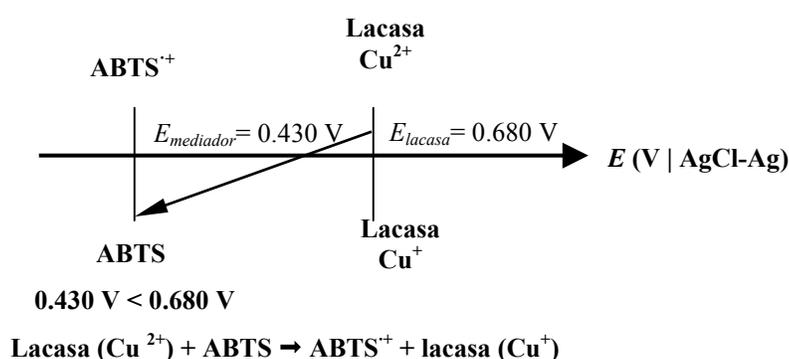


Figura 8. Representación gráfica del potencial redox del mediador y de la enzima, en donde E_{ABTS} debe de ser menor que E_{lac} , para que la reacción sea eficiente.

Para realizar esta caracterización se utilizó un sistema de tres electrodos, con un electrodo de carbón vítreo como electrodo de trabajo, todo ello inmerso en una solución reguladora de acetatos, las determinaciones se hicieron, procediendo como se indica en el protocolo de la sección 3.4.1.

5.5.1.1 MEDIADORES

Se obtuvieron los voltamperogramas a 100 mV/s, para ABTS, hidroquinona, sulfato ferroso, ferroína, *p*-cresol y ácido tánico, a una concentración 1 mM.

5.5.1.1.1 Voltamperogramas de ABTS.- El ABTS es el compuesto más utilizado como mediador en diversos procesos con la enzima lacasa, y está ampliamente informado en la literatura, por lo tanto, resulta de utilidad realizar la caracterización electroquímica para

comprobar la hipótesis de trabajo y tener además un punto de comparación con los otros compuestos que presenten características de mediador. El ABTS empleado como mediador de referencia, requirió de la evaluación de su comportamiento y se caracterizó en las condiciones de trabajo (temperatura y presión ambiente).

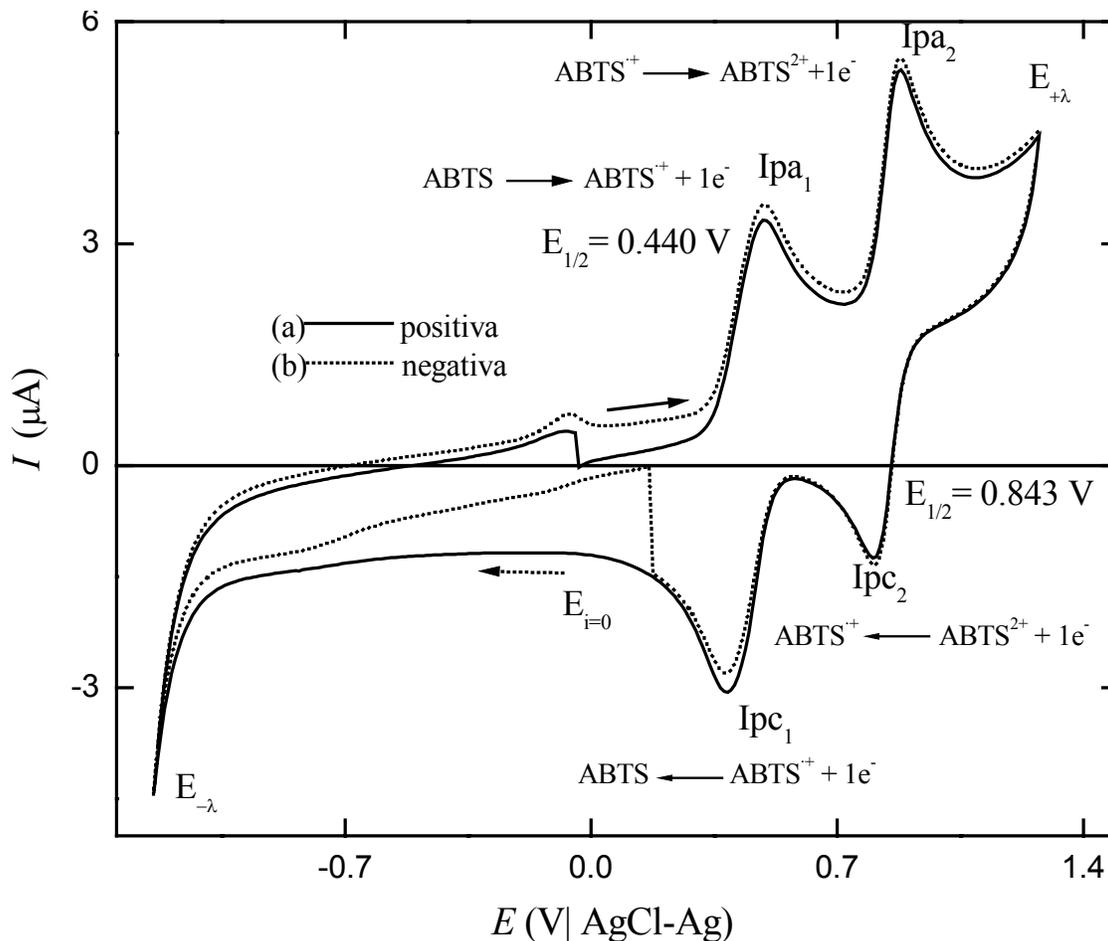


Figura 9. Voltamperogramas cíclicos típicos de una disolución 0.4 mM de ABTS obtenidos a 100 mV/s sobre un electrodo de carbón vítreo (0.706 cm²) empleando como electrolito soporte, una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH = 5.0, iniciando el barrido de potencial en dirección (a) — positiva y (b) negativa.

La figura 9 muestra los voltamperogramas cíclicos típicos de una disolución 0.4 mM de ABTS obtenidos a 100 mV/s, iniciando el barrido de potencial tanto en sentido positivo (Figura 9a) como en sentido negativo (Figura 9b). En el voltamperograma iniciado en sentido positivo (figura 9a), en el intervalo de $E_{i=0}$ a $E_{+\lambda}$ se observan dos procesos de oxidación (I_{pa1} , I_{pa2}) cuyos valores de potencial de pico anódico (E_{pa1} y E_{pa2}) son 0.494 y 0.881 V/AgCl-Ag respectivamente. Cuando se invierte la dirección del barrido, se observan dos procesos de reducción en el intervalo de $E_{+\lambda}$ a $E_{-\lambda}$ (I_{pc1} , I_{pc2}) a valores de potencial de pico catódico (E_{pc1}

y E_{pc2}) de 0.386 y 0.805 V/AgCl–Ag. Cuando el barrido del potencial se inicia en la dirección negativa (figura 9b), no se observan procesos de reducción en el intervalo de $E_{i=0}$ a $E_{-\lambda}$, lo cual es consistente con el estado de oxidación del ABTS. Cuando se completa el ciclo y el valor de potencial cambia de $E_{-\lambda}$ a $E_{i=0}$, se identifican los dos procesos redox reversibles observados en la figura 9a, a valores idénticos de potencial de pico.

Los potenciales de media onda calculados para cada sistema ($E_{1/2} = \frac{1}{2}[E_{pa} + E_{pc}]$), presentan los siguientes valores: $E_{1/2} = 0.440$ V/AgCl–Ag, para el primer sistema (ABTS/ABTS⁺) y de $E_{1/2} = 0.843$ V/AgCl–Ag para el segundo sistema (ABTS⁺/ABTS²⁺). Los valores determinados de $E_{1/2}$ para ambos sistemas son consistentes con los determinados por Solís en 2004 [53]. Partiendo de estos resultados se determinó que el potencial del sistema ABTS⁺/ABTS satisface la condición establecida por $E_{lac} > E_{med}$ (0.680V/AgCl–Ag > 0.440 V/AgCl–Ag, lo que justifica su uso como mediador.

En general la disolución de ABTS estudiada, presenta primero un proceso de oxidación monoelectrónico identificado como $ABTS \rightarrow ABTS^+ + 1e^-$, a $E_{1/2} = 0.440$ V/AgCl–Ag, seguido de un segundo proceso de oxidación también monoelectrónico identificado como: $ABTS^+ \rightarrow ABTS^{2+} + 1e^-$, a $E_{1/2} = 0.843$ V/AgCl–Ag. Los valores de potencial determinados obligan a la predicción de una reacción de comproporciónación entre el ABTS empleado en la preparación de la disolución y el ABTS²⁺, generado durante el segundo proceso de oxidación. Para evitarlo el valor de concentración que se empleó para el estudio es de 0.4 mM y no 1.0 mM, concentración en la cual si se manifiesta la reacción mencionada por Solís en 2004 [53].

5.5.1.1.2 Voltamperogramas de *p*-cresol.- La figura 10, muestra los voltamperogramas típicos de una disolución 1 mM de *p*-cresol realizados a 100 mV/s, iniciando el barrido de potencial en sentido positivo (Figura 10a) y en sentido negativo (Figura 10b).

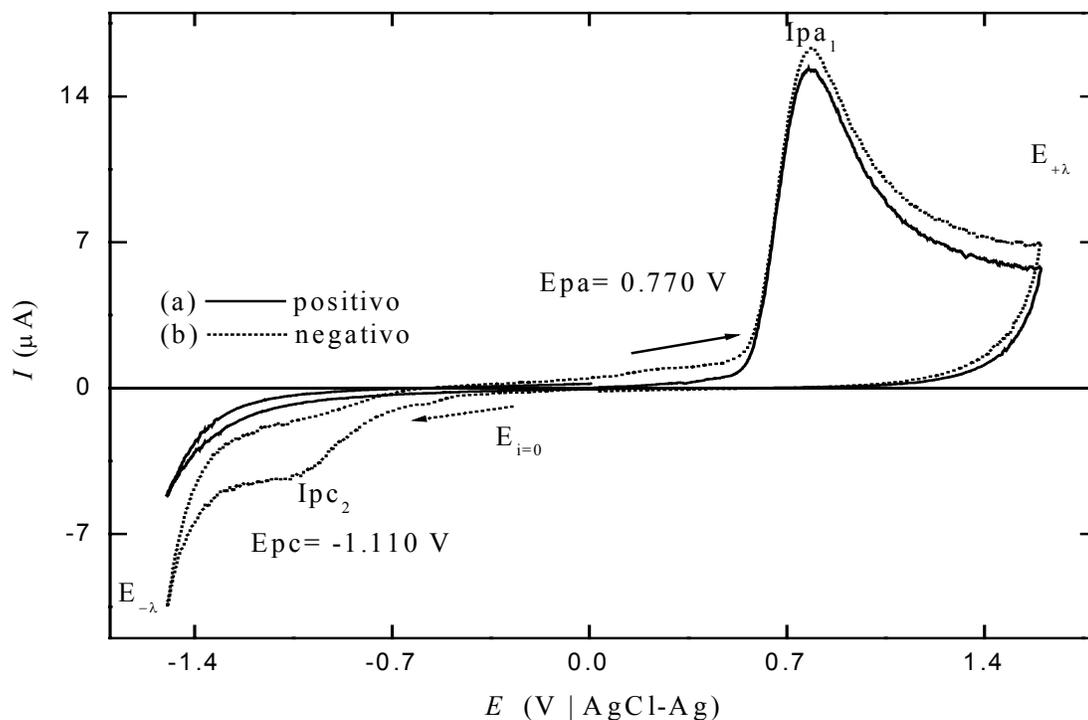


Figura 10. Voltamperogramas cíclicos típicos de una disolución 1 mM de *p*-cresol obtenidos a 100 mV/s sobre un electrodo de carbón vítreo (0.706 cm²), empleando como electrolito soporte, una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH= 5.0, el barrido de potencial se inició en dirección (a) — positiva y (b) negativa.

Al iniciar el barrido de potencial en sentido positivo (Figura 10a), en el intervalo de $E_{i=0}$ a $E_{+\lambda}$ se observa un proceso de oxidación (I_{pa1} intensidad de pico anódico) a un potencial de pico anódico (E_{pa}) de 0.770 V/AgCl-Ag. Al invertir el sentido del barrido de potencial en el intervalo de $E_{+\lambda}$ a $E_{-\lambda}$, no se observa algún proceso de reducción. Cuando el barrido de potencial se inicia de $E_{i=0}$ a $E_{-\lambda}$ en sentido negativo (Figura 10b) se observa un proceso de reducción (I_{pc2}) con un potencial de pico catódico (E_{pc}) de -1.110 V/AgCl-Ag, mismo que no se observa en la figura 10a; una vez que se invierte la dirección del barrido de potencial en el intervalo de $E_{-\lambda}$ a $E_{+\lambda}$, aparece el pico de oxidación a $E_{pa}=0.770$ V/AgCl-Ag similar al que se observa en la figura 10a. El *p*-cresol presenta procesos de oxidación y reducción, ambos de carácter irreversible ya que no se observa el proceso complementario correspondiente.

Cuando se comparan los valores de corriente para el proceso de oxidación (I_{pa1}) con el correspondiente al proceso de reducción (I_{pc2}), se observa una diferencia importante en la magnitud ($i_{pa}/i_{pc}\approx 3$), además de la posible influencia del producto de oxidación del *p*-cresol en la modificación del proceso de reducción, debido a que este sólo se observa cuando se realiza

el barrido en sentido negativo y no cuando es en sentido positivo. Sin embargo, la atención se enfoca a la señal de oxidación por ser esta la de mayor importancia para los objetivos del presente estudio.

De acuerdo al criterio establecido en la sección 4.4.1, para la caracterización electroquímica de sistemas irreversibles se emplea el valor de potencial de pico anódico. En el caso del *p*-cresol, se tiene un sistema irreversible con $E_{pa}=0.770$ V, este valor no satisface el criterio establecido para su empleo como mediador ($E_{lac} > E_{p-cresol}$), por lo que fue descartado, además de que se trata de un sistema irreversible, lo que impide la disponibilidad del producto oxidado para su regeneración.

5.5.1.1.3 Voltamperogramas del sulfato ferroso.- La figura 11, muestra los voltamperogramas cíclicos típicos de una disolución 1 mM de $FeSO_4$ obtenidos a 100 mV/s, haciendo el barrido de potencial tanto en sentido positivo (Figura 11a) como en sentido negativo (Figura 11b).

Al iniciar el barrido de potencial en el sentido positivo (Figura 11a), en el intervalo de $E_{i=0}$ a $E_{+\lambda}$ se observa una señal de oxidación (I_{pa1}), con $E_{pa}=0.731$ V/AgCl-Ag, al invertir el barrido de potencial se observa una señal de reducción (I_{pc2}), con $E_{pc}=-0.453$ V/AgCl-Ag en el intervalo de $E_{+\lambda}$ a $E_{-\lambda}$. Cuando se hace el barrido de potencial en el sentido negativo (Figura 11b), en el intervalo de $E_{i=0}$ a $E_{-\lambda}$ no se observa la señal de reducción (I_{pc2}), y cuando se invierte el barrido de potencial se observa la señal de oxidación (I_{pa1}) al mismo valor de potencial que el observado en la figura 11a.

En la figura 11a, la señal I_{pa1} se asignan a la oxidación del Fe (II) y la señal I_{pc2} a la correspondiente reducción del producto formado al electrodo, probablemente Fe(III). Se observa que la intensidad de ambos procesos es muy pequeña, lo que es atribuible a la formación de un producto insoluble, probablemente un hidróxido de Fe(II). Por otra parte, en la figura 11b, no se observa la señal de reducción I_{pc2} , debido a que la especie en solución Fe(II) no se reduce en este intervalo de potenciales, pero la señal de oxidación I_{pa1} sí se identifica al mismo valor de E_{pa} . Lo cual confirma que la reducción observada (I_{pc2}) corresponde al Fe(III) que se forma durante la oxidación del Fe(II) en I_{pa1} .

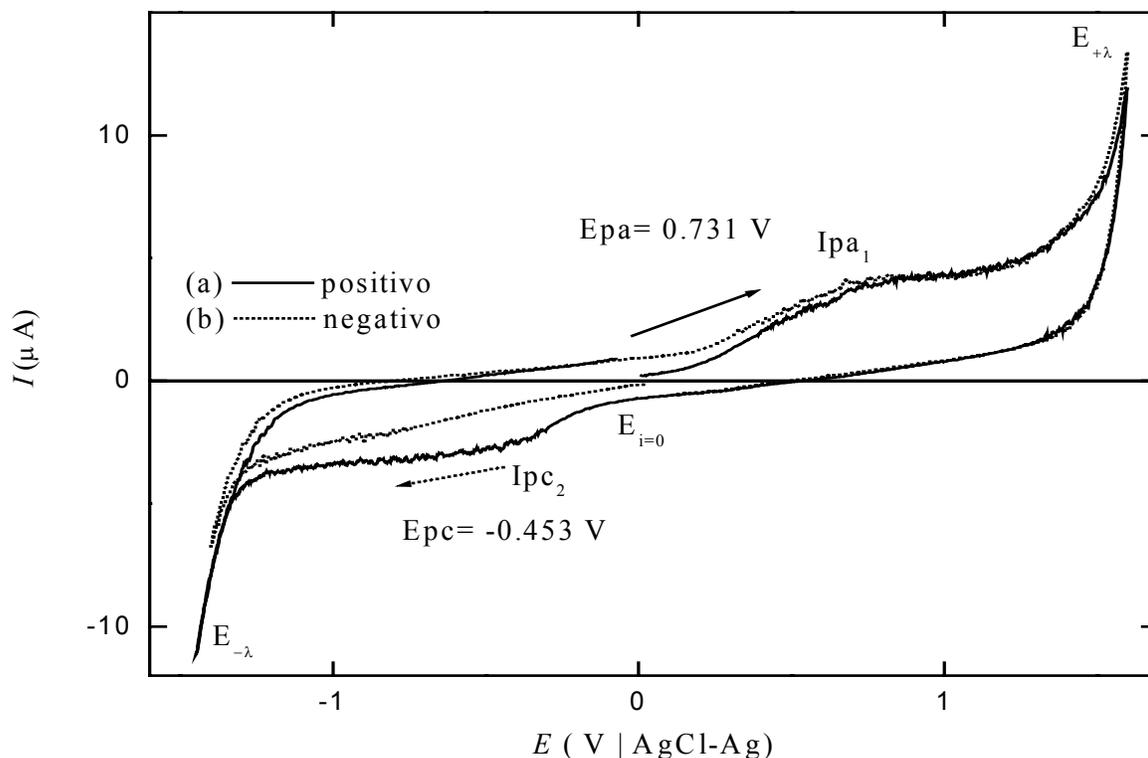


Figura 11. Voltamperogramas cíclicos típicos de una disolución 1 mM de FeSO_4 obtenidos a 100 mV/s sobre un electrodo de carbón vítreo (0.706 cm^2), empleando como electrolito soporte, una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH= 5.0, iniciando el barrido de potencial en dirección (a) — positiva y (b) negativa.

A partir de esta caracterización, se determina que el sulfato ferroso es un sistema irreversible cuyo valor de $E_{pa}=0.731 \text{ V/AgCl-Ag}$, el cual resulta superior al de la lacasa, por lo que no satisface la condición de potencial establecida previamente. Además, se trata de un compuesto que forma un producto poco soluble en las condiciones de trabajo, lo que es inconveniente para su uso como mediador.

5.5.1.1.4 Voltamperogramas de hidroquinona.- La figura 12, muestra los voltamperogramas cíclicos típicos de una disolución 1 mM de hidroquinona obtenidos a 100 mV/s, iniciando el barrido de potencial en el sentido positivo (Figura 12a) y en el sentido negativo (Figura 12b).

Al iniciar el barrido de potencial en sentido positivo (Figura 12a), en el intervalo de $E_{i=0}$ a $E_{+λ}$, se observa un proceso de oxidación (I_{pa_1}) a $E_{pa}=0.613 \text{ V/AgCl-Ag}$. Al invertir el barrido de potencial y completar el ciclo, se presenta un proceso de reducción (I_{pc_2}) a $E_{pc}=-0.280 \text{ V/AgCl-Ag}$. Cuando el barrido de potencial inicia en dirección negativa (Figura

12b), en el intervalo de $E_{i=0}$ a $E_{-\lambda}$, no se observan procesos de reducción y al invertir el sentido del barrido de potencial se observa el proceso de oxidación I_{pa_1} , similar al descrito previamente en la figura 12a.

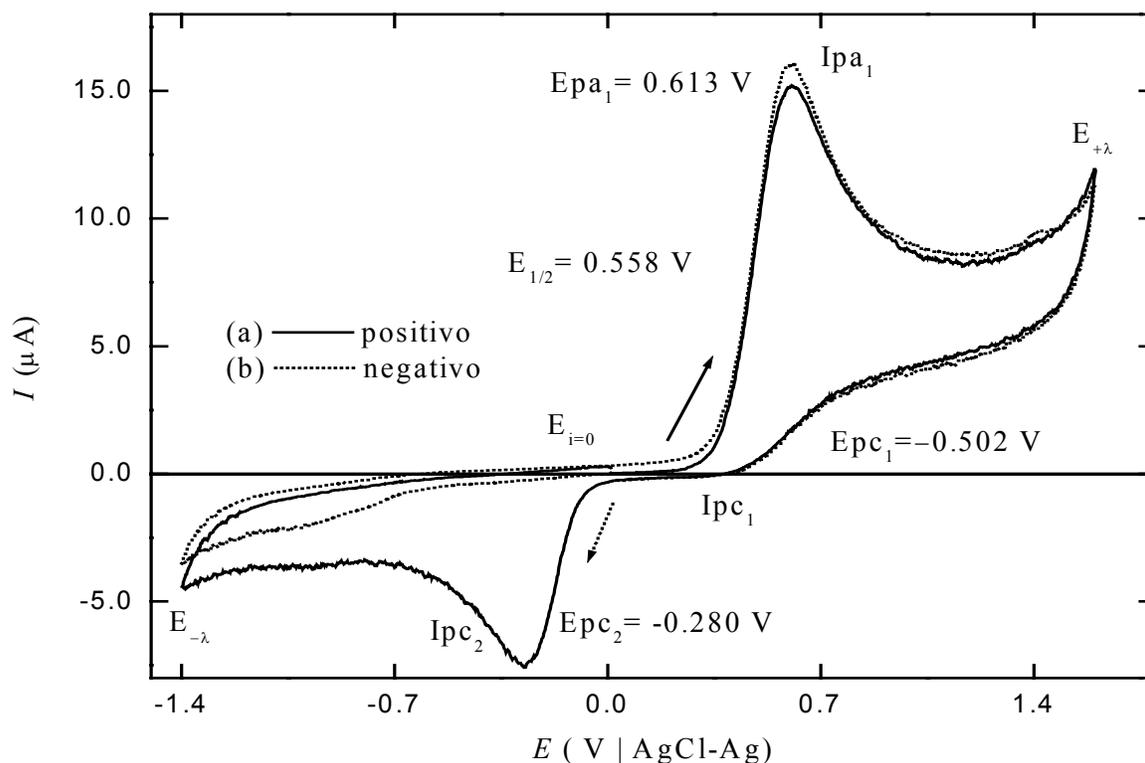


Figura 12. Voltamperogramas cíclicos típicos de una disolución 1 mM de hidroquinona obtenidos a 100 mV/s sobre un electrodo de carbón vítreo (0.706 cm^2), empleando como electrolito soporte, una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH = 5.0, iniciando el barrido de potencial en dirección (a) — positiva y (b) negativa.

La señal de reducción que se observa en I_{pc_2} no se presenta en el voltamperograma mostrado en la figura 12b, lo que permite determinar que dicha señal corresponde a un subproducto que se forma durante la oxidación de la hidroquinona. Para los fines que persigue este trabajo se considera esta reacción de oxidación (I_{pa_1} – I_{pc_1}) reversible cuyo $E_{1/2}=0.558 \text{ V}$, debido a que hay una serie de reacciones intermedias acopladas que transcurren rápidamente en disolventes próticos [68,83]. La reacción de oxidación que se propone se representa en la siguiente ecuación química:



El proceso de reducción (I_{pc2}) que se observa solamente en la figura 12a, se identifica como un proceso irreversible y se asigna a la reducción asistida del producto formado al electrodo, durante la oxidación descrita en la ecuación anterior. La reacción propuesta para este proceso se describe a continuación:



El valor de $E_{1/2} = 0.558 \text{ V/AgCl-Ag}$, es ligeramente menor al potencial de la enzima lacasa de 0.680 V/AgCl-Ag , este resultado se considera que cumple con la condición de $E_{lac} > E_{hidroq}$ ($0.680 \text{ V/AgCl-Ag} > 0.613 \text{ V/AgCl-Ag}$), por lo que el compuesto puede emplearse como mediador.

Considerando estos resultados se evaluó a la hidroquinona como posible mediador, por otra parte, es importante denotar que la cercanía de los potenciales de la hidroquinona y de la enzima, pueden influir en la reacción haciendo que ésta sea poco cuantitativa y que transcurra probablemente de forma lenta.

5.5.1.1.5 Voltamperogramas del ácido tánico.- La figura 13, muestra los voltamperogramas cíclicos típicos de una disolución 1 mM de ácido tánico obtenidos a 100 mV/s, iniciando el barrido de potencial tanto en sentido positivo (Figura 13a) como en sentido negativo (Figura 13b).

Cuando se inicia el barrido de potencial en el sentido positivo (Figura 13a) en el intervalo de $E_{i=0}$ a $E_{+\lambda}$ se observa una señal de oxidación (I_{pa1}) con $E_{pa} = 0.335 \text{ V/AgCl-Ag}$. Al invertir el barrido de potencial, en el intervalo de $E_{+\lambda}$ a $E_{-\lambda}$, se identifica una señal de reducción (I_{pc2}) con $E_{pc} = -0.860 \text{ V/AgCl-Ag}$. Cuando el barrido de potencial se inicia en el sentido negativo (Figura 13b), en el intervalo de $E_{i=0}$ a $E_{-\lambda}$, no se observa señal de algún proceso de reducción. Al invertir el barrido de potencial, en el intervalo de $E_{-\lambda}$ a $E_{+\lambda}$, se observa la señal de oxidación (I_{pa1}), en el mismo valor de potencial que el observado en la señal correspondiente de la figura 13a. la señal de oxidación I_{pa1} que se identifica en la figura 13a, no presenta la correspondiente señal de reducción, por tratarse de un sistemas irreversible. Como la señal de reducción I_{pc2} , se presenta en un valor de potencial muy diferente, se

propone que esta señal se debe al producto formado después de la oxidación (I_{pa_1}). Lo que se comprueba al analizar la figura 13b, en donde dicha señal de reducción no se observa.

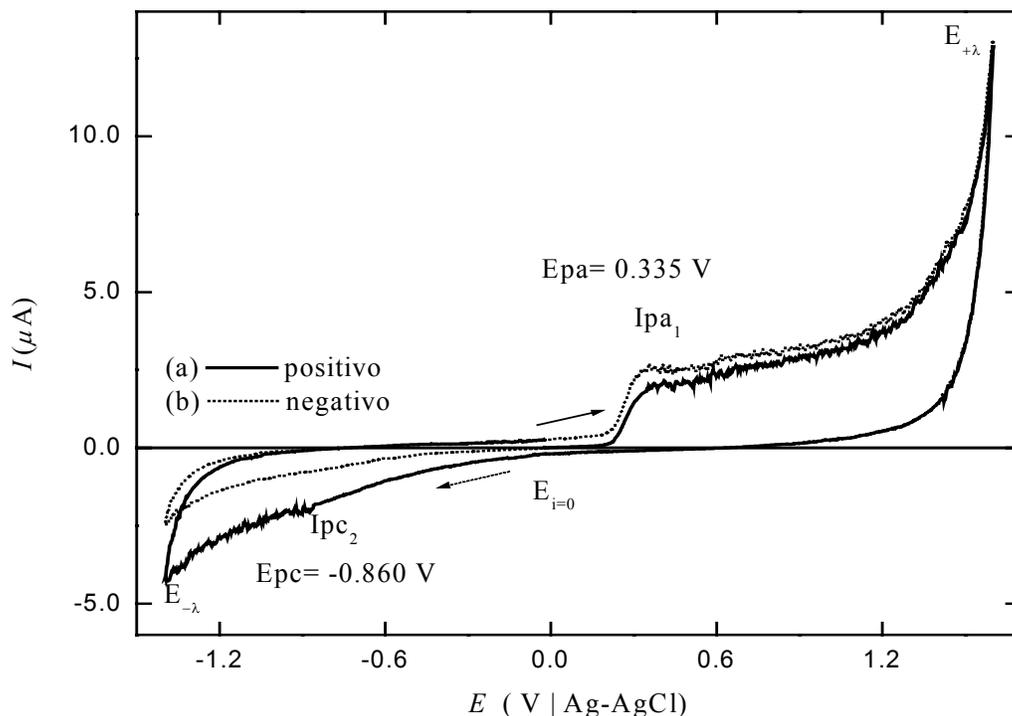


Figura 13. Voltamperogramas cíclicos típicos de una disolución 1 mM de ácido tánico obtenidos a 100 mV/s sobre un electrodo de carbón vítreo (0.706 cm^2), empleando como electrolito soporte, una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH = 5.0, iniciando el barrido de potencial en dirección (a) — positiva y (b) negativa.

El ácido tánico es un sistema irreversible y los procesos de oxidación y reducción que se observan, suceden a potenciales distintos. El valor de E_{pa} del proceso de oxidación satisface la condición $E_{lac} > E_{med}$ ($0.680 \text{ V/AgCl-Ag} > 0.335 \text{ V/AgCl-Ag}$). Sin embargo se trata de un sistema irreversible, por lo que no se recomienda para su empleo como mediador.

5.1.1.6 Voltamperogramas de la ferroína.- La figura 14, muestra los voltamperogramas típicos de una disolución 1 mM de ferroína, $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$, obtenidos a 100 mV/s, iniciando el barrido de potencial tanto en sentido positivo (Figura 14a) como en sentido negativo (Figura 14b).

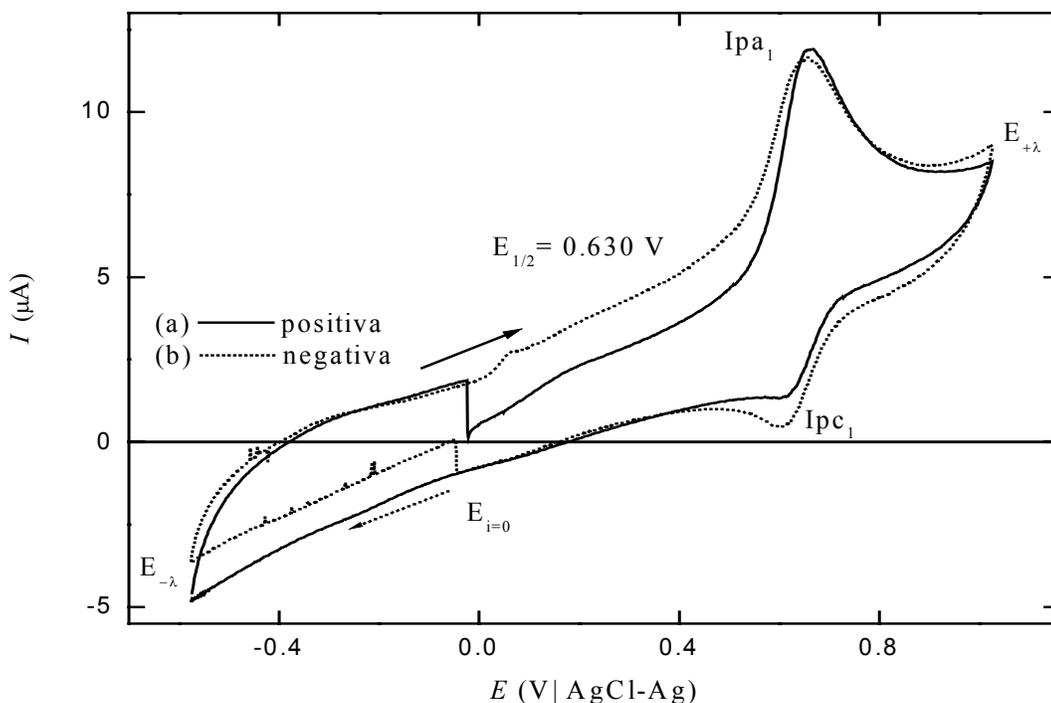


Figura 14. Voltamperogramas cíclicos típicos de una disolución 1 mM de ferroína obtenidos a 100 mV/s sobre un electrodo de carbón vítreo (0.706 cm²), empleando como electrolito soporte, una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH = 5.0, iniciando el barrido de potencial en dirección (a) — positiva y (b) negativa.

Al iniciar el barrido de potencial en el sentido positivo (Figura 14a), en el intervalo $E_{i=0}$ a $E_{+\lambda}$ se observa un proceso de oxidación (I_{pa1}) a un $E_{pa}=0.661$ V/AgCl-Ag, al invertir el barrido de potencial, en el intervalo de $E_{+\lambda}$ a $E_{-\lambda}$, se observa el correspondiente proceso de reducción (I_{pc1}) con $E_{pc}=0.598$ V/AgCl-Ag. Cuando se inicia el barrido de potencial en el sentido negativo (Figura 14b), en el intervalo de $E_{i=0}$ a $E_{-\lambda}$, no se observan procesos de reducción. Al invertir el barrido de potencial y completar el ciclo, se observa el proceso de oxidación (I_{pa1}) y el correspondiente proceso de reducción (I_{pc1}), identificados previamente en la figura 14a.

Para determinar la reversibilidad del sistemas observado, se analizó el valor de $i_{pc}/i_{pa}=0.61$, con lo que se considera prácticamente reversible. El proceso redox observado se asigna a la transformación ferroína–ferriína, descrita en la siguiente ecuación:



Se trata de un proceso monoelectrónico ($\Delta E_p=0.64$ mV), y el potencial de media onda del sistema es $[E_{1/2} = \frac{1}{2} (E_{pa}+E_{pc})]$, $E_{1/2}=0.630$ V/AgCl-Ag.

El valor de potencial determinado, satisface la condición de $E_{lac} > E_{med}$, (0.680 V/AgCl-Ag > 0.613 V/AgCl-Ag), además de ser un sistema reversible. El compuesto es ideal para emplearse como mediador, aunque es conveniente recordar que los potenciales de la enzima y del compuesto son muy próximos y en consecuencia la reacción puede ser poco cuantitativa, inclusive puede transcurrir lentamente.

Una vez que los compuestos han sido caracterizados con el empleo de la voltamperometría cíclica y que se determinó su uso como mediadores para ser oxidados en la reacción con la enzima lacasa, se presenta a continuación una tabla con los valores de potencial redox de interés, de los compuestos a emplear como mediadores (Tabla 9).

Tabla 9. Potenciales redox determinados para los compuestos que pueden funcionar como mediadores en una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH= 5.0.

Compuestos	Potencial redox <i>E</i> (V/AgCl-Ag)
ABTS	0.440
<i>p</i> -cresol	0.770
Ácido tánico	0.350
Sulfato ferroso	0.731
Hidroquinona	0.613
Ferroína	0.630

De este grupo de compuestos (Tabla 9) caracterizados electroquímicamente, se seleccionaron a la ferroína e hidroquinona, que satisfacen la condición de potenciales redox ($E_{lacasa} > E_{mediador}$), y además se trata de sistemas reversibles, lo que garantiza su recuperación y permite establecer un ciclo catalítico con la enzima lacasa.

5.5.1.2 SUBSTRATOS

Partiendo de un grupo de compuestos generalmente colorantes, representativos de los empleados en la industria textil, se hizo una selección de los compuestos más útiles que pudieran funcionar adecuadamente como sustratos. Para ello es importante que posean un potencial redox menor al potencial redox del mediador ($E_{mediador} > E_{sustrato}$), de tal forma que

sean oxidados por acción de estos compuestos, sin tratar de recuperarlos, debido a que se trata de degradarlos, lo que implica eliminar la coloración característica y algún nivel de toxicidad. La recuperación de este compuesto en un proceso cíclico no es de interés para este trabajo, por lo cual la reversibilidad del sistema no es una condición a satisfacer, se busca únicamente la condición de potencial.

El índigo es un colorante utilizado en la industria textil para teñir prendas de mezclilla principalmente. Es un compuesto caracterizado en diferentes trabajos, lo que justifica su empleo como referencia. La caracterización de este compuesto se realizó en las condiciones de trabajo de este estudio, para evaluar su comportamiento y la posibilidad de utilizar los mediadores que se han caracterizado anteriormente.

5.5.12.2 Voltamperogramas del índigo.- En la figura 15, se muestran los voltamperogramas cíclicos típicos de una disolución 1 mM de índigo obtenidos a 100 mV/s, iniciando el barrido de potencial tanto en sentido positivo (Figura 15a) como en sentido negativo (Figura 15b).

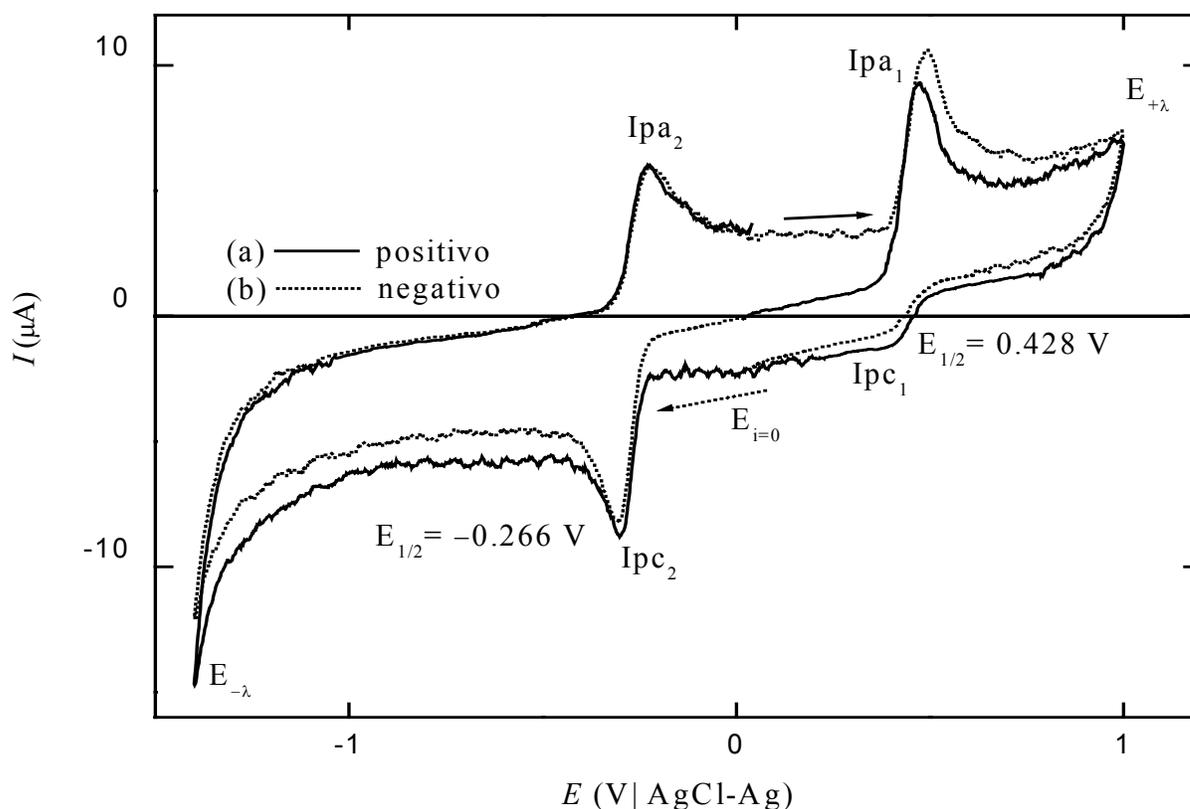


Figura 15. Voltamperogramas cíclicos típicos de una disolución 1 mM de índigo obtenidos a 100 mV/s sobre un electrodo de carbón vítreo (0.706 cm^2), empleando como electrolito soporte, una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a $\text{pH} = 5.0$ iniciando el barrido de potencial en dirección (a) — positiva y (b) negativa.

Al iniciar el barrido de potencial en el sentido positivo (Figura 15a), en el intervalo de $E_{i=0}$ a $E_{+\lambda}$, se observa un proceso de oxidación (I_{pa1}), a $E_{pa1}=0.475$ V/AgCl-Ag. Al invertir el barrido de potencial y completar el ciclo, se observan los procesos de reducción I_{pc1} a $E_{pc1}=0.381$ V/AgCl-Ag, I_{pc2} a $E_{pc2}=-0.302$ V/AgCl-Ag y un proceso de oxidación (I_{pa2}) a $E_{pa2}=-0.230$ V/AgCl-Ag.

Cuando se obtiene el voltamperograma iniciando el barrido de potencial en sentido negativo (Figura 15b), se observan los dos procesos redox $I_{pc2}-I_{pa2}$ y $I_{pa1}-I_{pc1}$, a valores de potencial similares a los observados en el voltamperograma antes descrito (Figura 15a). El primer proceso redox ($I_{pa1}-I_{pc1}$) es cuasireversible ($i_{pc}/i_{pa}=0.21$) con $\Delta E_p=0.094$ V. El segundo proceso redox ($I_{pa2}-I_{pc2}$) es reversible ($i_{pc}/i_{pa}=0.71$) con $\Delta E_p=0.072$ V.

El primer proceso redox ($I_{pa1}-I_{pc1}$) del sistema presenta un valor de $E_{1/2}=0.428$ V/AgCl-Ag que se compara con el potencial de los mediadores. La comparación permite determinar que este substrato satisface la condición descrita previamente: $E_{substrato} < E_{mediador} < E_{lacasa}$. Cabe mencionar que se trata de un sistema cuasireversible, condición no relevante para su selección como substrato, porque en la reacción con el mediador, el objetivo es degradar al colorante sin pretender recuperarlo.

5.5.1.2.1.1 Voltamperogramas de amino azotolueno.- La figura 16, muestra los voltamperogramas cíclicos típicos de una disolución 1 mM de amino azotolueno obtenidos a 100 mv/s, iniciando el barrido de potencial tanto en sentido positivo (Figura 16a) como en sentido negativo (Figura 16b).

Al iniciar el barrido de potencial en el sentido positivo (Figura 16a), en el intervalo de $E_{i=0}$ a $E_{+\lambda}$, se observa un proceso de oxidación (I_{pa1}) a $E_{pa1}=0.723$ V/AgCl-Ag. Al invertir el barrido de potencial y completar el ciclo, se observa un proceso de reducción (I_{pc4}) muy cercano al límite catódico, a $E_{pc4}=-1.400$ V/AgCl-Ag. Cuando se inicia el barrido de potencial en el sentido negativo (Figura 16b), se observa un proceso de reducción (I_{pc3}) a $E_{pc3}=-0.582$ V/AgCl-Ag, en el intervalo de $E_{i=0}$ a $E_{-\lambda}$. Al invertir el barrido de potencial y completar el ciclo se observan dos procesos de oxidación, I_{pa2} a $E_{pa2}=0.463$ V/AgCl-Ag y I_{pa1} a $E_{pa1}=0.723$ V/AgCl-Ag. El proceso de oxidación I_{pa1} también se identifica en la figura 16a prácticamente al mismo valor de potencial, aunque con menor intensidad de corriente.

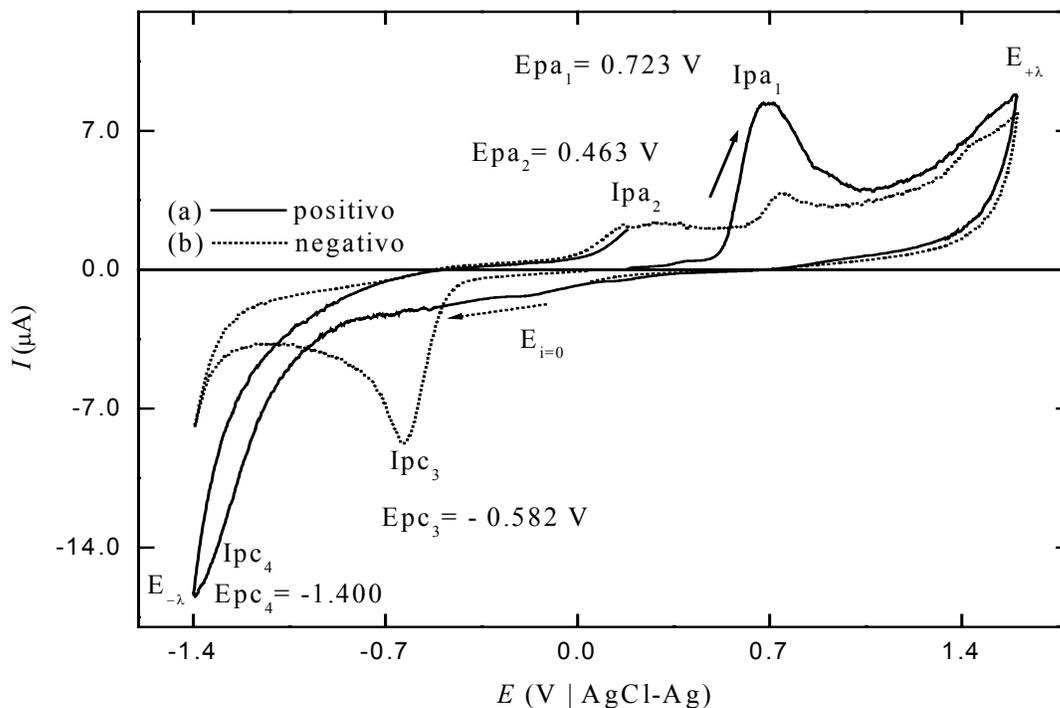


Figura 16. Voltamperogramas cíclicos típicos de una disolución 1 mM de aminoazotolueno obtenidos a 100 mV/s sobre un electrodo de carbón vítreo (0.706 cm^2), empleando como electrolito soporte, una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH = 5.0, iniciando el barrido de potencial en dirección (a) — positiva y (b) negativa.

El análisis de la figura 16a indica que la especie que se oxida a E_{pa1} (I_{pa1}), no se reduce en valores de potencial cercanos a éste y probablemente ocurre una reacción química acoplada que da origen a un producto diferente que se reduce a $E_{pc4} = -1.400 \text{ V/AgCl-Ag}$.

Al analizar la figura 16b, se observa una reducción I_{pc3} que no presenta la oxidación complementaria, y como la señal I_{pa2} no se presenta en el voltamperograma cuyo inicio de barrido de potencial es positivo (Figura 16a), se sugiere que se trata de un producto formado luego de la reducción en I_{pc3} . Adicionalmente, la oxidación I_{pa1} se presenta con una intensidad menor a la presentada en la figura 16a, pero que ocurre al mismo valor de potencial, esto se puede explicar por la formación de un subproducto durante la reducción en I_{pc3} , que impide la oxidación completa del compuesto aminoazotolueno, o bien a la modificación de la superficie del electrodo, que surge como consecuencia de la reacción de oxidación en I_{pa2} , modificando la superficie activa del electrodo. En ambos casos la respuesta es la oxidación en I_{pa1} con una menor intensidad de corriente.

Considerando que se pretende la oxidación del sustrato, se elige el primer valor de potencial de oxidación del compuesto $E_{pa1}=0.723$ V/AgCl-Ag. Sin embargo, este valor no satisface la condición de potencial establecida: $E_{sustrato} < E_{mediador} < E_{lacasa}$. Por esta razón se determina que el aminoazotolueno no es un compuesto que pueda emplearse como sustrato.

Una vez que los compuestos han sido caracterizados con el empleo de la voltamperometría cíclica y que se determinó su posible uso como sustratos oxidables con los mediadores previamente seleccionados, se presenta a continuación una tabla con los valores de potencial redox de interés, de los posibles sustratos (Tabla 10).

Tabla 10. Potenciales redox determinados para los compuestos que pueden funcionar como sustratos en una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH= 5.0.

Compuestos	Potencial redox de interés <i>E</i> (V/AgCl-Ag)
Índigo	0.456
Aminoazotolueno	0.723

5.6 CARACTERIZACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA

Los compuestos caracterizados electroquímicamente y que fueron seleccionados, previa satisfacción de las condiciones establecidas de potenciales redox, y de sistemas reversibles para los compuestos seleccionados como mediadores y de potenciales redox para los sustratos. Estos compuestos se caracterizaron espectrofotométricamente por espectrofotometría de absorción electrónica ultravioleta-visible (UV-Vis), con el objetivo de fue determinar las longitudes de máxima absorción (λ en nm) características de cada compuesto, y evitar las regiones de interferencia espectral, en el momento de realizar las reacciones del mediador con la enzima lacasa y del mediador con el sustrato.

5.6.1 Mediadores

5.6.1.1 Espectro de absorción electrónica UV-Vis del ABTS

La figura 17, presenta el espectro de absorción electrónica UV-Vis típico del ABTS, este espectro se obtuvo empleando una disolución reguladora de acetatos 0.1 M a pH= 5.0, y con una dilución de ABTS 1:10000. Se identifican tres longitudes de onda de máxima absorción a 225 nm, 253 nm y 339 nm con los correspondientes coeficientes de absorción molar (ϵ) cuyos valores son de $58048 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $22837 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $43280 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ respectivamente.

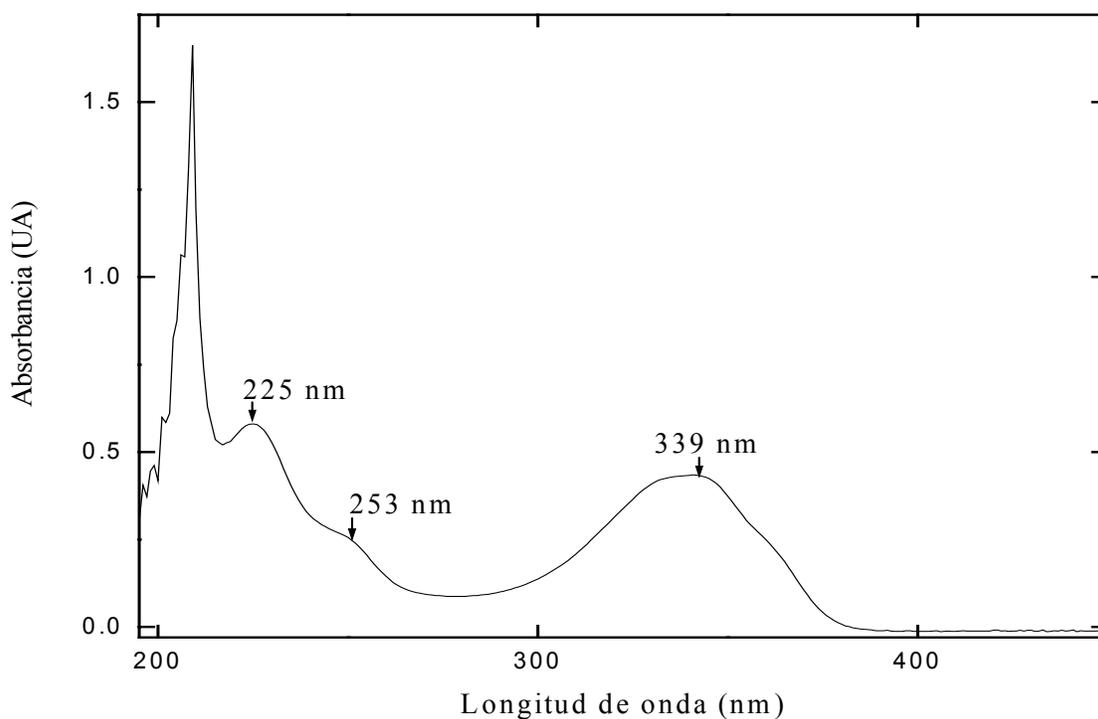


Figura 17. Espectro de absorción electrónica ultravioleta-visible, característico del ABTS en una dilución 1:10000, empleando una disolución reguladora de acetatos 0.1 M a pH= 5.0.

5.6.1.2 Espectro de absorción electrónica UV-Vis de la hidroquinona

La figura 18, presenta el espectro de absorción electrónica UV-Vis típico de la hidroquinona, obtenido empleando una disolución reguladora de acetatos 0.1 M a pH= 5.0, con una dilución de hidroquinona 1:10000. Se identificaron dos longitudes de onda (λ en nm) de máxima absorción a 219 nm y 288 nm, y los correspondientes coeficientes de absorción molar (ϵ en $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) cuyos valores son de $64900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $34546 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ respectivamente.

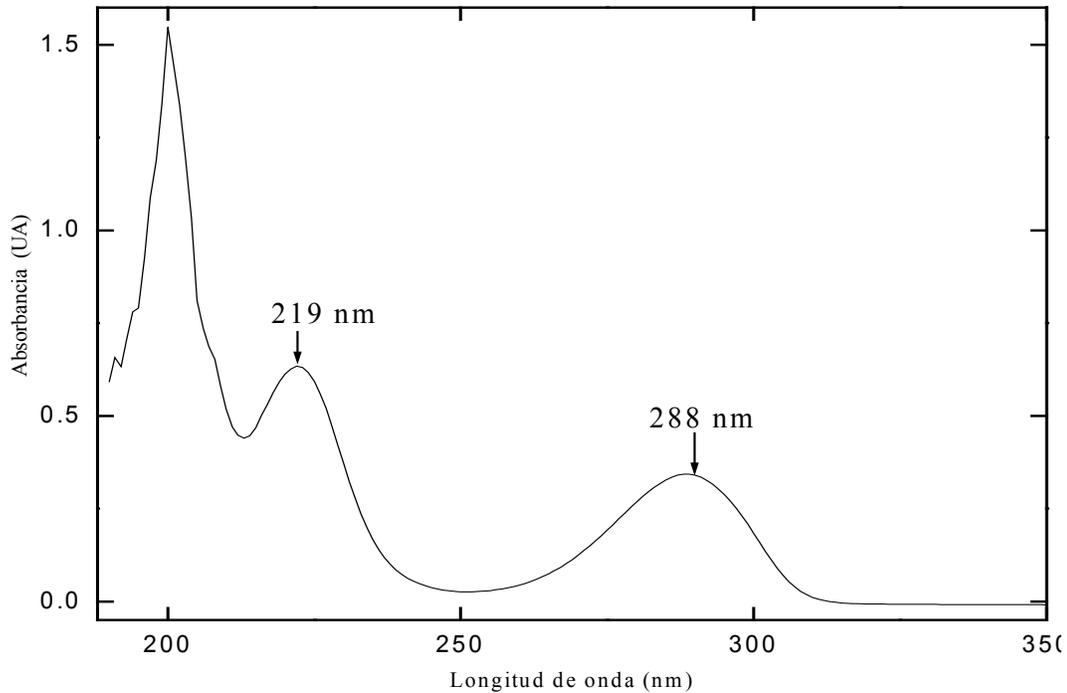


Figura 18. Espectro de absorción electrónica ultravioleta-visible, característico de la hidroquinona con una dilución 1:10000, empleando una disolución reguladora de acetatos 0.1 M a pH= 5.0.

5.6.1.3 Espectro de absorción electrónica UV-Vis de la ferroína

La figura 19, presenta el espectro de absorción electrónica UV-Vis típico de la ferroína, obtenido empleando una disolución reguladora de acetatos 0.1 M a pH= 5.0, con una dilución de ferroína 1:10000. Se identificaron tres longitudes de onda (λ en nm) de máxima absorción a 223 nm, 265 nm y 513 nm, y los correspondientes coeficientes de absorción molar (ϵ en $M^{-1} cm^{-1}$) cuyos valores son de $43360 M^{-1} cm^{-1}$, $48865 M^{-1} cm^{-1}$ y $5885 M^{-1} cm^{-1}$ respectivamente.

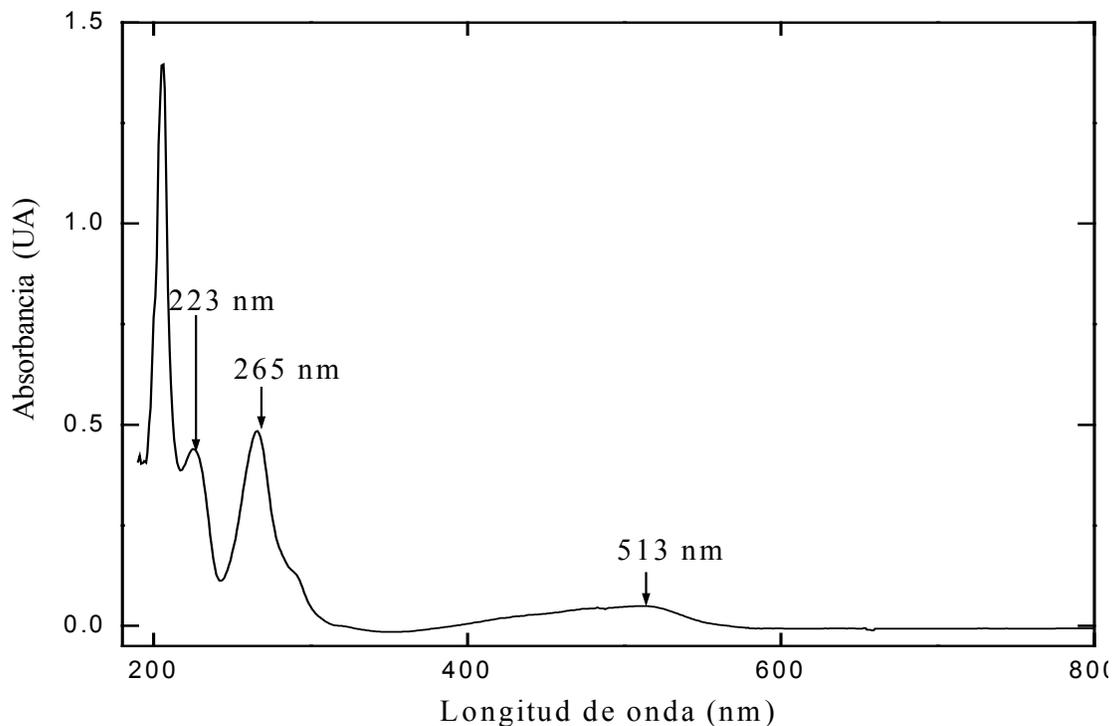


Figura 19. Espectro de absorción electrónica ultravioleta-visible, característico de la ferroína en una dilución 1:10000, empleando una disolución reguladora de acetatos 0.1 M a pH= 5.0.

A partir de los espectros de absorción UV-Vis obtenidos para cada posible mediador se realizó la siguiente tabla de resultados en donde se presentan las longitudes de onda (λ en nm) características de cada compuesto y el correspondiente coeficiente de extinción molar (ϵ M cm)⁻¹, cuyos datos se presentan en el tabla 11.

Los datos de longitud de onda (λ en nm) se utilizaron para evitar las zonas de posibles interferencias espectrales (como se ha indicado anteriormente), cuando se hizo la reacción lacasa-mediador seleccionado y mediador seleccionado-substrato seleccionado

Tabla 11. Longitudes de onda de máxima absorción de mediadores realizados por espectrofotometría de absorción electrónica ultravioleta-visible, utilizando una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH= 5.0.

MEDIADORES	λ (nm)			ϵ (M cm) ⁻¹		
	ABTS	225	253	339	58048	22837
Ferroína	223	265	513	43360	48865	5885
Hidroquinona	219		288	64900		34546

5.6.2 Substratos

Los compuestos seleccionados como substratos a partir de la caracterización electroquímica, fueron caracterizados por espectrofotometría de absorción electrónica para determinar las longitudes de onda de máxima absorción de cada compuesto.

5.6.2.1 Espectro de absorción electrónica UV-Vis del índigo

La figura 20, presenta el espectro de absorción electrónica UV-Vis típico del índigo, obtenido empleando una disolución reguladora de acetatos 0.1 M a pH= 5.0, con una dilución de índigo 1:10000. Se identificaron tres longitudes de onda (λ en nm) de máxima absorción a 246 nm, 284 nm y 608 nm, y los correspondientes coeficientes de absorción molar (ϵ en $M^{-1} cm^{-1}$) cuyos valores son de $13273 M^{-1} cm^{-1}$, $20130 M^{-1} cm^{-1}$ y $12752 M^{-1} cm^{-1}$ respectivamente.

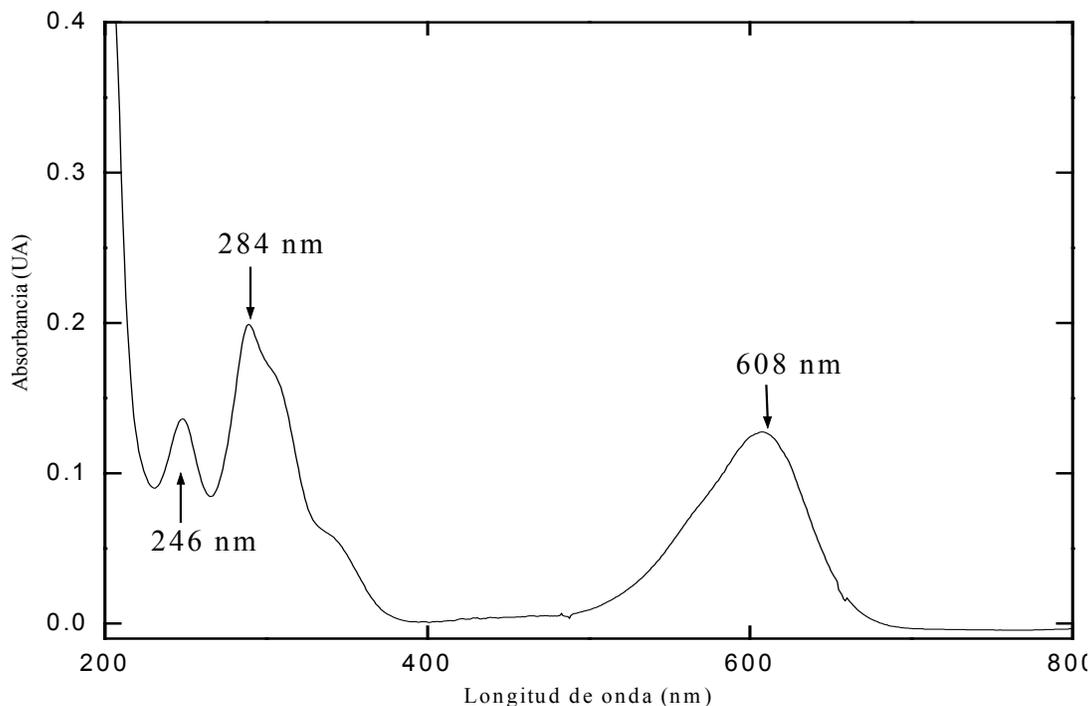


Figura 20. Espectro de absorción electrónica ultravioleta-visible, característico del índigo en una dilución 1:10000, empleando una disolución reguladora de acetatos 0.1 M a pH= 5.0.

5.6.2.2 Espectro de absorción electrónica UV-Vis del aminoazotolueno

La figura 21, presenta el espectro de absorción electrónica UV-Vis típico del aminoazotolueno, obtenido empleando una disolución reguladora de acetatos 0.1 M a pH= 5.0, con una dilución de aminoazotolueno 1:10000. Se identificaron dos longitudes de onda (λ en nm) de máxima absorción a 250 nm y 378 nm, y los correspondientes coeficientes de absorción molar (ϵ en $M^{-1} cm^{-1}$) cuyos valores son de $33048 M^{-1} cm^{-1}$ y $55232 M^{-1} cm^{-1}$ respectivamente.

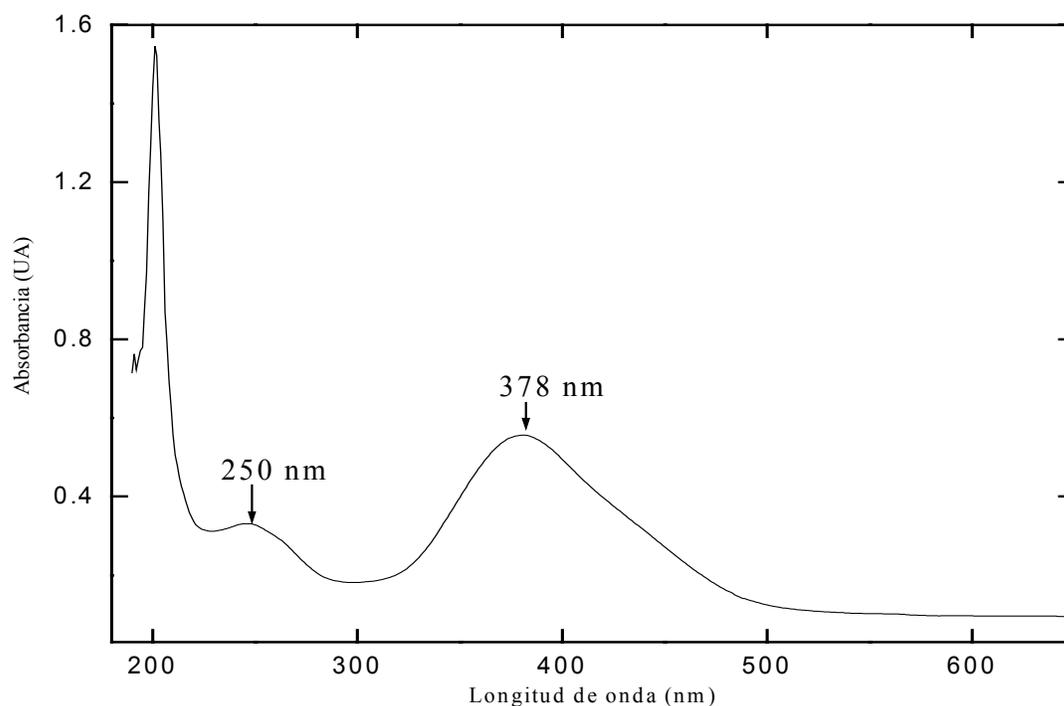


Figura 21. Espectro de absorción electrónica ultravioleta-visible, característico del amino azotolueno en una dilución 1:10000, empleando una disolución reguladora de acetatos 0.1 M a pH= 5.0.

A partir de los espectros de absorción UV-Vis obtenidos para cada sustrato se realizó la siguiente tabla de resultados en donde se presentan las longitudes de onda (nm) características de cada compuesto y el correspondiente coeficiente de extinción molar ϵ ($M cm$)⁻¹, estos resultados se presentan en la tabla 12.

Los datos de longitud de onda (nm) se utilizaron para evitar las zonas de posibles interferencias espectrales cuando se realizó la reacción sustrato seleccionado-mediador seleccionado.

Tabla 12. Longitudes de onda de máxima absorción en el espectro de absorción electrónica ultravioleta-visible de los sustratos utilizando una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH= 5.0 .

SUBSTRATOS	λ (nm)			ϵ (M cm) ⁻¹		
Aminoazotolueno	250		378	33048		55232
Índigo	246	284	608	13273	20130	12752

5.7 SISTEMA LACASA-MEDIADOR

Con base en los resultados obtenidos de la caracterización enzimática de la lacasa libre en una disolución reguladora de acetatos 0.1 M a pH= 5.0, y de la caracterización electroquímica a partir de cuyos resultados se hizo una selección de los compuestos adecuados que funcionarían como mediadores y sustratos. Estos compuestos se caracterizaron por espectrofotometría de absorción electrónica ultravioleta-visible, estableciendo las longitudes de onda propias de cada uno de ellos.

Con esta información se establecieron las bases fundamentales para desarrollar las reacciones, que constituyen al sistema lacasa-mediador. Empleando la enzima en estado libre e inmovilizada en soporte de sílica gel.

5.7.1 Sistema lacasa libre –mediador

Las reacciones lacasa libre–ferroína y lacasa libre-hidroquinona se realizaron una vez que se caracterizó a la enzima libre a los valores de pH= 5.0, 4.0 y 3.7 con el ABTS como sustrato, ambas reacciones enzima libre-mediador también fueron realizadas a estos valores de pH y de acuerdo al procedimiento indicado en la sección 3.5.1 y 3.5.2. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 13, y se comparan con la reacción lacasa libre-ABTS. La reacción lacasa libre-ABTS, se evaluó a 728 nm de longitud de onda particular del ABTS⁺ y que se caracteriza por ser una región libre de interferencia espectral. Los valores de $V_{\text{máx}}$ (mM/min) a pH= 5.0, pH= 4.0 y pH= 3.7 se incrementan al disminuir los valores de pH es decir la velocidad de formación del complejo enzima-sustrato es más rápida a menor pH, lo que es atribuible a la mayor exposición del sitio activo de la enzima [21-24]. En las reacciones

lacasa libre-ferroína, y lacasa libre-hidroquinona se mantiene la misma tendencia de aumentar la V_{\max} (mM/min) al disminuir el pH. La reacción lacasa libre con la ferroína se evaluó a 513 nm de longitud de onda, longitud característica de la ferroína. La reacción lacasa libre con hidroquinona se siguió a una longitud de onda de alrededor de 300 nm, longitud de onda propia de este compuesto.

Tabla 13. Parámetros cinéticos experimentales para la reacción lacasa libre-hidroquinona, lacasa libre-ferroína y lacasa libre-ABTS, determinados en una disolución amortiguadora de acetato 0.1 M a pH= 5.0, 4.0 y 3.7.

Parámetro	Hidroquinona			Ferroína			ABTS		
	pH= 5.0	pH= 4.0	pH= 3.7	pH= 5.0	pH= 4.0	pH= 3.7	PH= 5.0	pH = 4.0	pH= 3.7
V_{\max} (mM/min)	0.002	0.005	0.008	0.0009	0.001	0.030	0.070	0.074	0.156
K_m (mM)	0.035	0.090	0.880	0.065	0.080	0.300	0.240	1.005	0.053
k_{cat} (min) ⁻¹	0.170	0.510	9.160	0.088	1.170	34.48	0.703	85.03	15.80
k_{cat}/K_m (mMmin) ⁻¹	1.360	5.670	10.41	1.350	15.00	116.1	2.930	84.64	300.3

Cuando se hace la comparación entre las tres reacciones se observa (Tabla 13) que la velocidad de formación del complejo lacasa-ABTS procede más rápidamente a pH= 5.0, pH= 4.0 y pH= 3.7 que para el complejo lacasa libre-ferroína y lacasa libre-hidroquinona. De la misma manera, el incremento es mayor en la reacción de la enzima con la ferroína comparada con la lacasa-hidroquinona a pH= 4.0 y pH= 3.7; sin embargo a pH= 5.0 la V_{\max} (mM/min) del complejo lacasa-hidroquinona es mayor que la V_{\max} (mM/min) del sistema lacasa libre-ferroína, efecto que podría ser atribuido a la repulsión entre las cargas de la ferroína con centros de Fe^{2+} y los centros activos de Cu^+ de la enzima lacasa.

Por otra parte los resultados de K_m (mM) (tabla 13), establecida como una constante de disociación que indica la afinidad de la enzima por el sustrato, los datos experimentales obtenidos de K_m siguen el mismo comportamiento que los valores de la V_{\max} (mM/min), al disminuir el pH. Existe una mayor afinidad de lacasa libre por ABTS a pH= 5.0 y pH= 4.0,

pero a pH= 3.7, la afinidad disminuye considerablemente, es probable que esto se deba a una gran velocidad de desaparición del complejo enzima-substrato por un contacto y separación más rápido con el sitio activo de la enzima. Los valores de K_m (mM) para la reacción lacasa libre-ferroína son más altos comparados con el sistema lacasa libre-hidroquinona a pH=5.0, pH= 4.0 y pH= 3.7, pero son menores a los de la reacción lacasa libre-ABTS.

Estos resultados se interpretan a continuación, al analizar la eficiencia del sistema enzima libre-mediador, la cual se define con la relación k_{cat}/K_m (mM min)⁻¹ (tabla 13). La eficiencia se incrementa al disminuir el pH, tendencia que se presenta en las tres reacciones que constituyen el sistema: lacasa libre con ABTS, lacasa libre con ferroína y lacasa libre con hidroquinona. La reacción lacasa libre con ABTS constituyen el sistema más eficiente con valores de 2.930 (mM min)⁻¹, 84.64 (mM min)⁻¹ y 300.3 (mM min)⁻¹ a pH= 5.0, pH= 4.0. y pH= 3.7 respectivamente, la reacción lacasa libre con ferroína tiene eficiencias de 4.960 (mM min)⁻¹, 15.00 (mM min)⁻¹ y 116.1 (mM min)⁻¹ bajo las mismas condiciones de pH, es un mediador de eficiencia intermedia, al compararlo con el ABTS. El sistema menos eficiente con respecto a lacasa libre con ABTS a pH=5.0, pH= 4.0 y pH=3.7, está constituido por la reacción lacasa libre con hidroquinona cuyos valores son 1.60 (mM min)⁻¹, 5.670 (mM min)⁻¹ y 10.41 (mM min)⁻¹ para cada pH indicado. Otro de los puntos a considerar para explicar la eficiencia menor de los sistemas lacasa con ferroína y lacasa con hidroquinona, es la proximidad de los valores de potencial redox de estos compuestos (ferroína $E= 0.630$ V/AgCl-Ag e hidroquinona $E = 0.613$ V/AgCl-Ag) con relación al potencial redox de la enzima ($E= 0.680$ V/AgCl-Ag), lo que tiene como consecuencia una reacción poco cuantitativa para ambos sistemas reaccionantes, mientras que el potencial redox para el ABTS es de 0.425 V/AgCl-Ag, lo que explica el hecho de que la reacción sea más cuantitativa.

Sin embargo el sistema lacasa libre con ferroína $Fe(fen)_3^{2+}$ es una reacción que a pH= 3.7 posee una eficiencia de 116.1 (mM min)⁻¹, superior a la eficiencia del sistema lacasa libre-ABTS a pH= 5.0 [2.930 (mM min)⁻¹] y pH= 4.0 [84.64 (mM min)⁻¹]. La comparación de los valores de eficiencia indica lo siguiente: el ABTS es 2 veces más eficiente que la $Fe(fen)_3^{2+}$ a pH= 5.0, 6 veces a pH= 4.0 y 3 veces a pH= 3.7. A pH= 4.0, es 63 veces más eficiente que la $Fe(fen)_3^{2+}$ a pH= 5.0 y a pH= 3.7 es 20 veces más eficiente que la $Fe(fen)_3^{2+}$ a pH= 4.0. El $Fe(fen)_3^{2+}$ es 3 veces más eficiente que la hidroquinona a pH= 4.0 y 12 veces más eficiente a

pH= 3.7. La $\text{Fe}(\text{fen})_3^{2+}$ a pH= 3.7 es 40 veces más eficiente que el ABTS a pH= 5.0 y 1.4 veces más eficiente que el ABTS a pH= 4.0.

El análisis anterior abre la posibilidad de utilizar al grupo de los compuestos de coordinación como mediadores y del que forma parte la ferroína (grupo de fenantrolinas con centros de Fe^{2+}), considerando como puntos relevantes las características de estos compuestos en cuanto a su reversibilidad, y potencial redox que puede interactuar con el potencial de la enzima lacasa, llegando a constituir sistemas lacasa-mediador eficientes, para esto podría considerarse a la serie de fenantrolinas que poseen grupos electrodonadores de carga (por ejemplo: OH^- , NO_2^-) para desplazar los potenciales redox de los sistemas $\text{Fe}(\text{fen})_3^{3+}/\text{Fe}(\text{fen})_3^{2+}$ a potenciales menos positivos y así tener diferencias de potencial más grandes con respecto al potencial redox de la enzima y de esta forma tener una mayor eficiencia del sistema de reacción.

5.7.2 Sistema lacasa inmovilizada- mediador

Las reacciones lacasa inmovilizada con ferroína y lacasa inmovilizada con hidroquinona se realizaron una vez que se caracterizó a la enzima inmovilizada a los valores de pH= 5.0, pH= 4.0 y pH= 3.7 con el ABTS como sustrato, ambas reacciones enzima inmovilizada-mediador también fueron realizadas a estos valores de pH, las reacciones se evaluaron a 513 nm longitud de onda característica de la ferroína, y a 300 nm se evaluó la reacción de la lacasa con la hidroquinona.

Los resultados obtenidos presentan la misma tendencia que los datos experimentales obtenidos para la enzima libre con los diferentes mediadores, por lo tanto la información experimental es semejante a la de la literatura de referencia.

El análisis de la eficiencia del sistema enzima inmovilizada-mediador (tabla 14), con base en la relación k_{cat}/K_m (mM min^{-1}), indica que la eficiencia se incrementa al disminuir el pH. La reacción lacasa inmovilizada con el ABTS constituyen el sistema más eficiente con datos de 7.540 (mM min^{-1}), 66.08 (mM min^{-1}) y 72.60 (mM min^{-1}) a pH= 5.0, pH= 4.0 y pH= 3.7 respectivamente, la reacción lacasa inmovilizada-ferroína con eficiencias de 2.620 (mM min^{-1}), 29.20 (mM min^{-1}) y 55.30 (mM min^{-1}) bajo las mismas condiciones de pH, es un mediador de eficiencia intermedia al compararlo con el ABTS en el sistema anterior. El

sistema menos eficiente con respecto a lacasa inmovilizada-ABTS a pH=5.0, pH= 4.0 y pH=3.7, está constituido por la reacción lacasa libre con la hidroquinona cuyos datos son $0.200 \text{ (mM min)}^{-1}$, $1.660 \text{ (mM min)}^{-1}$ y $5.680 \text{ (mM min)}^{-1}$ para cada pH indicado. Se observa que el ABTS es 3 veces mejor que la $\text{Fe}(\text{fen})_3^{2+}$ a pH= 5, 2 veces mejor a pH= 4 y 1.5 veces mejor a pH= 3.7. Por otro lado, la $\text{Fe}(\text{fen})_3^{2+}$ es 10 veces más eficiente que la hidroquinona a pH= 5, 18 veces más eficiente a pH= 4 y 10 veces más eficiente a pH= 3.7. finalmente la $\text{Fe}(\text{fen})_3^{2+}$ a pH= 3.7 es 7 veces más eficiente que el ABTS a pH= 5. y es 4 veces más eficiente a pH= 4.0 que el ABTS a pH= 5.0.

En la reacción enzima inmovilizada-mediador los resultados obtenidos para la eficiencia de los tres sistemas de reacción evaluados y comparándolos los mismos sistemas con la enzima libre, se observa que las eficiencias son menores para la enzima inmovilizada. El sistema lacasa inmovilizada-ferroína es una reacción que a pH= 3.7 posee una eficiencia de $55.30 \text{ (mM min)}^{-1}$, superior a la eficiencia del sistema lacasa inmovilizada-ABTS a pH= 5.0 [$7.540 \text{ (mM min)}^{-1}$].

Tabla 14. Parámetros cinéticos experimentales para la reacción lacasa inmovilizada-hidroquinona, lacasa inmovilizada-ferroína y lacasa inmovilizada-ABTS, determinados en una disolución amortiguadora de acetato 0.1 M a pH= 5.0, 4.0 y 3.7.

Parámetro	Hidroquinona			Ferroína			ABTS		
	pH=5.0	pH=4.0	pH=3.7	pH=5.0	pH=4.0	pH=3.7	pH=5.0	pH=4.0	pH=3.7
$V_{\text{max}} \text{ (mM/min)}$	0.001	0.002	0.0005	0.007	0.018	0.408	0.006	0.052	0.057
$K_m \text{ (mM)}$	0.750	1.080	0.093	0.270	0.693	0.850	1.090	0.987	0.896
$k_{\text{cat}} \text{ (min)}^{-1}$	0.150	1.800	0.530	0.700	20.23	47.00	8.220	65.23	65.06
$k_{\text{cat}}/K_m \text{ (mMmin)}^{-1}$	0.200	1.660	5.680	2.620	29.20	55.30	7.540	66.08	72.60

Es importante notar que en la reacción de lacasa inmovilizada con ferroína, este compuesto reacciona mejor que con la enzima inmovilizada que con la enzima libre. Esto es relevante, ya que la modificación del sitio activo al fijar la enzima al soporte aparentemente hace menos positivo al sitio activo, por lo tanto la ferroína cargada positivamente tiene un efecto de atracción de cargas con el sitio catalítico y por ello puede ser mejor sustrato que el ABTS, el ABTS posee carga negativa y es este caso en particular al ser menos positivo el sitio activo de la lacasa, se presenta repulsión de cargas lo que modifica la eficiencia del sistema (tabla 15).

Tabla 15. Eficiencias [k_{cat}/K_m (mMmin)⁻¹] de la lacasa libre y lacasa inmovilizada en sílica utilizando como sustrato ABTS, ferroína e hidroquinona, en una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH= 5, 4 y 3.7.

Mediadores	Lacasa libre			Lacasa inmovilizada		
	k_{cat}/K_m (mMmin) ⁻¹			k_{cat}/K_m (mMmin) ⁻¹		
	pH= 5.0	pH= 4.0	pH= 3.7	pH=5.0	pH= 4.0	pH= 3.7
ABTS	2.930	84.64	300.3	7.540	66.08	72.60
Ferroína	1.350	15.00	116.1	2.620	29.20	55.30
Hidroquinona	1.360	5.670	10.41	0.200	1.660	5.680

5.8 SISTEMA MEDIADOR-SUBSTRATO

A partir de los resultados obtenidos de las reacciones mediador-sustrato lacasa libre con la ferroína, lacasa libre con la hidroquinona, lacasa inmovilizada con la ferroína y lacasa inmovilizada con la hidroquinona, en donde se evaluaron experimentalmente las reacciones, obteniendo las máximas eficiencias tanto para la enzima libre como para la enzima inmovilizada. Por lo tanto hacia falta validar la última parte de la hipótesis propuesta, referida a la oxidación del sustrato por el mediador, para ello se realizó la oxidación del colorante índigo con la ferroína. Se preparó una disolución de $[\text{Fe}(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)_3]^{3+}$ “in situ” (cloruro de hierro III con fenantrolina en una relación 3:1), por ser esta la especie oxidante del mediador, la cual se hace reaccionar con la disolución del colorante índigo. La reacción se sigue por espectrofotometría de absorción electrónica UV-Vis a 513 nm y 608 nm, longitudes de onda características de la ferroína y el índigo respectivamente.

En la figura 22, se presentan los espectros de absorción electrónica UV-Vis obtenidos, en ellos se denota la variación en las concentraciones de ferroína e índigo, al incrementar las adiciones en μL del colorante al mediador, se observa como va generándose la ferroína a 513 nm hasta mantener su absorbancia prácticamente constante, y simultáneamente se presenta una señal de absorbancia a 610 nm que se incrementa gradualmente, hasta que alcanza una valor máximo a esta longitud de onda, lo que indica que se ha consumido la ferroína en cantidad estequiométrica, para generar el ácido antranílico, lo que se relaciona con la transferencia de los electrones (cuatro) requeridos para degradar al índigo.

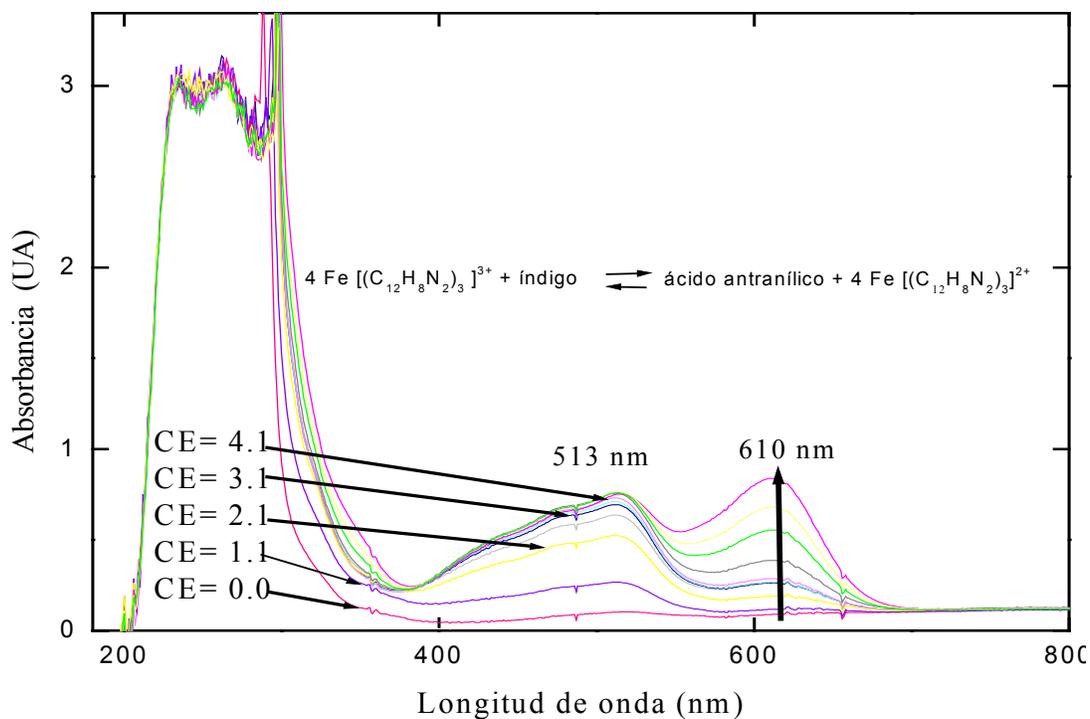


Figura22. Espectros de absorción electrónica ultravioleta-visible de la reacción estequiométrica de ferriína con índigo empleando una disolución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH= 3.7. La variación en las concentraciones de ambos compuestos se evaluo a 513 nm y 610 nm longitudes de onda características de la ferriína e índigo respectivamente, se indica el valor de los coeficientes estequimétricos correspondientes al espectro señalado.

A partir del grupo de valores experimentales obtenidos del análisis de los espectros de la figura 22, se obtuvo el coeficiente estequiométrico con un valor aproximado de cuatro, lo que indica que por cada mol de índigo se consumen 4 moles de ferriína, generando los productos indicados en la reacción, y la representación gráfica de absorbancia a 513 nm contra volumen de índigo adicionado se presenta en la figura 23.

La reacción estequiométrica evaluada es la siguiente:



El coeficiente estequiométrico obtenido es igual al de la relación entre índigo y ABTS, debido a que en ambos casos el proceso redox del mediador es mono electrónico. Con esta reacción se confirma que la ferriína reacciona con el índigo oxidándolo a un compuesto incoloro y con un

menor grado de toxicidad, reacción característica y semejante a la del índigo con el ABTS [53].

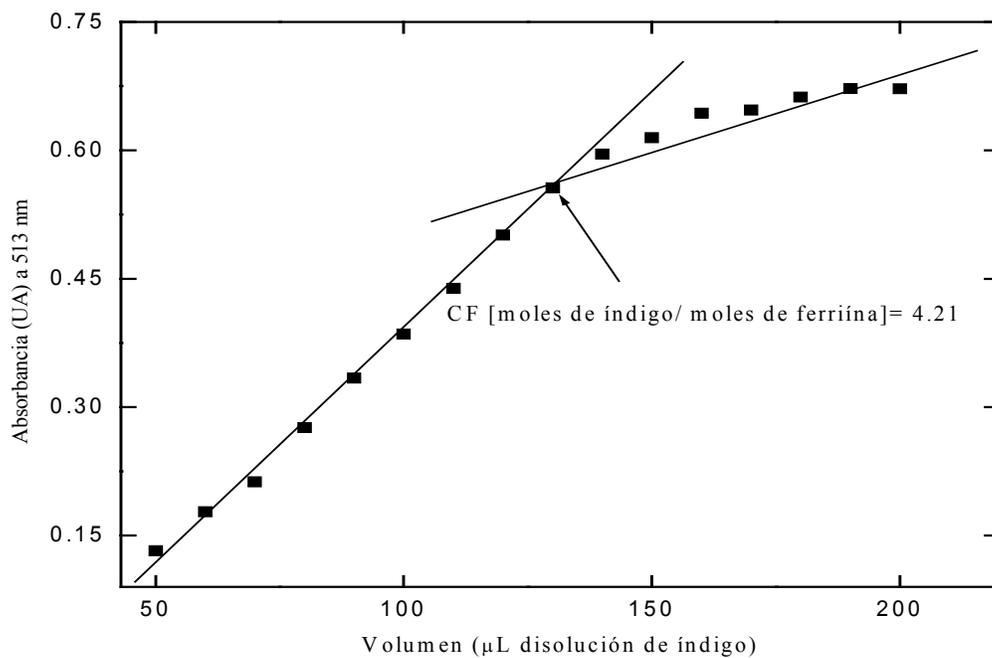


Figura 23 Gráfica de absorción a 513 nm (UA) contra el volumen de índigo $2.4 \times 10^{-1}\text{ M}$ (μL), adicionado en cantidades estequiométricas a una disolución de ferriina $2 \times 10^{-4}\text{ M}$, ambos preparados en una disolución reguladora de acetatos 0.1 M a $\text{pH} = 3.7$. El coeficiente estequiométrico se indica gráficamente y su valor es de 4.21 a 513 nm de longitud de onda.

CAPÍTULO VI

6.0 CONCLUSIONES

En general los resultados experimentales obtenidos indican que es posible que haya un grupo de compuestos que pueden competir con el ABTS como mediador, encontrando un proceso experimental que permite mejorar las condiciones de catálisis con un compuesto de origen inorgánico. La información obtenida de las reacciones lacasa-mediador y mediador-substrato, demostró que se tiene un sistema lacasa-mediador-substrato sumamente eficiente al satisfacer la condición de potenciales redox establecida.

El principal aporte de este trabajo está vinculado directamente con la condición propuesta de los potenciales redox: $E_{lacasa} > E_{mediador} > E_{substrato}$, esto garantizó la espontaneidad de la reacción, cuando se satisfizo por completa la condición mencionada. Otro punto importante del trabajo, fue la evaluación de la eficiencia catalítica de las reacciones estudiadas a diferentes valores de pH, encontrando que los sistemas a pH menor a 5 suelen ser más eficientes en condiciones de acidez, con un valor mínimo de 3.5.

La integración de técnicas electroquímicas como la voltamperometría cíclica con los procedimientos experimentales de la biotecnología, fueron parte esencial para la obtención de los resultados presentados en esta tesis.

CAPÍTULO VII

7.0 BIBLIOGRAFÍA

- 1 Gerlach R., Process for the preparation of azo compounds, United States patent 4,837,308, 1989.
- 2 Cripps C., Bumpus J. A. and Aust S. D., Biodegradation of azo heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*, applied and environmental microbiology, April 1990, 56 (4):1114-1118.
- 3 Ollika P., Alhonmaki K., Leppanen V., Glumoff T., Rajola T. and Suominen I, Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*, Applied and environmental microbiology, December 1993, 59 (12): 4010-4016.
- 4 Unyayar A., Mazmanci M. A., Ataçağ H., Erkur E.A., and Coral G., A drimaren blue X3LR dye decolorizing enzyme from *Funalia trogii*: one step isolation and identification, Enzyme and microbial technology, 2005, 36: 10-16.
- 5 Guaratini C. C. I., and Zanoni M. V. B., Corantes têxteis, Quimica nova 1999, 23 (1): 71-78.
- 6 Toh Y.C., Yen J. J. L., Obbard J. P., and Ting Y. P., Decolourisation of azo dyes by white rot fungi (WRF) isolated in Singapore, Enzyme and microbial technology 2003, 33: 569-575.
- 7 Damhus T., Ture V., and Uwe S., Process for removal of excess dye from printed or dyed fabric or yarn, United States patent 6 409 771, 2002.
- 8 Glenn J. K. and Gold M. H., Decoloration of several polymeric dyes by the lignin degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, applied and environmental microbiology, June 1983, 45 (6):1741-1747.
- 9 Johnson D. L., Thompson J. L., Brinkmann S. M., Schuller K. A., and Martin L. L., electrochemical characterization of purified *Rhus vernicifera* laccase: voltammetric evidence for a sequential four electron transfer, Biochemistry 2003, 42: 10229-10237.
- 10 Peralta-Zamora P., Pereira C. M., Tiburtius E. R. L., Moraes S. G., Rosa M. A., Minussi R. C., and Durán N., Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase, Applied catalysis B: environmental 2003, 42: 131-144.
- 11 Chivukula M., and Renganathan V., Phenolic azo dye oxidation by laccase from

- Pyricularia oryzae*, Applied and environmental microbiology, December 1995, 61 (12): 4374-4377.
- 12 Domke T., Nunn C., Giuseppin M. L., Martens R. J., Swarthoff T., and Verrips C., Enzymatic bleach composition, Biotechnology advances, 1997, 15 (3): 758.
 - 13 Tauber M. M., Guebitz G. M., and Rehorek A., Degradation of azo dyes by laccase and ultrasound treatment, Applied and environmental microbiology, may 2005, 71 (5):2600-2607.
 - 14 Palmieri G., Cennamo G., and Sannia G., Remazol brilliant blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system, Enzyme and microbial technology 2005, 36: 17-24
 - 15 Camero S., Ibarra D., Martínez M. J., and Martínez A. T., Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes, Applied and environmental microbiology, April 2005, 71 (4): 1775-1784.
 - 16 D'souza D. T., Tiwari R., Sah A. K., and Raghukumar C., Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes, Enzyme and microbial technology 2005, article in press.
 - 17 Baldrian P., Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *Daedalea quercina* and decolorization of synthetic dyes by the enzyme, Applied microbiol. Biotechnol. 2004, 63: 560-563
 - 18 Ryan S., Schnitzhofer W., Tzanov T., Cavaco-Paulo A., and Guebitz G. M., An acid stable laccase from *Sclerotium rolfsii* with potential for wool dye decolorization, Enzyme and microbial technology 2003, 33 (6): 766-774.
 - 19 Graca M. B., Soares. M. T., Pessoa A., Specificity of phenolic disazo dyes in relation to transformations by laccase, Enzyme and microbial technology 2002, 30 (5): 607-612.
 - 20 Heinfling a., Martínez M. J., Bergbauer A.T., and Szewzyk U., Transformation of industrial dyes by manganese peoxidase from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese independent reaction, Applied and environmental microbiology August 1998, 64 (8): 2788-2793.
 - 21 Swamy J., and Ramsay J. A., The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes, Enzyme and microbial technology 1999, 24: 130-137.

- 22 Wong Y., and Yu J., Laccase catalyzed decolorization of synthesis dyes, *Water research* November 1999, 33 (16): 3512-3520.
- 23 Rodríguez E., Pickard M. A., and Vázquez –Duhalt R., Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi, *Current microbiology* 1999, 38: 27-32.
- 24 Abadulla E., Tzanov T., Costa S., Robra K., Cavaco-Paulo A., Gübitz G. M., Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*, *Applied and environmental microbiology* August 2000, 66 (8): 3357-3362.
- 25 Chagasa E. P., Durrant L. R., Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*, *Enzyme and microbial technology* November 2001, 29 (8): 473-477
- 26 Campos R., Kandelbauer A., Robrab K. H., Cavaco-paulo A., and Gübitz G. M., Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*, *Journal of biotechnology* August 2001, 89 (2) :131-139.
- 27 Nyanhongoa G. S., Gomes B. J., Gübitz G. M., Zvauyab R., Read J., and Steneira W., Decolorization of textile dyes by laccase from a newly isolated strain of *Trametes modesta*, *Water research* March 2002, 36 (6): 1449-1456.
- 28 Maximoa C., Pessoa M. T., and Ferreira M. C., Biotransformation of industrial reactive azo dyes by *Geotricum sp* CCM11019 2002.
- 29 Schneider P., and Deussen K. J., Methods and compositions for bleaching a dye in solution, United States patent 2002.
- 30 Soares G. M.B., Pessoa M. T., Oliveira-Campos A. M., Hrdina R., and Costa-Ferreira M., Specificity of phenolic disazo dyes in relation to transformation by laccase, *Enzyme and microbial technology* 2002, 30: 607-612.
- 31 Shiang P.W. and Coleman J. E., Conformational studied of copper proteins *Pseudomonas* blue protein and *Polyporus* laccase, *The Journal of biological chemistry*, 1968; 243 (16): 4286-4297.
- 32 Fee J. A., Malkin R., Malström B. G. and Vänngård, Anaerobic oxidation –reduction titrations of fungal laccase, evidence for several high potential electron accepting sites, *The Journal of biological chemistry*, August 1969, 244 (15):4200-4207..
- 33 Li K., Helm R. F., and Ericksson K. L., Mechanistic studies of the oxidation of a non-phenolic lignin model compound by the laccase/1-hydroxidenzotriazole redox system,

- biotechnol appl. Biochem. 1998, 27: 239-243.
- 34 Huang H. W., Zoppellaro G., and Sakurai T., Spectroscopic and kinetic studies on the oxygen centered radical formed during the four electron reduction process of dioxygen by *Rhus vernicifera* laccase, The journal of biological chemistry November, 1999, 274 (46): 32718-32724.
 - 35 Convents D., Doornink M., Koek J. H., thornthwaite D. W., and Zwets N., Method and composition for enhancing the activity of an enzyme, United States patent 6 384 007, 2002.
 - 36 Lee S K., George S. D., antholine W. E., Hedman B., Hodgson K., and Solomon E. I., Nature of the intermediate formed in the reduction of O₂ to H₂O at the trinuclear copper cluster active site in native laccase, Journal American Chemical Soc. 2002, 124: 6180-6193.
 - 37 Nitta K., Kataoka KI., and Sakurai T., Primary structure of a lacquer tree laccase as a prototype enzyme of multicopper oxidases, Journal of inorganic biochemistry July 2002, 91 (1): 125-131.
 - 38 Valderrama B., Oliver P., Medrano-Soto A., and Vazquez-Duhalt R., Evolutionary and structural diversity of fungal laccases, Antonie van Leeuwenhoek 2003, 84: 289-299.
 - 39 Piontek K., Antorini M., and Choinowski T., Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers, The journal of biological chemistry 2002, 277 (40): 37663-37669.
 - 40 Thurston C. F., The structure and function of fungal laccases, microbiology 1994, 140: 19-26.
 - 41 Bourbonnais R. and Paice M.G., Oxidation of non-phenolic substrate an expanded role for lactase in lignin biodegradation, FEBS July 1990, 267 (1): 99-102.
 - 42 Bourbonnais R., Paice M. G., Lanthier G., and Yaguchii M., Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor*, and role of the mediator 2,2'-azinobis (3-Ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in Kraft lignin depolymerization, Applied and environmental microbiology, May 1995, 61 (5): 1876-1880.
 - 43 Bourbonnais R., Paice M. G., Freiermuth B., Bodie E., and Borneman S., Reactivities of various mediators and laccase with Kraft pulp and lignin model compounds, Applied and environmental microbiology, December 1997, 63 (12): 4627-4632.

- 44 Leonowicz A., Matuszewska A., Luterek J., Ziegenhagen D., Wasilewska M. W., Cho N. S., and Hofrichter M., Biodegradation of lignin by white rot fungi, *Fungal genetics and biology* 1999, 27: 175-185.
- 45 Schultz A., Jonas U., Hammer E., and Schauer F., Dehalogenation of chlorinated hydroxybiphenyls by fungal laccase, *Applied and environmental microbiology* September 2001, 67 (9): 4377-4381.
- 46 Kim Y., Cho N. S., Eom T. J., and Shin W., Purification and characterization of a laccase from *Cerrena unicolor* and its reactivity in lignin degradation, *Korean chem. Soc.* 2002, 23 (7985):
- 47 Mcguirl M. A., and Dooley D. M., Copper containing oxidases, *current opinion in chemical biology* 1999, 3: 138-144.
- 48 Xu F., Laccase, *Novo Nordisk Biotech, Davis California* 1998, 1545-1554.
- 49 Torres E., Bustos-Jaimes I., and Le Borgne S., Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants, *Applied catalysis B: environmental* 2003, 46: 1-15.
- 50 Durán N., and Esposito E., Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidases like compounds in wastewater and solid treatment: a review, *Applied catalysis B: environmental* 2000, 28 (2): 83-99.
- 51 Karam J., and Nicell J. A., Potential applications of enzymes in waste treatment, *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 1997, 69: 141-153.
- 52 Mayer A. M., and Staples R. C., Laccase: new functions for an old enzyme, *Phytochemistry* 2002, 60:551-565.
- 53 Solis-Oba M., Ugalde V. M., González I., and Viniegra-González G., An electrochemical-spectrophotometrical study of the oxidized forms of the mediator 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) produced by immobilized laccase, *Journal of Electroanalytical chemistry* 2005, 579: 59-66.
- 54 Aitken M. D., Massey J., Chen T. and Heck P. E., Characterization of reaction products from the enzyme catalyzed oxidation of phenolic pollutants, *Wat- res.*, 1994, 28 (9): 1879-1889.
- 55 Zille A., Tzanov T., Gübitz G. M. and Cavaco-Paulo A., Immobilized laccase for decolorization of reactive black 5 dyeing effluent, *Biotechnology letters* 2003, 25:

1473-1477.

- 56 Collins P. J., Kotterman M. J. J., Field J. A., and Dobson D.W., Oxidation of anthracene and benzo[a] pyrene by laccases from *Trametes versicolor*, Applied and environmental microbiology, December 1996, 62 (12): 4563-4567.
- 57 Albulquerque M. G. E., Lopes A. T., Serralheiro M. L., Novais J. M., and Pinheiro H.M., Biological sulphate reduction and redox mediator effects on azo dye decolourisation in anerobic-aerobic sequencing batch reactors, Enzyme and microbial technology, 2005, 36. 790-799.
- 58 Acunzo F., and Galli C., First evidence of catalitic mediation by phenolic compounds in the laccase induced oxidation of lignin models, Eur. J. Biochem. 2003, 270:3634-3640.
- 59 García O., Camarero S., Colom J.F., Martínez A. T., Martínez M.J., Monje r., and Vidal T., Optimization of a laccase mediator stage for TCF bleaching of flax pulp, Holzforschung 2003, 57: 513-519.
- 60 Xu F., Kulys J. J., Duke K., Li K., Krikstopaitis K., Deussen H. W., Abbate E., Galinyte V., and Schneider P., Redox chemistry in laccase catalized oxidation of N-hydroxy compounds, Applied and environmental microbiology May 2000, 66 (5): 2052-2056.
- 61 Xu F., Berka R. M., Wahleithner J. A., Nelson B. A., Shuster J. R., Brown S. H., Palmer A. E., and Solomon E. I., Site directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and profile, Biochem. J., 1998, 334: 63-70.
- 62 Klonowska A., Gaudin C., Asso M., and Fournel A., LAC3, a new low redox potential laccase from *Trametes sp* strain C30 obtained as a recombian protein in yeast, Enzyme and microbial technology, 2005, 36: 34-41.
- 63 Li K., Xu F., and Eriksson K. E., Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compounds, Applied and environmental microbiology June 1999, 65 (6): 2654-2660.
- 64 Muñoz C., Martínez A.T., Guillén F., and Martínez M. J., Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization , catalitic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn (II) oxidation, Applied and environmental microbiology June 1997, 63 (6): 2166-2174.

- 65 Guillen F., Muñoz C., Gómez-Toribio V., Martínez T., and Martínez M. J., Oxygen activation during oxidation of methoxyhydroquinones by laccase from *Pleurotus eryngii*, Applied and environmental microbiology January 2000, 66 (1): 170-175.
- 66 Klonowska A., Gaudin C., Fournel A., Asso M., Le Petit J., Giorgi M., and Tron T., Characterization of a low redox potential laccase from the basidiomycete C30, Eur. J. Biochem. FEBS 2002, 269:6119-6125.
- 67 Vázquez-Duhalt R., Westlake D. W. S. and Fedorak P. M., Lignin proxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing organic solvents, Applied and environmental microbiology, February 1994, 60 (2): 459-466.
- 68 Xu H., Lai Y. Z., Slomczynski D., Nakas J. P., and Tanenbaun S. W., Mediator assisted selective oxidation of lignin model compounds by laccase from *Botrytis cinerea*, Biotechnology letters, October 1997, 19 (10): 957-960.
- 69 Lund M., and Claus F., Process for treating pulp with laccase and a mediator to increase paper wet strength, United States, patent 6 610 172, 2003.
- 70 Spadaro J. T., Gold M. H. And Renganathan V., Degradati of azo dyes by the lignin-degradation fungus *Phanerochaete chrysosporium*, Applied and environmental microbiology, August 1992, 58 (8): 2397-2401.
- 71 Lundell T. and Hatakka A., Participation of Mn (II) in the catalysis of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase from *Phlebia radiata*, FEBS letters, 1994, 348: 291-296.
- 72 Eggert C., Temp U., Dean J. F. D., and Eriksson K. L., Laccase mediated formation of the phenoxazinone derivative cinnabarinic acid, FEBS letters 1995, 376: 202-206.
- 73 Nicotra S., Cramarosa M. R., Mucci A., Pagnoni U. M., Riva S., and Forti L., Biotransformation of resveratrol : síntesis of trans-dehydrodimers catalyzed by laccases from *Myceliophthora thermophyla* and from *Trametes pubescens*, Tetrahedron 2004, 60: 595-600.
- 74 Kotterman M. J. J., Vis E. H., and Field J. A., Successive mineralization and detoxification of benzo[a]pyrene by the white rot fungus *Bjaerkandera sp* strain BOS55 indigenous microflora, Applied and environmental microbiology August 1998, 64 (8): 2853-2858.
- 75 Amitai G., A daniR., Sod-Moriah G., Rabinovitz I., Vincze A., Leader H., Chefetz B.,

- Leibovitz-Persky L., Friesem D., and Hadar Y., Oxidative biodegradation of phosphorothiolates by fungal laccase, FEBS letters 1998, 438:195-200
- 76 Moreira M. T., Feijoo G., Mester T., Mayorga P., Sierra-Alvarez R., and Field J. A., Role of organic acids in the manganese independent biobleaching system of *Bjerkandera* sp strain BOS55, Applied and environmental microbiology, July 1998, 64 (7):2409-2417.
- 77 Collins P. J., Donson A. D. W., and Field J. A., Reduction of the 2, 2'-Azinobis (83-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) cation radical by physiological organic acids in the absent and presence of manganese, Applied and environmental microbiology June 1998, 64 (6): 2026-2031.
- 78 Chen C. L., Gratzl J. S., Kirkman A. G., Potthas A., and Rosenau T., Selective enzymatic oxidation methyl groups to aldehydes by oxygen in the presence of a laccase mediator catalyst, United States patent 5 888 787, 1999.
- 79 Srebotnik E., and Hammel K. E., Degradation of nonphenolic lignin by the laccase/1-hydroxybenzotriazole system, Journal of biotechnology 2000, 81: 179-188.
- 80 Acunzo F., Galli C., and Masci B., Oxidation of phenols by laccase and laccase-mediator systems solubility and steric issues, Eur J. Biochem. FEBS 2002, 269: 5330-5335.
- 81 Chandralata R., D'Souza T., Thorn R. G., and Reddy C. A., Process for removing dye containing water or soil using white rot lignin modifying fungus *Flavodon flavus*, United States patent 2002.
- 82 Xu F., Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases, The Journal of biological chemistry, January 1997, 272 (2): 924-928.
- 83 Ahn M. Y., Dec J., Kim J. E., and Bollag J. M., Bioremediation and biodegradation, treatment of 2,4-dichlorophenol polluted soil with free and immobilized laccase J. environmental qual September 2002, 31:1509-1515.
- 84 Xu F., Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition, Biochemistry 1996, 35: 7608-7614.
- 85 Lee K., Nam W. S., and Han G. Y., Photocatalytic water splitting in alkaline solution using redox mediator. 1: Parameter study, International Journal of hydrogen energy

- 2004, article in press.
- 86 Bechtold T., Burtscher E., and Turcanu A., Anthraquinones as mediators for the indirect cathodic reduction of dispersed organic dyestuffs, *Journal of Electrochemical Chemistry* 1999, 465: 80-87.
 - 87 Johannes C., and Majcherczyk A., Laccase activity test and laccase inhibitors, *Journal of biotechnology* March 2000, 78 (2): 193-199.
 - 88 Johannes C., and Majcherczyk A., Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems, *Applied and environmental microbiology*, February 2000, 66 (2): 524-528.
 - 89 Soares G. M. B., Pessoa de Amorim M. T., and Costa-Ferreira M., Use together with redox mediators to decolorize remazol brilliant blue R., *Journal of biotechnology* 2001, 89: 123-129.
 - 90 Claus H., Faber G., and König H., Redox mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases, *Applied microbial biotechnology* 2002, 59: 672-678.
 - 91 Fabbrini M., Galli C., and Gentili P., Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase, *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic* 2002, 16: 231-240.
 - 92 Ward G., Belinky P. A., Hadar Y., Bilkis I., and Dosoretz C. G., the influence of non-phenolic mediators and phenolic co-substrates on the oxidation of 4-bromophenol by lignin peroxidase, *enzyme and microbial technology* 2002, 30:490-498.
 - 93 Vogt U., and Schindler M., Storage stable formulations comprising mediators, peroxide and pH stabilizers and their use in enzymatic bleaching systems, *United States patent 6 380 142*, 2002.
 - 94 Ho G. And Liao C., Activation of a siliceous carrier for enzyme immobilization, *United states patent, 4,384,045*, 1983.
 - 95 Kaldenbauer A., Maute O., Kessler R. W., Erlacher A., and Gübitz., Study of dye decolorization in an immobilized laccase enzyme reactor using online spectroscopy, *Biotechnology and bioengineering* 2004, 87 (4): 552-563.
 - 96 Quan D., Kim Y., and Shin W., Characterization of an amperometric laccase electrode covalent immobilized on platinum surface, *Journal of Electroanalytical chemistry* 2004, 561: 181-189.
 - 97 Mielgo I., Palma C., Guisan J.M., and Fernández –Lafuente R., Covalente

- immobilisation of manganese preoxidase (MnP) from *Phanerochaete chrysosporium* and *Bjerkandera sp BOS55*, Enzyme and microbial technology 2003, 32: 769-775.
- 98 Lenggling M., and Kluschanzoff H., Use of solutions containing enzymes for cleaning fermentation or storage tanks, United States patent 6 564 813, 2003.
 - 99 Rochefor D., Leech D., and Bourbonnais R., Electron transfer mediator systems for bleaching of paper pulp, Green chem. 2004, 6:14-24.
 - 100 Bourbonnais R., Leech D., and Paice M. G., Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds, Biochimica et biophysica acta 1998, 1379:381-390.
 - 101 Mouchrek V. E., and Chierice G. O., Estudo voltamétrico do complexo de cobre (II) com o ligante vermelho de alizarina adsorbido na superfície do electrodo de grafite pirolítico, química nova 1999, 22 (3): 312-315.
 - 102 Gelo-Pujic M., Kim H., Butlin N. G., and Palmore G. T., Electrochemical studies of a truncated laccase produced in *Pichia pastoris*, Applied and environmental microbiology December 1999, 65 (12): 5515-5521.
 - 103 Xu F., Deussen H., López B., Lam L., and Li K., Enzymatic and electrochemical oxidation of N-hydroxy compounds, redox potential, electron transfer, and radical stability, Eur. J. Biochem. 2001, 268: 4169-4176.
 - 104 Freire R. S., Durán N., and Kubota L. T., Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds, Talanta 2001, 54:681-686.
 - 105 Fabbrini M., Galli C., Gentili P., and Macchitella D., An oxidation of alcohols by oxygen with the enzyme laccase and mediation by TEMPO, Tetrahedron letters 2001, 42: 7551-7553
 - 106 Bloczynski M. L., and Corey P. F., Mediators suitable for the electrochemical regeneration of NADH, NADHP or analogs thereof, Unites States patent 5,520,786, 1996.
 - 107 Gómez-Toribio V., Martínez A. T., Martínez M. J., and Guillén F., Oxidation of hydroquinones by the versatile ligninolytic peroxidase from *Pleurotus eryngii*, Eur. J. Biochem. 2001, 268: 4787-4793.
 - 108 Chiacchierini E., Restuccia D., and Vinci G., Bioremediation of foods industry

- effluents: recent applications of free and immobilised polyphenoloxidases, *Food sci. Tech. Int.* 2004, 10 (6): 373-382.
- 109 Durán N., Rosa M. A., D'Annibale A., and Gianfreda L., Applications of laccase and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review, *Enzyme and microbial technology* 2002, 31:907-931.
- 110 Zille A., Ramalho P., Tzanov T., Millward R., Aires V., Cardoso M. H., Ramalho M. T., Gübitz G. M., and Cavaco-Paulo A., Predicting dye degradation from redox potentials, *Biotechnol.* 2004, 20 (5): 1588-1592.

Iztapalapa, D. F. a 9 de Diciembre de 2005

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la
tesis

Oxidación enzimática de sustratos utilizando diversos mediadores

que presentó

María de los Angeles Castro Sampablo

Comité Tutorial:

Director: Dr. Gustavo Viniegra Gonzáles

Asesor: Dr. Ignacio González Martínez

Asesor: Dr. Octavio Loera Corral

Jurado:

Presidente: Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

Secretario: Dr. Ignacio González Martínez

Vocal: Dr. Octavio Loera Corral

Vocal: Dr. Víctor Manuel Ugalde Saldívar

