



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA ALFA-  
AMILASA RETICULADA EN UN SOPORTE MAGNETICO”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

**ALEJANDRO CORONA VIDAL**

**DIRIGIDA POR**

**Dr. ALDO AMARO REYES**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2016.**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE  
UNA ALFA-AMILASA RETICULADA EN UN SOPORTE  
MAGNETICO”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

**ALEJANDRO CORONA VIDAL**

**DIRIGIDA POR**

**Dr. ALDO AMARO REYES**

**SINODALES**

**Dr. ALDO AMARO REYES**  
DIRECTOR

\_\_\_\_\_

**Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ**  
SINODAL

\_\_\_\_\_

**Dr. MIRIAM ROCÍO ESTÉVEZ GONZÁLEZ**  
SINODAL

\_\_\_\_\_

**Dr. CONCEPCIÓN KEIKO SHIRAI MATSUMOTO**  
SINODAL

\_\_\_\_\_

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Inmovilización enzimática	1
1.1.1.1 Técnicas usadas para inmovilización enzimática	2
1.1.1.1 Adsorción	2
1.1.1.2 Atrapamiento vía inclusión	5
1.1.1.3 Reticulación enzimática	6
1.1.1.4 Soportes	8
1.2 Características generales de quitosano	9
1.3 Características generales de genipino	10
1.4 Características generales de amilasa	11
2. JUSTIFICACIÓN	14
3. HIPÓTESIS	15
4. OBJETIVOS	16
4.1 General	16
4.2 Específicos	16
5. METODOLOGÍA	17
5.1 Reactivos	17
5.2 Preparación de las nanopartículas magnéticas de quitosano	17
5.3 Determinación de la cinética de absorción de BSA	17
5.4 Caracterización de la nanopartículas magnéticas enzimáticas	
NME	18
5.5 Determinación del grado de reticulación	18
5.6 Temperatura y pH óptimo de la amilasa	19
5.7 Parámetros cinéticos	20
5.9 Reusabilidad de la inmovilización	20
5.10 Análisis estadísticos	20

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
6.1 Preparación de las nanopartículas magnéticas de quitosano	21
6.2 Absorción de BSA	24
6.3 Caracterización de la nanopartículas magnéticas enzimáticas	
NME	27
6.3.1 Análisis FT-IR	27
6.3.2 Termogravimetría (TGA)	30
6.3.3 Caracterización de la morfología del soporte quitosano-	
genipino	32
6.3.4 Potencial Z	33
6.4 Determinación del grado de reticulación	34
6.5 pH óptimo de la amilasa	37
6.6 Temperatura óptimo de la amilasa	41
6.6.1 Q10	44
6.7 Parámetros cinéticos	45
6.7.1 Energía de activación	46
6.8 Reusabilidad de la inmovilización	47
7. CONCLUSIONES	49
8. BIBLIOGRAFÍA	51
9. ANEXO	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Unión a soporte por interacción iónica	2
2	Unión covalente a través de brazos (a) y Unión covalente a través de múltiples puntos (b)	3
3	Interacción entre $\text{Fe}_3\text{O}_4$ y proteína	4
4	Atrapamiento vía inclusión	5
5	Matriz de sílice	6
6	Agregados reticulados enzimáticos (CLEAs)	7
7	Estructura del quitosano	10
8	Estructura de la quitina	10
9	Estructura de genipino	10
10	Estructura de la amilasa	12
11	Curvas de histéresis que muestran la saturación magnética del soporte	21
11	Cinética de absorción de BSA sobre soporte magnético	24
13	FT-IR del soporte libre (línea negra), enzima inmovilizada (línea verde) y enzima libre (línea roja)	26
14	Análisis de pérdida de peso relativo (%) en un intervalo de temperatura de 0 °C a 877 °C (TGA) de soporte libre (línea azul), $\alpha$ -amilasa inmovilizada (línea naranja) y $\alpha$ -amilasa libre (línea gris)	29
15	Imágenes SEM de soporte de quitosano y sales de $\text{F}_2\text{O}_3$ .	32
16	Lisinas en la superficie de la amilasa	36
17	pH de $\alpha$ -amilasa libre e inmovilizada	36
18	Temperatura de $\alpha$ -amilasa libre e inmovilizada	40
19	Ciclos de reúso de la $\alpha$ -amilasa inmovilizada	46

## RESUMEN

Las enzimas tienen excelentes características como alta actividad, selectividad y especificidad, aprovechadas para diseñar procesos sintéticos amigables hacia el ambiente. Mantener su estabilidad estructural es difícil y para ello la inmovilización enzimática se usa como alternativa para conservar la actividad de las enzimas y su reutilización. El objetivo del presente trabajo fue inmovilizar una amilasa en un soporte magnético a base de quitosano, reticulado con genipino y sales de hierro, evaluando su capacidad de retención proteica usando BSA como control. Se evaluó el grado de reticulación con el ensayo de ninhidrina, se determinó la temperatura y el pH óptimo de la enzima. Las nanopartículas fueron caracterizadas mediante microfotografías en microscopía electrónica de barrido y se determinó su capacidad de reuso ensayando la actividad catalítica en ciclos sucesivos. El rendimiento de sólidos de la síntesis del soporte fue del 83.06 %. La morfología del soporte mostró bordes con forma irregular, pequeñas hendiduras y características ásperas. La cinética de absorción mostró alta afinidad hacia las proteínas. El potencial Z de la enzima inmovilizada predice la estabilidad de la amilasa con el soporte. El análisis FT-IR confirmó interacción entre la proteína y el soporte. El análisis termogravimétrico mostró una pérdida aproximada del 60 % del peso total de la enzima. Caso contrario al soporte el cual muestra estabilidad a altas temperaturas. La amilasa libre e inmovilizada mostraron un pH óptimo de 5 (3.40 U/g de enzima) y pH 4 (2.37 U/g de enzima), respectivamente. En temperatura, tanto enzima libre como inmovilizada el óptimo fue a los 40 °C (5.79 U/g de soporte y 2.59 U/g de soporte). El Q10 mostrado por la inmovilización refleja que el cambio en la temperatura no tiene efecto significativo en la estructura terciaria de la enzima. La energía de activación para la inmovilización fue de 1.37 KJmol<sup>-1</sup> y para la enzima libre fue de 37.16 KJmol<sup>-1</sup>. Los valores de K<sub>m</sub> y V<sub>max</sub> para la enzima libre fueron de 5.40 mg/ml y 21.89 mol/mlmin y de la enzima inmovilizada fueron 1.46 mg/ml y 7.46 mol/mlmin respectivamente. La inmovilización es estable al reuso hasta por seis ciclos. La amilasa fue inmovilizada en el soporte magnético de quitosano y dicha inmovilización le confirió resistencia a temperaturas e intervalos más amplios de pH con posibilidad de reutilizarse, de esta manera se consiguió una alternativa eficiente para futuros usos industriales.

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al Dr. Aldo Amaro Reyes**, Universidad Autónoma de Querétaro: como mi asesor de tesis, por su constante dedicación, paciencia y apoyo en todos los sentidos. Por la confianza depositada en mi para este proyecto, por la orientación para el desarrollo y término de esta tesis.

**A la Dra. Keiko Concepción Sirai Matsumoto**, Universidad Autónoma Metropolitana: por su apoyo en la determinación del potencial Z del soporte sintetizado en esta tesis.

**Al Dr. Carlos Regalado**, Universidad Autónoma de Querétaro: por formar parte de la mesa de sinodales y sus aportaciones hacia este trabajo.

**A la Dra. Miriam Estévez**, Universidad Nacional Autónoma de México: por formar parte de la mesa de sinodales y sus aportaciones hacia este trabajo.

**A CONACYT** por la beca otorgada, derivada del proyecto CB-2014/241208.

**A mis padres:** por ser la principal fuente de motivación y apoyo, no solo económico sino emocional, por tener en todo momento esa palabra de aliento para seguir adelante y no rendirme. Por alentarme día a día a conseguir mis metas, por más difícil que el camino pueda parecer. Por saber que a pesar de todo siempre tendré su apoyo y ustedes el mío. Este logro también es de ustedes.

**A mi Lilee:** porque tú más que nadie sabe el esfuerzo y dedicación que imprimí en este trabajo. Por tu muy particular manera de motivarme, gracias a eso hoy esta etapa tiene conclusión. Por estar en todo momento hasta en los peores días. Sabes que esto tiene impreso más que solo letras y figuras. Este trabajo tiene una dedicatoria especial para ti. TE AMO.

## **1. ANTECEDENTES**

### **1.1 Inmovilización enzimática**

La inmovilización enzimática fue utilizada para permitir la reutilización de enzimas en los procesos catalíticos. La primera aplicación industrial de enzimas inmovilizadas fue en la producción de aminoácidos ópticamente puros e hidrólisis de proteína G (Pavlidis y col., 2010). Las principales ventajas de la inmovilización es que aumentan la actividad de la enzima en disolventes orgánicos, aumentan la estabilidad de la enzima a temperaturas que no son las óptimas para la enzima, por lo que su estabilidad aumenta, la enzima se puede recuperar después de la reacción y de igual manera puede ser reutilizable incluso para otro tipo de reacción (Miletic y col., 2011).

La inmovilización enzimática consiste en confinar la enzima a una fase, soporte o matriz diferente al sustrato y al producto. Las matrices deben cumplir ciertas características como estar compuestas de polímeros inertes o materiales inorgánicos, físicamente fuerte, estables, capacidad de regeneración, capacidad de aumentar la especificidad y actividad enzimática, reducir el producto de inhibición y reducirla contaminación microbiana (Singh 2009). Para realizar una inmovilización enzimática se deben de tener en cuenta propiedades tanto de la enzima como del soporte utilizado. La masa molecular o los grupos funcionales en la superficie de la enzima dan información sobre el tipo de soporte más adecuado para llevar a cabo la inmovilización para que, de esta manera la interacción entre soporte y enzima sea más eficaz. De igual manera deben de tomarse en cuenta parámetros tanto de activación como inhibición enzimática, tales como pH, temperatura, disolventes e impurezas. Por otra parte, el material de soporte o de inmovilización debe de contar con características especiales y una de las más importantes es la estructura química que va a determinar la interacción enzimática (Chen y col., 2007). Varios métodos son usados para la inmovilización entre los cuales destacan el método de adsorción que usa agua y derivados de polisacáridos insolubles, polímeros sintéticos o vidrio como matriz. En el método de entrecruzamiento covalente se usan reactivos multifuncionales

como glutaraldehído, bisdiazobensidina y disocianato de hexametileno (Chen y col., 2007). Los polímeros como el colágeno, celulosa y  $\kappa$ -carragenina son usados por los métodos de atrapamiento (Datta y col., 2013).

## 1.1.2 Técnicas usadas para inmovilización enzimática

### 1.1.2.1 Adsorción

La unión a soporte se puede presentar de manera física (interacciones hidrofóbicas, de van der Waals o iónicas) o de manera covalente (Figura 1). La adsorción es un método sencillo, simple y de bajo costo para la inmovilización enzimática en el cual la enzima se fija al soporte por interacciones hidrofóbicas, de van der Waals o iónicas. El soporte se añade a la solución donde se encuentra la enzima y después de pocas horas el complejo enzima-soporte está listo. La reacción es reversible por lo que se permite la reutilización del soporte y de esta manera eliminar enzimas desnaturalizadas mediante cambios en el pH o cambios iónicos y de esta manera reemplazar el medio con medio fresco y enzimas activas. Sin embargo, las interacciones hidrofóbicas y de van der Waals son generalmente demasiado débiles para mantener la unión de la enzima al soporte en condiciones industriales. Por lo tanto, la pérdida de la enzima mediante el proceso es inevitable y debido a esto no toda la enzima puede ser reutilizada y si se requiere recuperar toda la enzima el producto debe de ser purificado. Caso contrario a los enlaces iónicos y covalentes que son generalmente más fuertes debido a la firme unión entre la enzima y el soporte, este tipo de enlaces tiene la ventaja de que durante la biocatálisis no sufren desadsorción o lixiviación de las enzimas durante la reacción (Santos y col., 2007).

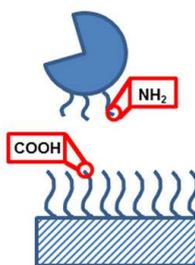


Figura 1. Unión a soporte por interacción iónica (Feng y col., 2014).

La unión iónica es otra técnica de inmovilización en la cual las enzimas pueden ser fijadas a biopolímeros de polisacáridos como son dextran, agarosa y quitosano. Estos biopolímeros pueden ser funcionales con una amplia variedad de grupos químicos para lograr la interacción iónica, dichos grupos químicos incluyen amonio cuaternario, dietilaminoetil y derivados de carboximetilo. Un ejemplo de este método en la industria es en la producción de jarabe de alta fructosa (Lalonde y Margolin, 2002).

La unión covalente es el método de mayor uso en la inmovilización enzimática en el cual la enzima es unida covalentemente al soporte. En la inmovilización a través de la unión covalente pueden seguirse dos métodos: unión covalente a través de brazos y unión covalente a través de múltiples puntos (Figura 2). El primero tiene la ventaja de que restringe la configuración de la enzima mientras que el segundo aporta una mayor estabilidad a la enzima. En las proteínas el  $\epsilon$ -amino de la lisina que es un aminoácido muy común en las proteínas se utiliza como punto de unión covalente ya que se encuentra en la superficie de las proteínas ya que es relativamente reactivo con los soportes y por lo tanto favorece la estabilidad de la enzima con el soporte (Krenkova y Foret, 2004). Estas uniones covalentes a soportes abarcan las nanopartículas de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  que tiene la ventaja de ser fáciles de separar, mediante un campo magnético y, además, el pequeño tamaño de las partículas de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ .

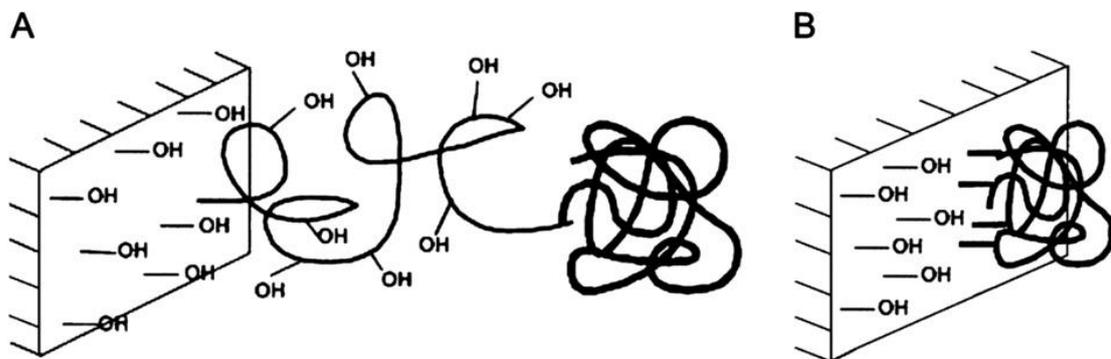


Figura 2. Unión covalente a través de brazos (a) y unión covalente a través de múltiples puntos (b) (Fernández-Lorente y col., 2001).

De manera reciente, se ha progresado en el campo de soportes magnéticos. La separación magnética es una tecnología emergente que utiliza el magnetismo para separar de manera eficiente partículas ferro magnéticas de diferentes muestras químicas y biológicas en el área de la micro y nanometría (Figura 3) (Selvan y col., 2002). Las nanopartículas magnéticas muestran supermagnetismo, lo cual quiere decir que las partículas magnéticas son atraídas por un campo magnético con la particularidad de que no retienen magnetismo residual una vez que el campo magnético ha sido retirado. Por lo que, las partículas supermagnéticas en suspensión pueden ser removidas de la solución usando un imán externo que al ser removido no formará aglomerados de nanopartículas. Partículas magnéticas como óxido de hierro reticulado, óxido de hierro ultrapequeño y supermagnético, y nanopartículas de óxido de hierro monocristalino, han sido desarrollados como agentes magnéticos (Krause y col., 2004). Las partículas magnéticas han sido usadas para inmovilizar enzimas a fin de mejorar la estabilidad de los bioelementos, facilidad de separación de la mezcla de reacción, aumentar la estabilidad del catalizador, en aplicaciones biotecnológicas o para dispositivos analíticos tales como biosensores. En el campo de la medicina, se usan las nanopartículas para facilitar el diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Las partículas de hierro han sido usadas en el tratamiento de tumores (Simberg y col., 2007).

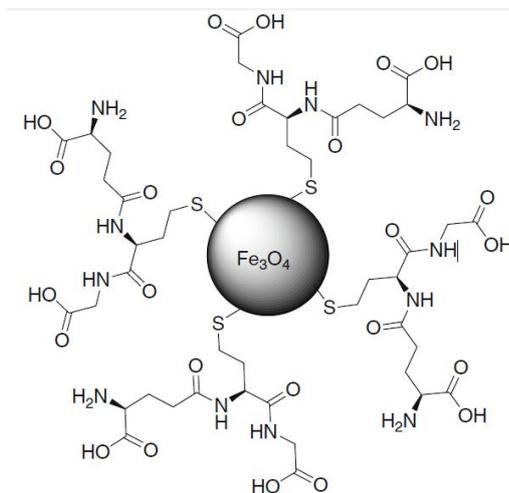


Figura 3. Interacción entre Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> y proteína (Varma y col., 2014).

Ha habido varios métodos desarrollados para la preparación de nanopartículas magnéticas, sin embargo, el protocolo usado con mayor frecuencia implica la coprecipitación de iones ferrosos y férricos en solución básica. Las nanopartículas magnéticas presentan propiedades eléctricas, ópticas, magnéticas y químicas y cuando estas nanopartículas son mezcladas con polímeros como dextran, PVA (Acetato de polivinilo) y DEAE (celulosa) mejoran notablemente su estabilidad ya sea que se agreguen antes o después de la formación de las partículas de hierro (Lee y col., 1996). Por otro lado, las nanopartículas magnéticas pueden ser recubiertas de sílice y de esta manera tener una alta cantidad de grupos silano. Como resultado, las nanopartículas recubiertas de grupos silano pueden ser ancladas con mayor facilidad a superficies químicas definidas y ser usados con mayor eficiencia como nanotransportadores magnéticos (Li y col., 2007).

#### **1.1.2.2 Atrapamiento vía inclusión**

Otra posibilidad de inmovilización enzimática es el atrapamiento vía inclusión, mediante el cual la enzima es envuelta en un canal polimérico como puede ser un polímero orgánico o una solución gel (Figura 4). El atrapamiento protege la enzima previniendo el contacto directo con el ambiente reteniendo la enzima dentro de un dispositivo o material, pero esta técnica tiene limitaciones en la transferencia de masa y baja carga enzimática. Además, no se puede prevenir la fuga de enzima, pero es considerablemente menor en comparación con la adsorción física (Miletic y col., 2011).



Figura 4. Atrapamiento vía inclusión (Feng y col., 2014).

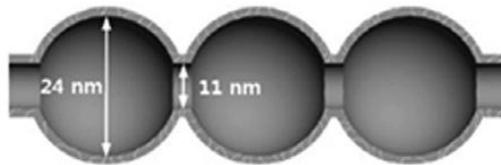


Figura 5. Matriz de sílice (Lee y col., 2009).

Un método común del atrapamiento es a través de matrices de sílice formadas por polimerización hidrolítica (Figura 5). Esta técnica está basada en la producción de matrices de sílice por hidrólisis catalizada por ácidos o bases de compuestos de silano (Vidinha y col., 2006). La inmovilización por atrapamiento ha resultado un método ampliamente utilizado en resultados positivos en el aumento de la actividad enzimática en medio orgánico debido probablemente a la interacción entre los dominios de la enzima con la matriz de fijación (Reetz y col., 2003). Hwang y col (2011) fabricaron microesferas híbridas de material orgánico e inorgánico para atrapamiento e enzimas con un sistema magnéticamente separable. Estas microesferas híbridas resultaron ser altamente estables durante más de 120 días con aproximadamente 75 % de actividad enzimática inicial conservada.

### 1.1.2.3 Reticulación enzimática

La inmovilización enzimática libre de soporte o matriz es posible usando reticulantes bifuncionales como es el glutaraldehído, para unir enzimas entre sí sin la necesidad de una matriz o soporte por medio. Destacan entre este tipo de técnicas el sistema de reticulación enzimático insoluble (CLEs), cristales de enzimas reticulados (CLECs), agregados reticulados enzimáticos (CLEAs) y la reticulación enzimática secada por pulverización (CLSDs). El sistema de reticulación enzimático insoluble (CLEs) fue descubierta en 1960 mediante la reticulación de enzimas disueltas haciendo reaccionar los grupos amino de la superficie de las enzimas con un producto químico bifuncional reticulante (Quiocho y Richards, 1966). Sin embargo debido a la gran cantidad de inconvenientes como la baja retención de actividad o baja estabilidad mecánica, este método fue abandonado.

Los cristales de enzima reticulados (CLECs) fueron de igual manera que los CLEs sintetizados en la década de los 60's mediante la reticulación con glutaraldehído de enzimas cristalizadas (Quirocho y Richards, 1964). Los CLECs son sistemas de inmovilización enzimática altamente activos, tienen mayor estabilidad en disolventes orgánicos y al calor, su tamaño de partícula es muy fácilmente controlable (Roy y Abraham, 2004). Debido a la facilidad de reciclaje, potencial reutilización y alta productividad catalítica, estos biocatalizadores son adecuados en el uso industrial. Sin embargo, este método es un procedimiento muy laborioso y solo es aplicable para enzimas cristalizables altamente purificadas por lo que lo convierte en un método muy costoso (Sheldon y cols., 2007). Cao y cols (2003) desarrollaron un método de CLECs menos costoso mediante la precipitación de enzimas mediante la adición de sales, miscibles en agua, disolventes orgánicos o polímeros no iónicos a soluciones enzimáticas acuosas para de esta manera formar los agregados de reticulación.

Recientemente se han desarrollado agregados reticulados enzimáticos (CLEAs) que en contraparte con las CLECs son producidas por simple precipitación enzimática en solución acuosa como agregados físicos de moléculas proteicas, por adición de sales, solventes orgánicos miscibles en agua o polímeros no iónicos (Sheldon y cols. 2005) (Figura 6). Este tipo de agregados físicos se mantienen unidos por uniones no covalentes que no modifican las estructuras terciarias de las proteínas, es decir, no las desnaturalizan. El posterior entrecruzamiento de estos agregados físicos los hace permanentemente insolubles manteniendo su estructura y por tanto su actividad catalítica. Las CLEAs son biocatalizadores altamente eficaces que pueden ser producidos por ser un método eficaz y barato (Illanes y col., 2006).

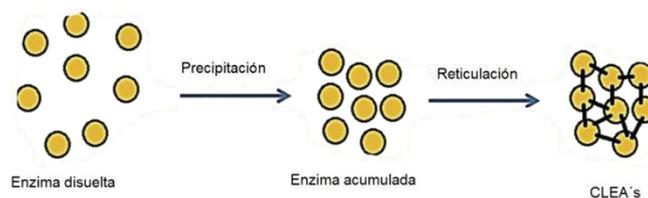


Figura 6. Agregados reticulados enzimáticos (CLEAs) (Sheldon y col., 2005).

#### **1.1.2.4 Soportes**

Los métodos de inmovilización enzimática requieren comúnmente un soporte o matriz y las propiedades de las enzimas inmovilizadas son importantes para elegir el soporte ideal para ser usado. Las matrices inorgánicas como lo son soportes de sílice y sus derivados, soportes de celita, bases de aluminio, presentan mayor estabilidad que las matrices orgánicas, debido a que este tipo de matrices tienen menor o nula interacción con la enzima durante la reacción catalítica (Vulfson y col., 2001). Por otro lado, los soportes orgánicos se obtienen de una fuente natural sobre todo de polisacáridos como la agarosa, celulosa o dextranos, tiene la ventaja de ser altamente compatibles con las enzimas. Debido a su carácter hidrófilo, muestran solamente interacciones débiles con las enzimas que disminuyen el riesgo de inactivación más sin embargo también representa una mala unión.

Los soportes orgánicos sintéticos son ampliamente usados como soportes de inmovilización. Resinas acrílicas como son Eupergit®C son soportes ampliamente usados, es un copolímero (dos monómeros) con macroporos de N,N'-metilen-bi-metacrilamida, glicidil de metacrilato, alil de glicidileter y metacrilamida, es altamente hidrofílica y estable a pH altos. El interés por los copolímeros ha crecido debido a que cambiando la relación entre los comonomeros las propiedades del copolímero cambia, manipulando así las propiedades hidrofóbicas, hidrofílicas, propiedades mecánicas, tamaño del poro, etc. El soporte para inmovilización de enzimas puede ser usado para diferentes propósitos en la industria, la aplicabilidad de los copolímeros macroporosos depende de su porosidad, por ello es importante tener conocimiento de los mecanismos de diseño para la formación, dependiendo de las necesidades particulares, de la estructura del poro, capacidad de optimizar los parámetros del poro como volumen del poro, distribución del poro a lo largo de la esfera, área de superficie concreta y diámetro medio del poro (Miletic y col., 2011).

## 1.2 Características generales de quitosano

El quitosano (Figura 7) es un copolímero lineal derivado de la  $\beta$ -(1,4)-glucosamina, es obtenido por deacetilación de la quitina [poli- $\beta$ -(1,4)-acetil glucosamina] de los residuos de la industria de alimentos marinos (por ejemplo cangrejo, camarón, etc.) y en menor cantidad de los hongos (Figura 8). El producto de la deacetilación de la quitina debe de ser por debajo del 50 % para que pueda ser llamado quitosano (Quignard y col., 2010). Se ha sido utilizado como un soporte para la inmovilización enzimática y para procesos de biocatálisis como soporte para la catálisis de la  $\beta$ -galactosidasa (Valerio y col., 2013). Existen dos polimorfismos de la quitina, uno de ellos se caracteriza por tener una orientación antiparalela de las cadenas de  $\alpha$ -quitina lo cual proporciona una mayor capacidad para la formación de puentes de hidrógeno entre las cadenas en comparación con la  $\beta$ -quitina que es caracterizada por una orientación paralela de las cadenas poliméricas. Estas características de la  $\alpha$ -quitina confieren mayor rigidez y una menor reactividad a este tipo de cadena encontrado naturalmente (Muzzarelli, 2005).

Existen diversos métodos químicos que modifican química o físicamente a las moléculas de quitosano, muchos de estos métodos pueden lograr aumentar la capacidad de absorción para metales, característica conferida por los grupos amino (-NH<sub>2</sub>) e hidroxilo (-OH) presentes en la molécula (Quignard y col., 2010) además presenta también una considerable capacidad de unión a proteínas y una alta capacidad de recuperación enzimática.

El quitosano ha sido ampliamente usado como soporte, es barato, no tóxico, y no perjudicial para las enzimas. El quitosano puede proveer muchas ventajas como una excelente hidrofiliidad, alta porosidad, una gran área de adhesión, y por lo tanto pequeña resistencia de transferencia de masa a la enzima (Chang y Juang, 2004).

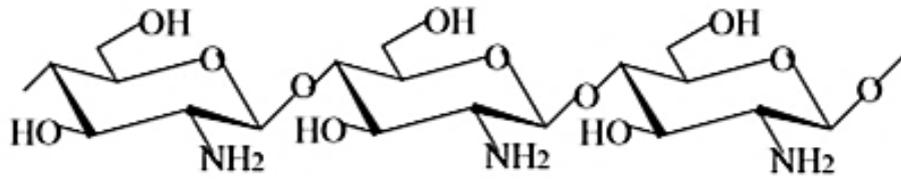


Figura 7. Estructura del quitosano (Krajewska, 2004).

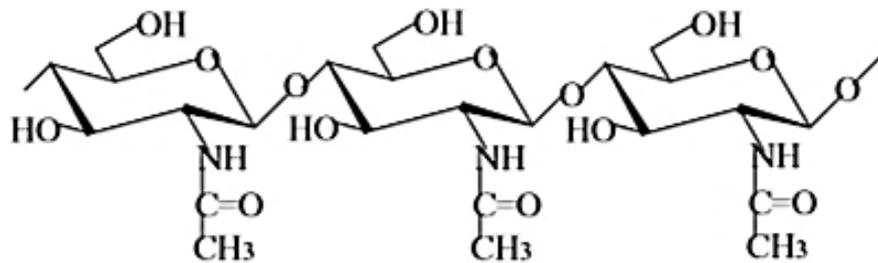


Figura 8. Estructura de la quitina (Krajewska, 2004).

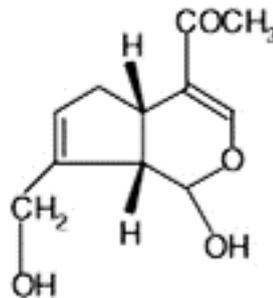


Figura 9. Estructura de genipino (Yuan, y col., 2007).

### 1.3 Características generales de genipino

El genipino [metil(1*R*,2*R*,6*S*)-2-hidroxi-9-(hidroximetil)-3-oxabicyclo[4.3.0]nona-4,8-dieno-5-carboxilato] se obtiene del genipiósido, un glucósido iridoide aislado de los frutos de *Genipa americana* y *Gardenia jasminoides* Ellis (Figura 9), que es capaz de reaccionar espontáneamente con grupos de aminoácidos primarios, péptidos o proteínas, es soluble en agua, alcohol, propilenglicol y presenta estabilidad en el intervalo de pH de 4 a 9 (Ramos de la Peña y col., 2014). Recientemente ha atraído mucha atención por su habilidad de reticular el quitosano y proteínas que contienen residuos de grupos aminos. El genipino ha

sido utilizado en estudios de fijación de tejido, productos alimenticios y administración de fármacos, en todas estas aplicaciones el genipino fue elegido por su baja toxicidad y alta biocompatibilidad, en comparación con otros agentes reticulantes (Cui y col., 2014). Este agente reticulante natural ha sido reportado 10 000 veces menos tóxico que el glutaraldehído (Yuan, y col., 2006; Mi y col., 2005).

#### **1.4 Características generales de amilasa**

La amilasa fue la primera enzima descubierta y aislada en 1833 por el científico francés Anselme Payen. En general, todos los tipos de amilasa son hidrolasas glucosídicas que actúan en las uniones  $\alpha$ -1,4-glicosídicas de las cadenas del polisacárido. La estructura de la  $\alpha$ -amilasa posee una estructura de barril TIM ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> que contiene los residuos del sitio catalítico, contiene cuatro regiones conservadas en su secuencia primaria. Algunos de estos aminoácidos conservados forman el sitio catalítico y algunos están involucrados en la estabilidad de la estructura de barril TIM (Figura 10) (van der Maarel y col., 2002). Las amilasas son un grupo de enzimas producidas en la naturaleza por las plantas, animales y microorganismos. El almidón es una de las principales fuentes de energía para el metabolismo y su hidrólisis con enzimas es necesario para la asimilación y aprovechamiento de energía de este biopolímero.

En los animales, las amilasas son importantes para hidrolizar el almidón, como un primer paso para la obtención de mono y dioligosacáridos, que son asimilados posteriormente a través de diferentes vías metabólicas. Tanto alfa como beta-amilasas desempeñan un papel importante en la regulación del crecimiento de plantas. En muchas semillas, beta-amilasa aparece antes de la alfa amilasa para iniciar el proceso de germinación. Durante la maduración de la fruta,  $\beta$ -amilasa contribuye al proceso de movilización del almidón por despolimerización de cadenas liberadas de  $\alpha$ -glucano por las enzimas hidrolíticas. Por lo tanto, descompone el almidón en azúcar lo que genera el sabor dulce de fruta madura (Do Nascimento y col., 2006). Por siglos, amilasas procedentes de fuentes vegetales y microbianas han sido utilizadas para

aditivos alimentarios. La amilasa que se encuentra en las semillas de la cebada juega un importante papel en la industria cervecera. Además, amilasas microbianas, ya sea a partir de hongos o bacterias, son importantes para la producción de muchos alimentos fermentados orientales.

La  $\alpha$ -amilasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de los enlaces  $\alpha$ -1,4-glucosídicos de la cadena lineal de la molécula de almidón. Funciona al azar a lo largo de la cadena de almidón, rompiendo la larga cadena de carbohidratos para producir oligosacáridos. La mayoría de las  $\alpha$ -amilasas son metaloenzimas, esto quiere decir que son dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  o, en menor medida de otros cationes divalentes, para iniciar sus actividades catalíticas. Esta enzima se encuentra en muchos tipos de organismos.



Figura 10. Estructura de la amilasa (Sussman y col., 1998).

Es responsable del metabolismo del almidón a través del cuerpo humano. Se encuentra principalmente en la saliva y fluido de páncreas. Se encuentra en grandes cantidades en plantas, hongos, bacterias y actinomicetos. Las amilasas alfa microbianas fueron aisladas de diferentes tipos de microorganismos que crecen bajo diferentes condiciones de cultivo.

La temperatura óptima para las  $\alpha$ -amilasas tiene una amplia gama dependiendo la fuente de obtención, oscilando entre los 25 °C hasta los 95 °C y el pH óptimo de la actividad de las  $\alpha$ -amilasas oscila entre pH 1.0 y pH 11.5 (Nielsen y Borchert, 2000). Las amilasas son las enzimas industriales más importantes en función de su amplia gama de aplicaciones en muchas industrias. Actualmente, los dos sectores principales con crecientes demandas son las industrias de alimentos y de biorrefinería. El aumento de la gama de aplicaciones de amilasa se basa en el desarrollo de enzimas más estables que puedan soportar un entorno de aplicación extrema. Para facilitar la estabilidad y la aplicación industrial de la enzima, se aplicaron métodos de inmovilización para la amilasa; el proceso de hidrólisis del almidón se mejoró significativamente mediante el uso inmovilización por el método de adhesión (Schafhauser y Storey, 1993). La enzima inmovilizada mejora la hidrólisis del almidón y el rendimiento del proceso mediante la reducción del tiempo de difusión del sustrato para la enzima en comparación con el sistema de enzimas libres.

## **2. Justificación**

Durante los últimos años con las consecuentes preocupaciones ambientales, los avances en el campo de la biotecnología han podido proporcionar herramientas útiles que pueden ser utilizadas en el desarrollo sostenible de la agricultura, las industrias alimenticias, de bebidas y farmacéuticas. Actualmente la biotecnología es vista como una alternativa a la tecnología de procesos industriales convencionales en los que se utilizan catalizadores químicos, el uso de sistemas biológicos tienen la ventaja de llevar a cabo conversiones químicas complejas en condiciones ambientales moderadas con alta especificidad y eficiencia. El uso y la sustitución de ingredientes por sistemas biológicos nos llevarán a un proceso más eficiente, con mayor rendimiento de producto y baja producción de productos indeseables. La biocatálisis nos ofrece muchas ventajas en un contexto sostenible y verde, sin embargo, la comercialización se ve obstaculizada por la falta de estabilidad en las enzimas y que su precio es considerablemente alto, la respuesta para superar el obstáculo es la inmovilización de enzimas. El uso de una enzima inmovilizada nos traerá beneficios en su estabilidad, así como el uso de un agente reticulante no tóxico como es el genipino, nos permitirá llevar las aplicaciones a un nivel de procesos industriales de consumo humano, como es la industria farmacéutica, alimenticia y de bebidas.

### **3. HIPÓTESIS**

La formulación de nanopartículas a base de quitosano y sales de hierro con actividad amilolítica reticuladas, permitirá mejorar la estabilidad de la actividad catalítica en diferentes condiciones de temperatura y pH, además de que facilitará la separación de la enzima al término del proceso catalítico.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 General**

- Diseñar nanopartículas de quitosano y sales de hierro que presenten carácter magnético para ser utilizadas como soporte para la inmovilización de una amilasa.

### **4.2 Específicos**

- Diseñar nanopartículas magnéticas reticuladas con diferentes concentraciones del agente reticulante, quitosano y tiempo de sonicación.
- Inmovilizar mediante reticulación una amilasa en el soporte magnético.
- Caracterizar parcialmente la estructura y propiedades catalíticas de las nanopartículas magnéticas reticuladas.

## **5. METODOLOGÍA**

### **5.1 Reactivos**

Quitosano de bajo peso molecular, genipino, cloruro de hierro (II y III), amilasa, y todos los demás reactivos grado analítico se obtuvieron de manera comercial de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA) excepto donde se indique lo contrario.

### **5.2 Preparación de las nanopartículas magnéticas de quitosano**

La mezcla del soporte de quitosano de bajo peso molecular y sales de hierro reticulado con genipino, se preparó en dos pasos de acuerdo a lo descrito por (Morales y col., 2013) con algunas modificaciones. Una cantidad de hierro proveniente de una mezcla de hierro en relación molar 2:1 ( $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ ) de cloruro férrico y cloruro ferroso con quitosano se mezcló en una solución de ácido acético al 3 % a una temperatura de 60 a 70 °C con agitación suave hasta su disolución. La solución de quitosano se dispersó mediante un procesador ultrasónico a diferentes tiempos y las nanopartículas generadas se precipitaron utilizando una solución de  $\text{NH}_4\text{OH}$ :Etanol 96 % en proporción 1:1. La mezcla alcalina se homogeneizó rápidamente utilizando un vortex durante 30 segundos. La emulsión resultante se mantuvo en agitación suave (60 rpm) durante 18 horas para la maduración de las nanopartículas. Al cabo del tiempo de maduración se realizaron lavados de la emulsión con agua:etanol al 96 % en relación 1:1, centrifugando por 5 minutos a 7000 x g para neutralizar las nanopartículas. La pasta de las nanopartículas lavada fue secada en un horno de convección a 80°C durante 5 horas. Finalmente, la pasta seca fue pulverizada utilizando un mortero cerámico con el fin de obtener una muestra arácea.

### **5.3 Determinación de la cinética de absorción de BSA**

Se realizó un análisis de la cinética de absorción con respecto al tiempo, tomando lecturas cada 10 min durante dos horas y centrifugando las muestras por 3 minutos a 13000 rpm comenzando con una concentración de BSA de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La proteína soluble presente en el sobrenadante fue cuantificada espectrofotométricamente a 595 nm (Bio Rad iMark) por medio del método de

Bradford (Bradford, 1976). Q es la capacidad de adsorción y se define como la cantidad en mg de BSA unida a cada gramo de soporte. Q se determinó a partir de Ecuación 1.

$$Q = \frac{(C_i - C_f)V}{m} \quad (1)$$

Donde  $C_i$  y  $C_f$  son las concentraciones de BSA en la solución inicial y final respectivamente,  $V$  es el volumen inicial de BSA en la solución y  $m$  es el peso seco del soporte.

#### **5.4 Caracterización de las nanopartículas magnéticas enzimáticas (NME)**

Se tomaron microfotografías mediante microscopia electrónica de barrido en alto vacío con una aceleración de electrones con voltaje de 15 kV usando un microscopio Carl Zeiss (EVO-50, Zeiss, Jena, Alemania) para observar la morfología de las nanopartículas magnéticas (NPM). Una muestra de NME deshidratada a 80 °C por 8 horas fue montada en el portaobjeto, posteriormente fue recubierta con oro mediante pulverización catódica durante 60 segundos y 30 mA (Desk II, Denton Vacuum, NJ, EUA). El análisis estructural de temperatura Curie serán determinado de balanza termomagnética. El potencial Z del material de quitosano se corrió a 20 °C, en un equipo Zetasizer 2000, con un índice de refracción de 1.33 y una viscosidad (cP) de 1.0740. Cada muestra se evaluó por triplicado, haciendo 100 barridos por cada replica. Las muestras fueron resuspendidas a una concentración de 0.1 g/L. Todas las mediciones de FT-IR fueron en un equipo Bruker IFS 88 FTIR con un detector MCT en un espectro de 500 a 1500  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **5.5 Determinación del grado de reticulación**

El grado de reticulación de las NME fue determinado mediante el ensayo de ninhidrina (NHN) (Yuan y col., 2007). EL ensayo determina el porcentaje de grupos amino libres que quedan en los NME después de la reticulación. Se preparó una solución de ninhidrina como se describe a continuación: Solución A:

1.05 g de ácido cítrico, 10 ml (1.0 M) NaOH y 0.04 g SnCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, aforar con agua desionizada hasta 25 ml, solución B: 1 g de ninhidrina a 25 ml de monimetil éter de etilen glicol. Las dos soluciones A y B se combinaron y agitaron durante 45 min, luego se almacenó en un frasco obscuro. Para el ensayo, una muestra de 0.1 mg se calentó a 100 °C en un baño con agua con 1 ml de la solución de ninhidrina durante 20 minutos. La solución fue enfriada a temperatura ambiente (22 °C), posteriormente se diluyó con 5 ml de una solución acuosa de 50 % isopropanol, y luego se determinó la absorbancia a 570 nm con un espectrofotómetro. La cantidad de los grupos amino libre en la muestra de prueba después de calentar con ninhidrina, es proporcional a la absorbancia óptica de la solución. La curva concentración de los grupos NH<sub>2</sub> libres en la muestra fue determinada a partir de una curva estándar de glicina en un intervalo de 5 µM/g de proteína a 30 µM/g de proteína.

El grado de reticulación de la muestra se calcula de acuerdo a la ecuación 2

$$\text{Grado de reticulación} = \frac{[(\text{NHN amina react.})_i - (\text{NHN amina react.})_f]}{(\text{NHN amina reactiva})_i * 100} \quad (2)$$

Donde “i” corresponde a la fracción molar de NH<sub>2</sub> libre de las muestras no reticuladas y “f” corresponde a la fracción molar de NH<sub>2</sub> libre restante de las muestras reticuladas (Yuan y col., 2007).

### 5.6 Temperatura y pH óptimo de la amilasa

Para determinar la temperatura optima de la amilasa, las determinaciones de actividad fueron conducidas por incubación a 30 °C hasta 80 °C en pH 5.0. El efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción se midió en términos del cociente de temperatura (Q10). Para ello se calculó Q10 con la ecuación 3 de Dixon y Webb (Eyring y cols., 1939).

$$Q10 = \ln \frac{E}{R(T1-T2)} \quad (3)$$

donde  $E$ = energía de activación (Joules),  $R$ : constante de los gases= 8.314 J/Kmol y  $T$ =temperatura absoluta. El pH óptimo fue determinado mediante la actividad de la amilasa en un intervalo de pH 3 a 10. Se usó un amortiguador de acetatos 50 mM con valores de pH de 3 a 10, un amortiguador de fosfatos 50 mM con valores de pH de 6.0 a 8.0 y un amortiguador de glicina con pH 9.0.

### **5.7 Parámetros cinéticos**

Los ensayos de actividad enzimática fueron realizados en las condiciones óptimas de funcionamiento de la enzima cuantificando azúcares reductores de acuerdo al método DNS de azúcares reductores (Miller, 1959), usando una mezcla de 1 g/L de almidón al 1 % como sustrato, 50  $\mu$ L de amortiguador y 50  $\mu$ g de amilasa a temperatura y pH óptimo. Se preparó una curva estándar de glucosa. Una unidad de actividad (U) fue definida como la cantidad de enzima que produce 1  $\mu$ mol de glucosa equivalente por minuto (Amaro-Reyes y col., 2011). La actividad de la enzima libre fue comparada con la enzima inmovilizada usando una mezcla de 1 g/L de almidón al 1 % como sustrato, 50  $\mu$ L de amortiguador y 50  $\mu$ g de amilasa inmovilizada.

### **5.8 Reusabilidad de la inmovilización**

La capacidad de reutilización de las NME fue evaluada ensayando la actividad catalítica en sucesivos ciclos. Cada ciclo consistió en la determinación de las actividades de la amilasa en las NME y la inmediata centrifugación a 9000 rpm por 10 segundos.

### **5.9 Análisis estadístico**

Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado y fueron reportadas como la media de los ensayos. El diseño experimental y comparación de medidas (con  $p < 0.05$  como el nivel mínimo significativo) fue realizado mediante el software Minitab 17 (Minitab Inc, Colegio del estado de Pensilvania).

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **6.1. Preparación de las nanopartículas magnéticas de quitosano**

Una parte esencial de las nanopartículas, es la capacidad magnética, la cual es conferida por las sales de hierro empleadas en la síntesis (Liy cols., 2008). La Figura 11 muestra la curva de histéresis del soporte de sales de hierro donde se muestra el momento magnético. Del gráfico se puede deducir que la magnetización máxima obtenida es cercana a 34 emu/g cuando se aplica un campo de +/- 18000 Oe que puede considerarse cercano al valor de magnetización de saturación ya que se observa que tiende a volverse asintótica la curva a campos más elevados. El campo coercitivo es de 6.16 Oe (campo aplicado cuando la magnetización es igual a cero). La magnetización remanente es alrededor de 0.192 emu/g, cuando el campo aplicado es igual a cero. Debido al tipo de curva que se forma se puede decir que el soporte se comporta como un material ferromagnético. Los materiales ferromagnéticos muestran fuerza de atracción hacia el campo magnético externo aplicado parecido a los materiales paramagnéticos, pero con una intensidad superior. Los materiales ferromagnéticos conservan una magnetización, llamada magnetización remanente cuando se retira el campo magnético exterior, solamente el hierro, cobalto y níquel son ferromagnéticos en la temperatura ambiente, esto puede explicar el por qué el soporte tiene este comportamiento. (Bulte y col., 1994).

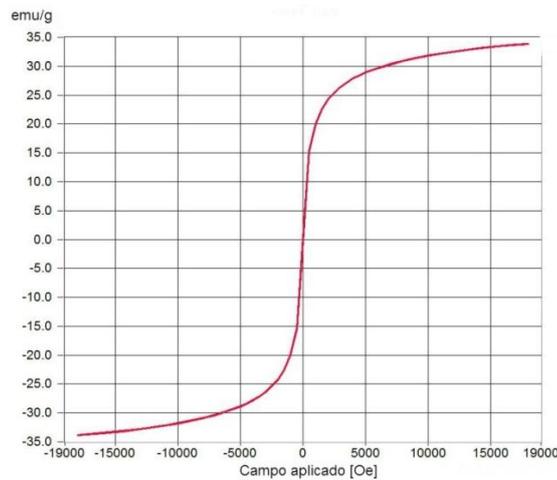
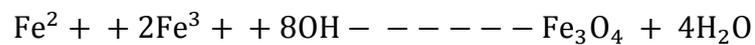


Figura 11. Curvas de histéresis que muestran la saturación magnética del soporte.

El óxido de hierro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) puede ser sintetizado mediante la coprecipitación de  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  en solución acuosa salina por adición de una base a una solución acuosa con las sales de hierro  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  en una relación molar de 1:2 (Gupta y cols., 2005). A este precipitado se le denomina comúnmente como magnetita. La reacción puede ser descrita de la siguiente manera:



Si esta reacción se oxida por medio del aire, alteraría las características tanto físicas como químicas del nanomaterial. Es por eso que la reacción se lleva a cabo en un ambiente libre de oxígeno. La obtención de este óxido de hierro conduce a la formación de pequeños núcleos cristalinos para que posteriormente crezcan estos cristales por el efecto de la maduración de Ostwald (Schwertmann y cols., 1991). Dicho mecanismo dicta que las moléculas en la superficie de una partícula son energéticamente menos estables que los que están en el interior. Este proceso espontáneo, se produce porque las partículas más grandes de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  están energéticamente favorecidas con respecto a las más pequeñas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . A medida que el sistema intenta disminuir su energía, las moléculas en la superficie de una partícula pequeña de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  tienden a desprenderse de la partícula y difundir en la solución. Cuando

todas las partículas pequeñas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  hacen esto, aumenta la concentración de moléculas libres en solución.

Cuando las moléculas libres de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  en solución se sobresaturan, las moléculas libres tienden a condensarse sobre la superficie de las partículas más grandes de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Por lo tanto, las partículas más pequeñas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  se reducen, mientras que las partículas grandes de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  crecen, y en general el tamaño medio va en aumento (Ratke y cols., 2002). Varias moléculas como dextran, almidón, goma arábica y quitosano, se han propuesto como agentes de recubrimiento para proteger y estabilizar las sales de óxido de hierro. El quitosano es de particular interés en la síntesis del nanomaterial debido a que, tiene gran potencial de quelación. Los grupos amino del quitosano reaccionan con los iones metálicos del  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Los átomos de nitrógeno sostienen electrones libres que interaccionan con los cationes. Además, el quitosano tiene la capacidad de formar asociaciones interpoliméricas que pueden conducir a la formación de fibras o redes. Cuando el quitosano se encuentra a valores de pH menores a 6, sus aminas están protonadas, convirtiendo al quitosano soluble en agua. Sin embargo, a valores superiores a pH 6, las aminas del quitosano se desprotona y el polímero pierde su carga y se vuelve insoluble y es en este punto cuando el polímero forma las redes de quitosano. La síntesis del soporte demostró ser efectiva ya que el rendimiento de sólidos fue del 83.06 %. Los recubrimientos inorgánicos con híbridos en plantillas coloidales han sido preparados por coprecipitación y demuestran tener un carácter un alto carácter magnético. Sin embargo, las adecuadas condiciones de temperatura, pH, soluciones acuosas de cloruro férrico, urea, ácido clorhídrico y polivinil de pirrolidona hacen que la síntesis sea complicada (Akbarzadeh y cols., 2012). El método de solución- gel tiene las ventajas de lograr un buen control tanto de la estructura como del tamaño de la partícula. Las desventajas se ven reflejadas en el hecho de que el uso de tensoactivos altera la morfología y la superficie de carga de las nanopartículas aunque su estructura cristalina no se vea alterada (Reddy y cols., 2012).

Rana y cols. (2014) desarrollaron microesferas de quitosano modificado. El proceso que siguieron consistió en una modificación del quitosano pues se polimerizó con acrilamida. El polímero fue separado con alcohol para posteriormente ser secado. El polímero fue disuelto en ácido acético y se añadió el glutaraldehído como agente de reticulación en agitación durante 6 horas. Shen y cols. (2014) prepararon nanopartículas de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  recubiertas con quitosano mediante una técnica solvotérmica la cual consiste en la preparación de un compuesto con propiedades tanto sólidas como de gel. Para ello mezclaron  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y quitosano, por otra parte, homogenizaron NaOAc y polivinilpirrolidona, a todo esto fue añadido etilenglicol para obtener una solución translúcida. El producto fue rescatado mediante lavados magnéticos con 0.5 % de ácido acético como diluyente, finalmente el producto fue recuperado con un imán y secado a 60 °C. Kumari y cols. (2011) prepararon un soporte basado en encapsulamiento del quitosano formando un “collar de quitosano” ya que al encapsular el quitosano y colocarse una al lado de la otra, asemejaban un collar de perlas. El soporte fue preparado mezclando el quitosano con 1.5 % de ácido acético en agitación constante a una temperatura de 45 °C. Esta solución fue tomada con una jeringa con una boquilla de 5 mm de diámetro para dejar caer gota a gota en 100 mL de una solución 1 M de KOH. Obtenidas las perlas, estas fueron sometidas a agitación constante por 2 horas. Posteriormente se obtuvieron perlas de tamaño uniforme, 3 mm de diámetro, con ayuda de papel filtro poroso.

## **6.2 Absorción de BSA**

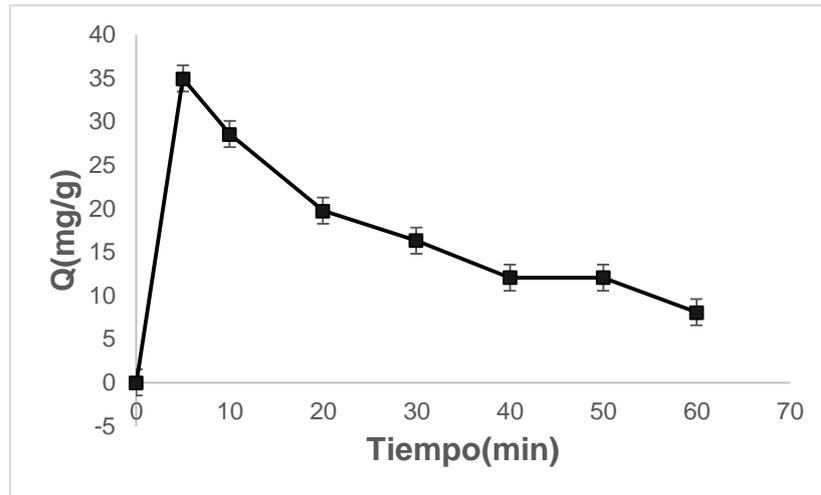


Figura 12. Cinética de absorción de BSA sobre soporte magnético.

Una vez obtenido el soportemagnético pulverizado, se determinó su capacidad de adsorción ( $Q$ ), que se define como la cantidad en mg de BSA unida a cada gramo de soporte. Usamos una concentración de 50 mg de soporte por 1 mg/mL de BSA. En la Figura 12 se observa la cinética expresada en  $\mu\text{g}$  de proteína por g de soporte contra el tiempo en minutos. En dicha Figura se aprecia que el máximo al cual se alcanzó llegar fue 35  $\mu\text{g/g}$  a los 5 minutos de iniciada la reacción. Al cabo de este tiempo,  $Q$  disminuye gradualmente hasta después de 1 hora llegar casi a 0, estos resultados sugieren que en el soporte sintetizado en esta tesis, la concentración de BSA no se mantiene constante en el soporte sino que más bien es aparentemente liberado nuevamente al medio. El tiempo de reacción entre la proteína y el soporte tiene gran importancia debido a que el establecimiento de la unión entre el soporte y la proteína indica la eficacia de adsorción del nanosupporte (Wang y cols., 2013). Una posible explicación para esta rápida absorción y de igual manera rápida liberación de la proteína puede ser hecha a partir de las micrografías electrónicas de barrido. En ellas se aprecia como la morfología del soporte muestra bordes con forma irregular, pequeñas hendiduras y características ásperas. Es en éstas hendiduras y superficie áspera donde la enzima se fija con mayor facilidad y por lo tanto la absorción de la enzima al soporte es muy rápida. Sin embargo, debido a la ruptura del enlace covalente entre el quitosano y la enzima, es que se observa

la incorporación de la proteína nuevamente en el medio. Esto se evitó con la coprecipitación de la enzima y el soporte para de esta manera anular la ruptura del enlace covalente y mantener fija la enzima a las hendiduras y la superficie porosa del sólido.

El mecanismo de reacción entre el soporte y la proteína se basa en lo descrito por El-Ghaffar y cols. (2008). El proceso de inmovilización ocurre de manera covalente entre el quitosano, el agente reticulante que en el caso particular de esta tesis es el genipino y posteriormente los grupos amino libres de los aminoácidos de la superficie de la proteína. El grupo carbonilo del genipino realiza un ataque nucleofílico al grupo amino del quitosano, en esta reacción se libera  $H_2O$  y la reacción permite la formación del grupo nitrilo entre el quitosano y el grupo amina. El grupo  $OH^-$  del genipino ataca al grupo amino de la proteína y de esta manera se genera una alquilación resultando en una amina primaria que mantiene unida a la proteína al genipino y a su vez el genipino se mantiene reticulado con el quitosano.

Gao y cols. (2014) reportaron una cinética de BSA en un soporte magnético a base de  $Fe_2O_4$ . Usaron una concentración de 20 mg de soporte los cuales fueron añadidos a 10 mL de BSA a una concentración de 0.30 mg/mL. Ellos concluyeron que la adsorción es dependiente del tiempo, a mayor tiempo mayor cantidad de BSA es absorbida por el nanomaterial, además observaron cómo el proceso de fijación es relativamente rápido. La capacidad de adsorción incrementó rápidamente en los primeros 12 minutos alcanzando el equilibrio después de 15 minutos tendiendo como punto máximo cerca de 40 Q. Wang y cols. (2013) evaluaron la capacidad de absorción de BSA en un soporte durante un periodo de 180 minutos. En dicho experimento ellos reportan que el tiempo de absorción máximo de su soporte con la proteína fue de 30 minutos, la absorción fue lenta más sin embargo se mantuvo constante hasta el final de los 180 minutos siendo su concentración final de 135 Q. esto se debe principalmente al material que usaron ya que era de una estructura porosa y por lo tanto en dichas cavidades es donde la proteína se une con mayor afinidad y

fuerza y esto permitía que se mantuviera unida al soporte. Shen y cols. (2014) investigaron la capacidad de absorción de un de BSA al soporte con el que los trabajaron, esta metodología se desarrolló en un periodo de 180 minutos. La cantidad de BSA absorbida por el nanomaterial incremento a medida que el tiempo aumentaba llegando a 96.5 Q en un periodo de 45 minutos manteniendo esta concentración hasta el final del experimento, la alta concentración a la que ellos llegaron la atribuyen a la concentración inicial de BSA y por lo tanto esto derivo en mayores colisiones entre el soporte y el BSA.

## **6.3 Caracterización de las nanopartículas magnéticas enzimáticas (NME)**

### **6.3.1 Análisis FT-IR**

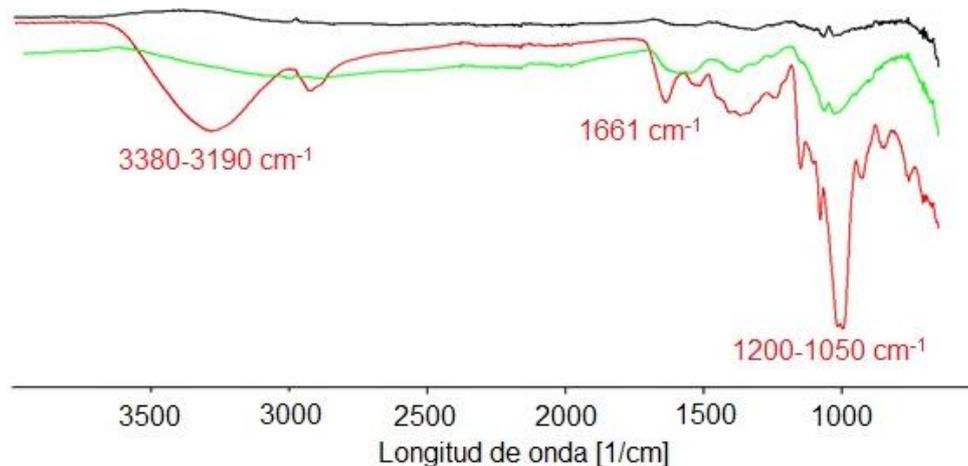


Figura 13. FT-IR del soporte libre (línea negra), enzima inmovilizada (línea verde) y enzima libre (línea roja).

El análisis de FT-IR de la  $\alpha$ -amilasa libre, el soporte y el soporte reticulado con la amilasa se muestra en la Figura 13. Los picos de la  $\alpha$ -amilasa que obtuvimos concuerdan con lo reportado Gallagher (1997) en su trabajo análisis FTIR de la estructura de una proteína, de manera puntual destacan los siguientes. Los picos correspondientes a la  $\alpha$ -amilasa libre (línea roja) presentan una banda amplia entre los 3380 y 3190  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde al estiramiento de los enlaces N-H de los N sustitutos de las amidas secundarias. El estiramiento de los enlaces C-H alifáticos se representan con la señal observada en la posición 2931  $\text{cm}^{-1}$ . Se muestra en la posición 1661  $\text{cm}^{-1}$  el estiramiento del enlace C=O del anión carboxilo y el grupo amida. Encontramos picos alrededor de los 1600 y 1500  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden a los enlaces C-C de los residuos aromáticos. Se exhibe una señal entre los 1200 y 1050  $\text{cm}^{-1}$  designada a los enlaces C-S de los grupos sulfidrilos (Ahmad y cols., 2014). El pico mencionado anteriormente es la señal de mayor importancia para corroborar la presencia de la enzima ya que las proteínas son moléculas capaces de presentar este tipo de enlaces debido a los aminoácidos metionina y cisteína los cuales presentan enlaces C-S dentro de sus estructuras. La intensidad de la señal en este intervalo nos indica que la presencia de este tipo de enlace C-S, es vasta. De igual manera se revisaron los picos más importantes sobre el análisis de FT-IR del soporte (línea negra). En la posición 2921  $\text{cm}^{-1}$ , el estiramiento corresponde a los enlaces C-H. A nivel de

1683  $\text{cm}^{-1}$  se aprecia una banda que pertenece al estiramiento del enlace del carbonilo, C=O, y la amida secundaria. El pico a nivel de 1531 corresponde al estiramiento de los enlaces N-H de los residuos N acetilados. Las lecturas de 1472 a 1315  $\text{cm}^{-1}$  provienen del estiramiento de los enlaces N-H de las amidas primarias y otros enlaces N-H del quitosano. El puente de oxígeno del éter cíclico, C-O-C, característico de la molécula del quitosano es reportado en los picos de 1064, 1031 y 863  $\text{cm}^{-1}$ . Para detectar la presencia de las sales de hierro se buscó y se confirmó su presencia con el estiramiento de los enlaces Fe-O en el rango de 580  $\text{cm}^{-1}$ . La intensidad de los picos mostrados en nuestro espectrograma es debido probablemente a la interacción con las sales de hierro que al interactuar con las moléculas de quitosano alteran las señales mostradas en el análisis FTIR. Sin embargo aún son apreciables y nos dan la información necesaria de la molécula de quitosano (Sankalia y cols., 2007). Al comparar las lecturas tanto de las  $\alpha$ -amilasa libre como la del soporte libre, nos damos cuenta que existe una mezcla de ambas señales, tanto de la  $\alpha$ -amilasa como del soporte. Algunos picos se hacen menos pronunciados como los de la señal emitida por el enlace C-S (1200 a 1050  $\text{cm}^{-1}$ ) y la banda amplia presentada en la banda de los 3380 y 3190  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde a los enlaces N-H de los N sustitutos de las amidas secundarias, principalmente. Los puntos descritos anteriormente como los son enlaces C-H alifáticos, enlace C=O del anión carboxilo y el grupo amida y los enlaces C-C de los residuos aromáticos parecen interactuar con el soporte, aunque en menor medida. Estas señales no se observan tan alteradas como las mostradas por los enlaces C-S y enlaces N-H de los N sustitutos de las amidas secundarias. Lo anterior nos da la pauta para pensar que es con los grupos sulfidrilos y las amidas secundarias, de algunos aminoácidos, con los que interactúan el soporte en mayor medida que con el resto de la estructura de la  $\alpha$ -amilasa.

Ahmad y cols. (2014) analizaron mediante FT-IR una  $\alpha$ -amilasa libre proveniente de *Aspergillus oryzae*. El análisis del espectrofotograma muestra los picos de los enlaces N-H de los N sustitutos de las amidas secundarias, C-H alifáticos, enlace C=O del anión carboxilo y grupo amida. Presentan los enlaces C-C de

los residuos aromáticos y el pico pronunciado C–S de los grupos sulfidrilos. Por otra parte Singh y cols. (2013) determinaron, de igual manera, por medio de análisis de FT-IR, los picos de una muestra de  $\alpha$ -amilasa. El espectrograma muestra el estiramiento de los enlaces N-H de los N sustitutos de las amidas de la  $\alpha$ -amilasa, así como picos que se atribuyen al estiramiento de los enlaces C-H alifáticos. Muestran bandas que corresponden al estiramiento del enlace C-O del anión carboxilo del grupo amida, y picos que pertenecen al estiramiento del enlace C-C de los residuos aromáticos. Además, destacan la fuerte señal del enlace C-S perteneciente al estiramiento de los grupos sulfidrilos y disulfidrilos. Cakmakci y cols. (2012) mediante un análisis de FT-IR destacan los principales picos obtenidos del análisis de una  $\alpha$ -amilasa. Muestran una banda de absorción que corresponde a los grupos carbonilo y picos que son atribuibles a la vibración del doble enlace del C=C. Además destacan la señal que pertenece a la vibración del enlace S-H y los picos al estiramiento de los anillos simétricos y asimétricos respectivamente de los grupos epoxi. Se aprecian señales que corresponden a la vibración de los enlaces alifáticos C-H. Zhu y cols. (2010), en el análisis FT-IR de una muestra de quitosano obtienen un espectrograma en el cual resaltan los picos del estiramiento de los enlaces NH<sub>2</sub>, el estiramiento de los enlaces C-O-C. Aunado a esto, encuentran la presencia del pico asignado a la unión del grupo O-H y al N-H mediante un puente de hidrogeno. Este puente de hidrogeno confirma la unión entre el quitosano y los grupos Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Sankalia y cols. (2007), determinaron los picos de transmitancia de una muestra de quitosano mediante un análisis de FTIR. El espectrograma muestra el estiramiento de los enlaces C-H, el enlace del carbonilo C=O, y la amida secundaria. Destacan la vibración que corresponde a los N-H, residuos de N acetilados y los picos de los enlaces N-H de las amidas primarias y otros enlaces N-H del quitosano. El puente de oxígeno del éter cíclico, C-O-C es apreciado en el interferograma.

### **6.3.2 Termogravimetría (TGA)**

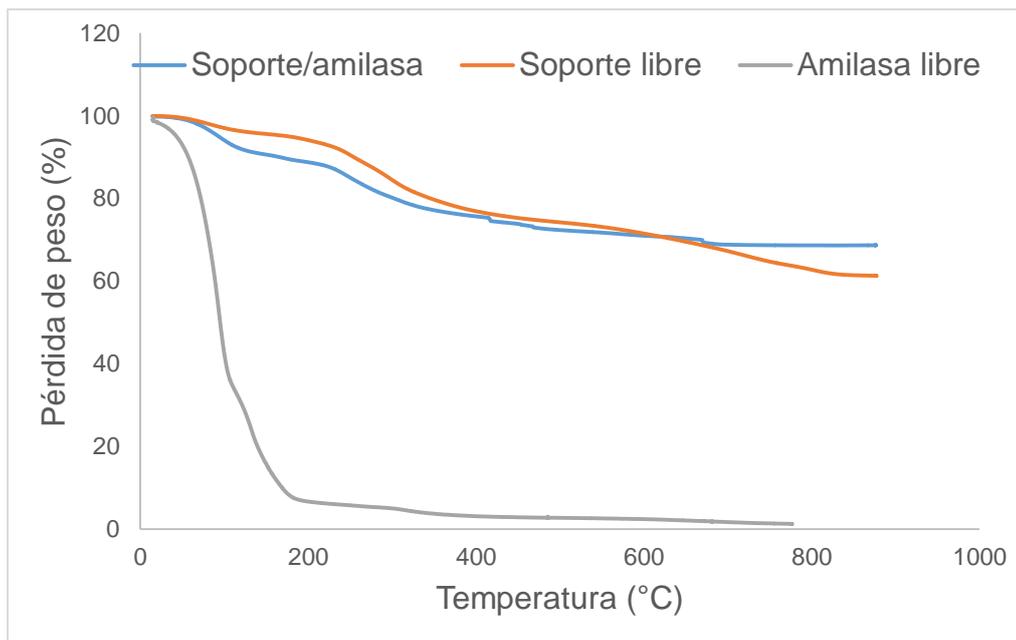


Figura 14. Análisis de pérdida de peso relativo (%) en un intervalo de temperatura de 0 °C a 877 °C (TGA) de soporte libre (línea azul),  $\alpha$ -amilasa inmovilizada (línea naranja) y  $\alpha$ -amilasa libre (línea gris).

El análisis de TGA muestra tres líneas en las cuales se pueden distinguir el soporte libre (línea azul), soporte con enzima inmovilizada (línea naranja) y enzima libre (línea gris) Figura 14. La enzima inmovilizada muestra una progresiva pérdida de peso, esto debido a que, conforme la temperatura aumenta se rompen gradualmente los enlaces entre las diversas moléculas que componen la enzima, se observan tres estadios de pérdida de peso, el primero a los 100 °C se perdió aproximadamente el 60 % del peso total, este puede ser debido a la evaporación de la molécula de agua. El segundo a los 180 °C se perdió el 90 % del peso total el cual es debido probablemente la degradación de las estructuras de los esqueletos de carbono que componen en gran medida la estructura de la enzima y el último estadio donde gradualmente se perdió el 10 % del peso total restante hasta los 790 °C, esta última pérdida de peso se debió a las estructuras orgánicas que restaban en la estructura de la enzima como pueden ser enlaces amida. En cuanto al soporte libre se podría distinguir dos fases de pérdida de peso donde el peso permanece estable hasta una pérdida

del 30 % del peso total del soporte a los 890 °C, esto significa que el soporte es térmicamente estable ya que hasta los 200 °C pierde tan solo un 10 % de su peso total. El quitosano dentro de su estructura exhibe enlaces similares a los de la enzima como enlaces C-H, C-N más sin embargo las sales de hierro les confieren estabilidad a los enlaces del quitosano. En cuanto a la inmovilización de la enzima se pierde un 40 % del peso total del híbrido, 10 % más que el soporte libre. Existe un punto en el que convergen el soporte libre y el híbrido que es aproximadamente a los 400 °C, en ese lapso de 0 a 400 °C pierde menos peso el híbrido que el soporte debido probablemente a que el híbrido tiene mayor masa que el soporte libre, pero muestra mayor estabilidad que la enzima libre. El hecho de que este híbrido no muestre una curva similar a la enzima libre no quiere decir que el soporte le confiere estabilidad a los enlaces de la enzima, sino que más bien el peso perdido de la enzima no es significativo en comparación al peso del soporte. Swarnalatha y cols. (2013) realizaron un análisis de TGA a un soporte sintetizado para inmovilizar una amilasa hecho a base de *Guma acaccia*. En sus resultados muestran que el soporte a los 100 °C tiene una menor pérdida de peso en comparación con la enzima libre, ellos concluyen que la diferencia de peso entre el soporte con la enzima inmovilizada y la enzima libre es del 54 % de peso. Al comparar los resultados presentados por lo reportado por Swarnalatha y cols. (2013) muestran una tendencia similar los soportes y las enzimas libres, en nuestro caso la pérdida de peso en la enzima fue mayor llegando casi a 0 % del peso total pero la tendencia de soporte con la enzima inmovilizada es similar. Singh y cols. (2012) analizaron mediante TGA la unión de amilasa en un soporte de inmovilización y su análisis reveló que el híbrido fue térmicamente estable ya que solo hubo dos fases en las que su soporte con la enzima inmovilizada perdió peso. El primero fue al alcanzar los 200 °C donde solamente se observó una pérdida de entre el 10 % y 11 % el cual es debido probablemente a la unión entre el agua y el solvente en el cual se llevó a cabo la reacción. La segunda fase de pérdida de peso se determinó a los 600 °C en la cual perdió aproximadamente el 10.48 % debido probablemente a algunos enlaces del propio soporte. Singh y cols. (2011) evaluaron mediante un análisis TEM un soporte a base de sílica en el cual

inmovilizaron una  $\alpha$ -amilasa. Dicho análisis se llevó a cabo en un intervalo de temperatura de 25-800 °C bajo una atmosfera de nitrógeno. Dentro de sus resultados muestran que el híbrido de la enzima inmovilizada y el soporte son estables térmicamente ya que solo exhiben una pérdida del 5 % de su peso total debido a los enlaces con la molécula del agua, seguidamente hubo otra pérdida de peso que llegó al 6 % de la pérdida total de peso a los 800 °C debido a los residuos orgánicos del nanomaterial.

### 6.3.3 Caracterización de la morfología del soporte quitosano-genipino

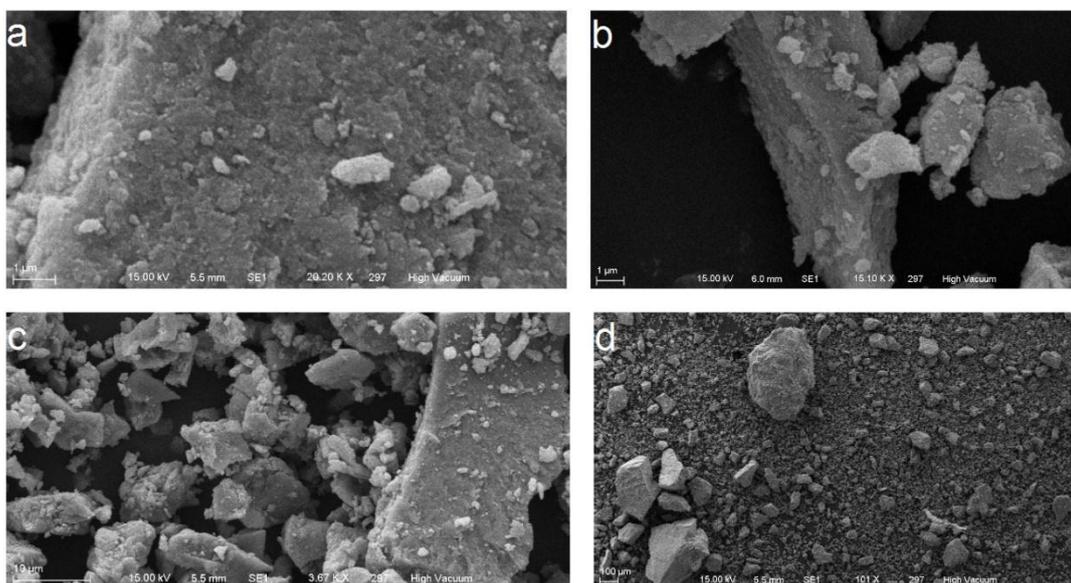


Figura 15. Imágenes SEM de soporte de quitosano y sales de  $F_2O_3$ .

Se obtuvieron imágenes del soporte de quitosano con las sales de hierro por medio de micrografía electrónica de barrido. Las imágenes muestran que el soporte posee una serie de relieves dentro de su estructura. En la Figura 15, con un acercamiento a 100 y 10  $\mu m$  aparenta tener una superficie lisa más sin embargo en el acercamiento a 1  $\mu m$  se observa una superficie áspera y rugosa. Los bordes y la forma irregular de las estructuras mostradas en la imagen nos manifiestan que no se tratan de nanopartículas esféricas sino de nanopartículas irregulares. La topografía mostrada por el soporte nos sugiere

que es en los bordes y la superficie con características ásperas donde la proteína se une con facilidad debido a las hendiduras que encuentra en el soporte (Rana y cols., 2014, Fan y cols., 2012). Singh y cols. (2012) obtuvieron micrografías de un soporte compuesto de un híbrido de celulosa recubierta de partículas de plata con silica. Sus imágenes indican que su material tiene capas y por lo tanto no se muestran las nanopartículas embebidas dentro del soporte. Singh y cols. (2014) desarrollaron un soporte híbrido a base de carboximetilcelulosa, gelatina y silica. Las micrografías que obtuvieron de este soporte muestran que el híbrido presenta una superficie en capas adherida a la gelatina. La gelatina es un adherente natural y la estructura en capas le ofrece al híbrido una mayor adhesión de la proteína a este. Rana y cols. (2014) revelaron micrografías de microesferas de quitosano. En sus imágenes observaron la irregularidad esférica con un tamaño de esfera de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ , además las imágenes muestran pequeñas depresiones en la superficie del polimaterial lo cual permite la absorción en la superficie del material. Fan y cols. (2012) desarrollaron un soporte a base de quitosano. En sus fotografías se aprecia que el soporte tiene forma de hoja, amplio espesor, superficie lisa y borde áspero. Estas características topográficas le dan la habilidad al soporte de poder unir la proteína a su superficie y mantener la retención de la misma.

#### **6.3.4 Potencial Z**

El potencial Z se obtuvo resuspendiendo las muestras de la amilasa libre, el soporte libre y la enzima inmovilizada en el soporte en etanol en una concentración 0.1 g/L. Para la amilasa libre, el soporte libre y la amilasa inmovilizada se obtuvieron valores de -9.47 mV, -11.52 mV y -6.00 mV respectivamente. El potencial Z representa la carga de la superficie que se produce en presencia de una solución acuosa cuando los grupos funcionales se disocian en la superficie o absorben iones sobre la superficie a partir de la solución. (Arunkumar y cols., 2013) El desarrollo de una carga neta en la superficie de las partículas afecta a la distribución de los iones en la región interfacial que la rodea, lo que resulta en un aumento de la concentración de contra iones cerca de la superficie. La capa de líquido que rodea la partícula se

compone de una región interior denominada capa Stern y una región externa llamada capa difusa (Cai y cols., 2011). La doble capa eléctrica se compone de la capa de Stern y la capa difusa. En la capa de Stern, los iones están fuertemente unidos a la superficie de las partículas, en la capa difusa los iones están unidos con menos fuerza. Dentro de la capa difusa hay un límite imaginario y los iones que se encuentren dentro de este límite se moverán con partículas cuando se mueve en el líquido; pero los iones fuera de los límites permanecerán en el límite denominado el plano de deslizamiento (Arunkumar y cols., 2013). La amilasa con el soporte desarrollado en esta tesis puede caer dentro de la clasificación de los hidrocoloides. Los hidrocoloides por lo general se estabilizan mediante la fuerza repulsiva. Las interacciones electrostáticas entre el mismo tipo de partículas de las cargas iónicas se repelen entre sí y por lo tanto existe estabilidad de la dispersión (Cai y cols., 2011). Los resultados sobre el potencial Z de la enzima inmovilizada al ser negativos predicen la estabilidad de la amilasa con el soporte. Un valor negativo indica que la amilasa reduce los iones del  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  (Arunkumar y cols., 2013). Además. Esta carga negativa del potencial Z indica la asociación de la amilasa con el soporte debido a la reducción de repulsión de cargas (Reye y cols., 2011). El potencial Z es una medida de la magnitud de las interacciones electrostáticas entre las cargas de la enzima y el soporte. Arunkumar y cols. (2013) obtuvieron una distribución de potencial zeta de la preparación de amilasa con el soporte de oro fue de -17,07 mV. La distribución de carga superficial del soporte y la amilasa muestra un valor negativo, lo que confirma el papel de proteínas en la reducción de los iones de oro.

#### **6.4 Determinación del grado de reticulación**

La Figura 5 representa la curva estándar obtenida para determinar la concentración de glicina libre en la superficie de la enzima. Para obtener la curva se disolvió BSA en una concentración de 0.1 g/mL, 50  $\mu\text{g}$  de soporte y 500  $\mu\text{L}$  de ninhidrina y 500  $\mu\text{L}$  de agua destilada. La curva estándar para el cálculo de la concentración de glicina equivalente (Figura 5) muestra un coeficiente de correlación fue de 0.994 y el coeficiente de extinción molar fue de 0.0662  $\text{M cm}^{-1}$

1. El coeficiente de extinción molar es representado por la pendiente y además es un parámetro para indicar la fuerza con la que una sustancia absorbe la luz a una determinada onda (West y cols., 1975). La cantidad de los grupos amino libre en la muestra de prueba después de calentar con ninhidrina, es proporcional a la absorbancia óptica de la solución. El valor obtenido fue de 0.129  $\mu\text{mol/}$  gramo de soporte, lo cual nos indica la presencia de grupos amino libres en la muestra. Los valores oscilan desde 0 hasta 0.3  $\mu\text{mol/g}$  pero esto depende de la naturaleza del material (Karhaman y cols., 2007).

La interacción entre la ninhidrina y los aminoácidos de la proteína se desarrolla de acuerdo al siguiente mecanismo de reacción. El grupo amino interactúa con el grupo carbonilo de la ninhidrina por medio de una reacción de desaminación oxidativa para remover dos hidrógenos del aminoácido y producir un alfa iminoácido, simultáneamente la ninhidrina original es reducida y pierde un oxígeno con la formación de una molécula de agua. El grupo NH del alfa iminoácido es rápidamente hidrolizado para formar un alfa cetoácido con la producción de una molécula de amoníaco. Este alfa cetoácido además sufre una reacción de descarboxilación bajo condiciones de calor para formar un aldehído que tendrá un átomo de carbono menos que el aminoácido original. Aquí se produce una molécula de dióxido de carbono. En este proceso se redujo la ninhidrina y el amoníaco los cuales son requeridos para la producción de color púrpura (Hwang y cols., 1975).

Kuo y cols. (2012) evaluaron la cantidad de grupos amino en un soporte a base de quitosano. El valor que encontraron de amino en el soporte fue de 0.11  $\mu\text{mol/g}$  de soporte. Kuo y cols. (2013) determinaron la cantidad de grupos amino unidos a un soporte a base de polivinilideno para inmovilizar una lipasa. La prueba confirmó la presencia de grupos amino en el soporte con un valor de 0.25  $\mu\text{mol/}$  g de soporte. Borowska y cols. (2013) evaluaron la cantidad de grupos amino en tres soportes diferentes a base de quitosano, la diferencia entre cada uno de estos soportes radica en la cantidad de quitosano empleado, es decir, aumentaba la concentración de quitosano. La cantidad de grupos

amino encontrados en la muestra fue de 3.73  $\mu\text{mol/g}$  para el soporte CS–PQ(1:0), 2.5  $\mu\text{mol/g}$  para el soporte CS–PQ (1:1) y 0.7  $\mu\text{mol/g}$  para el soporte CS–PQ (1:5).

La lisina que es un aminoácido muy común en las proteínas y se utiliza como punto de unión covalente pues se encuentra en la superficie de las proteínas. Debido a que es relativamente reactivo con los soportes y por lo tanto favorece la estabilidad de la enzima con el soporte, es uno de los principales aminoácidos en los que se basa la inmovilización enzimática (Krenkova y Foret, 2004). En la Figura 6 se muestra las lisinas presentes en la amilasa y la amilasa en su estructura completa. Existen un total de 12 lisinas en la amilasa de las cuales 10 se encuentran en la superficie y por lo tanto existen 10 puntos potenciales de anclaje diferentes en esta proteína (Figura 16).

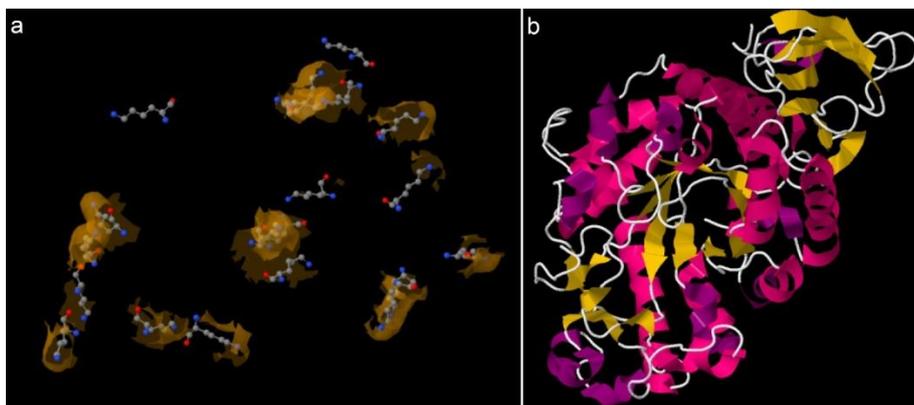


Figura 16. Lisinas en la superficie de la amilasa (a) y amilasa en su estructura completa (b).

### 6.5 pH óptimo de la $\alpha$ -amilasa

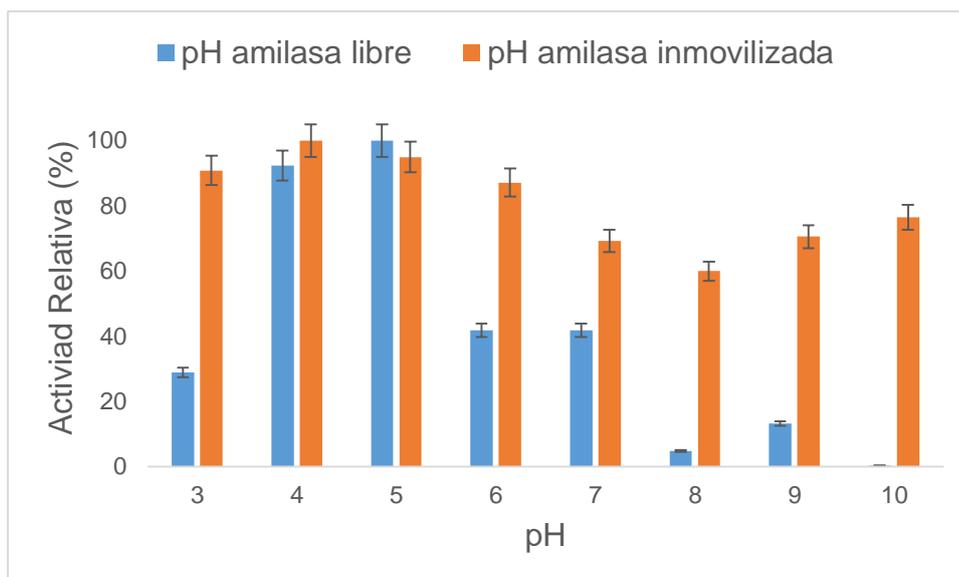


Figura 17. pH óptimo de  $\alpha$ -amilasa libre e inmovilizada.

Se determinó el valor de pH óptimo de la  $\alpha$ -amilasa en un intervalo de 3 a 10 de pH, usando almidón como sustrato al 1 %, una temperatura de 50 °C y un tiempo de reacción de 10 minutos. En la Figura 17 se observa el valor máximo para el pH óptimo de la enzima libre (azul) como de la inmovilizada (naranja). El valor óptimo de pH se muestra en la Figura 17. En los resultados para el pH óptimo de la enzima libre se aprecia que en pH 5 es donde se obtiene la actividad relativa máxima de 100 % (3.40 U/g de enzima) y solamente en pH 4.0 el valor disminuye hasta un 7.72 %. En los otros puntos de pH evaluados la actividad relativa no superó el 40 % de actividad relativa determinando incluso en pH 10.0 una actividad relativa de 0.38 %. Por lo tanto, la amilasa con la que se trabajó en esta tesis presenta una actividad óptima de pH de 5.0. En la misma Figura 6 se muestran los resultados obtenidos para el pH óptimo de la enzima inmovilizada, usando almidón al 1 %, una temperatura de 40 °C, ya que fue en esa temperatura donde se obtuvo la actividad óptima de la enzima libre, y un tiempo de reacción de 10 min. La enzima libre como se mostró anteriormente presenta un punto máximo de actividad a pH 5.0. Al inmovilizar la enzima la actividad máxima resultó en pH 4.0 (2.37 U/g de soporte). En pH 5.0 solo bajo 6 % con respecto al valor de pH 4.0, la diferencia entre estos dos puntos es

mínima por lo que la inmovilización tiene mayor eficacia en estos dos valores comparados con los otros puntos sometidos a evaluación. La actividad relativa de la escala evaluada descartando el valor máximo, se mantiene entre el 94.93 %, perteneciente al valor de pH 5, y 59.94 %, perteneciente al valor de pH 8.0. Esto quiere decir que la actividad relativa de la inmovilización tan solo disminuye un 40.06 %. La inmovilización de la enzima en el soporte que desarrollamos en esta tesis, le dio la cualidad a la enzima de trabajar fuera de sus límites de pH pudiendo incluso encontrar actividad enzimática en intervalos de pH de 9.0 y 10.0, los cuales son puntos de alta alcalinidad.

La concentración de  $H^+$  afecta la velocidad de la reacción en muchas formas. Primero el proceso catalítico usualmente requiere que la enzima y el sustrato tengan grupos químicos en una forma iónica particular para poder interactuar (Lehninger, 2015). Por ejemplo la actividad catalítica puede necesitar a un grupo amino, por ejemplo que se encuentre en estado protonado ( $-NH_3^+$ ) o no protonado ( $-NH_2$ ), el pH modifica este estado y por tanto a la velocidad de la reacción. pH's extremos pueden ocasionar la desnaturalización de las enzimas, debido a que la estructura con estos cambios es posible modificar las interacciones iónicas que intervienen en la estabilidad de la enzima en su estado nativo (Devlin, 2013). Si el pH tiene un valor ácido (concentración de protones alta), el carboxilo tiende a pasar de la forma disociada ( $-COO^-$ ), a la forma protonada ( $-COOH$ ), con esto pierde la carga negativa que tenía y ya no puede ser atraído por un  $NH_3$ . Si esto ocurre dentro de una cadena polipeptídica, se va a producir un cambio de conformación, pues ahora uno o varios dominios de la proteína quedan en libertad para adoptar otra configuración. En un medio alcalino, la tendencia de los iones es a estar en la forma menos protonada posible, o sea que un  $NH_3^+$  pasa a la forma  $NH_2$ , que no tiene carga. Los cambios de pH hacia el intervalo alcalino o ácido pueden provocar la desnaturalización de una proteína (Lehninger, 2015).

Cakmakci y cols. (2012) investigaron el efecto del pH en una  $\alpha$ -amilasa inmovilizada, procedente de páncreas porcino, en un soporte magnético de

características similares a las presentadas por nosotros, dentro de un intervalo de 5.0 a 8.0 de pH. Evaluaron la actividad de la amilasa usando almidón como sustrato al 1 %, una temperatura de 30 °C y un tiempo de reacción de 10 min. La actividad máxima que ellos observaron en la enzima libre la obtuvieron en pH 6.5 más sin embargo para la enzima inmovilizada obtuvieron un valor máximo de pH 5.5, la estabilidad de la enzima no se mantiene, sino que sigue una cinética similar a la de la enzima libre. Singh y cols. (2013), inmovilizaron una  $\alpha$ -amilasa usando como soporte de inmovilización un polivinilpolianilín con glutaraldehído, en el cual encontraron que la actividad óptima fue a un pH 7.0 en una escala de 5.0 a 9.0 de pH, su inmovilización carece de estabilidad ya que tanto a valores menores como lo son 5.0 y 6.0 la actividad es mucho menor del 40 % así como en valores mayores como lo son 8.0 y 9.0 en la escala de pH. Khan y cols. (2014) inmovilizaron una  $\alpha$ -amilasa y esta presentó cambios en su perfil de pH al ser comparada con su contraparte inmovilizada. La inmovilización retuvo en un 61 % la actividad de la enzima en pH 8.0 cuando en su contraparte retuvo solamente el 40 % de actividad bajo las mismas condiciones experimentales.

Aunque no fue el único valor en el que la actividad se retuvo por más del 60 % ya que en los otros valores la actividad incrementó comparada con la enzima libre. La estabilidad de la  $\alpha$ -amilasa inmovilizada se debe a la unión con el nanosopORTE que ellos desarrollaron. Cakmakci y cols. (2014) inmovilizaron una  $\alpha$ -amilasa en un soporte diferente al que desarrollaron en 2012. La inmovilización dio como resultado un pH óptimo en el valor de 4.0, el valor óptimo cambió a un nivel de ácidos comparado con los trabajos antes reportados, más sin embargo en los otros valores evaluados, ninguno de ellos supera el 80 % de actividad relativa, aun con la inmovilización la enzima muestra un comportamiento similar a la enzima libre donde va de menor a mayor actividad y vuelve a caer a un bajo porcentaje de actividad relativa. Sahnoun y cols. (2014) determinaron el valor de pH óptimo para dos isoformas de la  $\alpha$ -amilasa de una cepa de *Apergillus oryze*, usando almidón como sustrato al 1 %. Los valores máximos para ambas isoformas oscilan entre pH 5.0 y pH

6.0, muestran una tendencia similar a la de campana, teniendo como máximo solo un punto y no un intervalo amplio de actividad.

Esto sugiere que las amilasas compradas en ambos trabajos siguen un comportamiento similar. La máxima actividad es alcanzada solamente a un pH de 5.0, valores más bajos o incluso más altos resultan en menor actividad ya que concentraciones altas de  $H^+$  como de  $OH^-$  terminan por desnaturalizar y alterar las estructuras terciarias de las proteínas. Khan y cols. (2014) evaluaron el pH óptimo para la hidrólisis del almidón de una  $\alpha$ -amilasa en un intervalo de pH de 4.0 a 8.0. Encontraron que el pH óptimo para la hidrólisis del almidón fue de pH 6.0, para el valor de pH 5.0 la actividad relativa se mantuvo cerca del 80 % y los valores restantes presentaron una actividad menor al 60 % siendo pH 8 el que obtuvo la menor actividad relativa comparada con los otros valores. Tanto en pH ácidos como alcalinos la enzima mostro una pérdida significativa de su actividad debido a la desnaturalización por el medio en el que se encontraba disuelta. Cakmakci y cols. (2014) usando de igual manera una  $\alpha$ -amilasa, evaluaron la actividad de la enzima libre en un intervalo de 3.0 a 8.0 de pH y encontraron que la actividad máxima para le enzima libre fue de pH 6.5. Dentro del intervalo de pH al que ellos evaluaron la actividad de la  $\alpha$ -amilasa, solo es en pH 6.0 donde encuentran un porcentaje de 80 %, para los otros pH's evaluados el porcentaje de actividad se encuentra por debajo del 80 % siendo nuevamente pH 8.0 el punto donde se observó la menor actividad, nuevamente como es de esperarse, el comportamiento de la enzima sigue una cinética similar a lo ya reportado en la literatura donde se observa cómo va aumentando la actividad y al llegar al punto máximo se presenta el declive posterior de la actividad enzimática debido, como ya se ha mencionado anteriormente a la desnaturalización enzimática a la que es sometida la  $\alpha$ -amilasa.

## **6.6 Temperatura óptima de la $\alpha$ -amilasa**

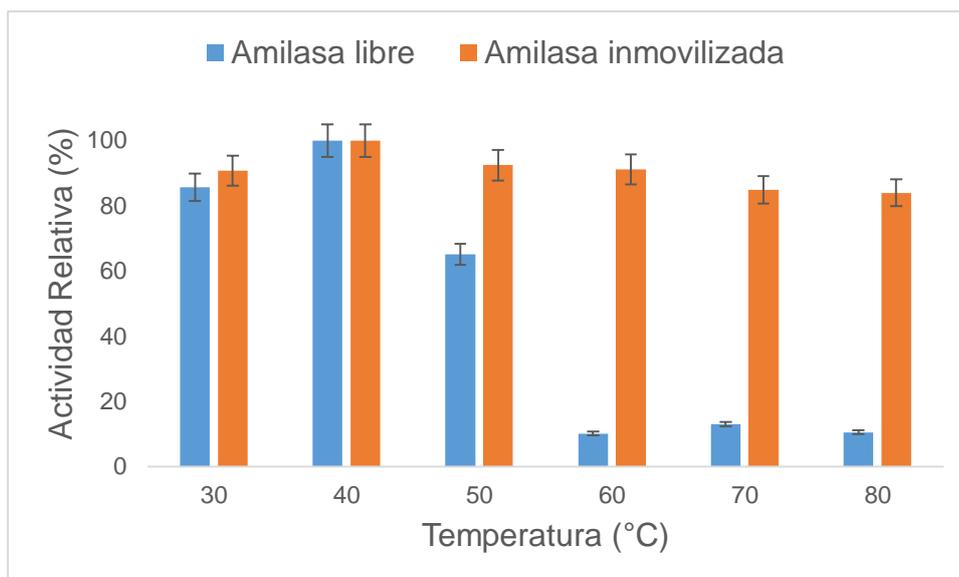


Figura 18. Temperatura óptima de  $\alpha$ -amilasa libre e inmovilizada.

Se evaluó la actividad de la enzima libre e inmovilizada en un intervalo de temperatura de 30 °C a 80 °C, usando almidón al 1 % y un tiempo de reacción de 10 minutos y pH 5 ya que ese fue el valor en el que encontramos mayor actividad. En la Figura 18 se observa el valor máximo para la temperatura óptima de la enzima libre (azul) como de la inmovilizada (naranja). La Figura 18 muestra una actividad máxima a los 40 °C (5.79 U/g de proteína) para la enzima libre disminuyendo un 40 % en 50 °C y manteniendo una actividad relativa del 10 % en 60 °C, 70 °C y 80 °C, sufre una tendencia similar como con el pH donde cae bruscamente la actividad relativa de la enzima en los puntos posteriores a la actividad máxima. Temperaturas mayores a esta reducen ampliamente su actividad debido al proceso de desnaturalización que sufren las enzimas (Leningher, 2015). En la inmovilización se muestra como al igual que en la enzima, se presenta un óptimo de trabajo a los 40 °C (2.59 U/g de soporte) pero, la actividad relativa se mantiene por encima del 80 % a medida que aumenta la temperatura incluso en los 80 °C donde debido a la temperatura tan alta la desnaturalización enzimática es inevitable. Más sin embargo nuestros resultados muestran como al inmovilizar la enzima en el soporte, esta es capaz de soportar parcialmente la desnaturalización enzimática causada por las altas temperaturas (Singh y cols., 2013). Cuando las moléculas son sometidas a la

energía calorífica, aumenta su energía cinética. Por otro lado, la conformación nativa de una proteína es adoptada debido a que es la que representa el mínimo estado de energía. Cuando se energiza, la cadena polipeptídica comienza a vibrar y llega un momento en que tiene la energía suficiente para superar las fuerzas de atracción que mantenían algunas partes en una relación espacial determinada, con lo que el polipéptido adopta una configuración al azar (Voet, 2010).

Sahnoun y cols. (2014) determinaron el efecto de la temperatura en la actividad de la  $\alpha$ -amilasa. Evaluaron la actividad relativa al valor ya conocido de pH 5.6 a la que ellos obtuvieron mayor actividad, en un intervalo de 30 a 80 °C determinaron la actividad relativa y obtuvieron una temperatura de 50 °C como temperatura óptima aunque se aprecia que en un intervalo de 40 a 50 °C la actividad relativa no parece tener mayor diferencia que de un 5 % con respecto a las otras temperaturas donde claramente se observa la caída en la actividad de la enzima donde se muestra que después de los 50 °C cae en más del 50 % su actividad relativa. Khan y cols. (2014) encontraron que la temperatura óptima de una  $\alpha$ -amilasa fue de 50 °C en un intervalo de 30 a 80 °C. Para los valores superiores como inferiores a la temperatura óptima, no se alcanzó más allá del 80 % de actividad relativa siendo la temperatura de 80 °C en la que se obtuvo menor actividad comparada con los otros valores de temperatura. La temperatura juega un papel importante en la estabilidad de la actividad de la enzima ya que al igual que con el pH, es un parámetro importante para determinar la desnaturalización que sufre una enzima. Cakmakci y cols. (2014) en un trabajo posterior evaluaron la temperatura óptima nuevamente de una  $\alpha$ -amilasa. La actividad fue evaluada en un intervalo de 15 a 80 °C donde reportaron que el máximo de actividad fue encontrado en 30 °C. En el punto de los 40 °C se observa que baja muy poco la actividad de la enzima sin embargo, solo es en este punto donde se aprecia dicho comportamiento ya que en las temperaturas de 15, 50, 60 y 70 °C la actividad cae debajo del 60 % e incluso llega a un punto de alrededor del 5 % en temperaturas de 80 °C. El comportamiento de la enzima es similar a trabajos ya reportados anteriormente,

aunque si bien no todos concuerdan con la misma temperatura pero exhiben una tendencia parecida. Cakmakci y cols. (2012) de igual manera evaluaron la actividad de trabajo de la  $\alpha$ -amilasa en un intervalo de temperatura de 15 a 80 °C, donde la temperatura optima de la enzima libre fue de 30 °C disminuyendo considerablemente su actividad después de los 50 °C alcanzando un punto mínimo a los 80 °C, comparado con la inmovilización enzimática el punto óptimo a donde alcanzan mayor actividad es a 50 °C pero se mantiene por debajo de 60 % en las otras temperaturas por lo que la inmovilización sigue un comportamiento similar al de la enzima libre. Singh y cols. (2013) inmovilizaron una  $\alpha$ -amilasa en un soporte de polivinilpolianilín con glutaraldehído, encontrando una temperatura optima de 25 °C, usaron condiciones experimentales de 1 % de almidón, pH 7 y un intervalo de temperatura de 20, 25, 30 y 35 °C. La temperatura de 20 °C es la única que no rebasa el 50 % de actividad relativa, las siguientes temperaturas que son 30 y 35 están por debajo del 40 % de actividad relativa, estos resultados no muestran estabilidad a la inmovilización, sino que se comportan de manera similar a la enzima libre teniendo solo un punto óptimo de actividad y en intervalos superiores o inferiores pierde actividad de la enzima. Khan y cols. (2014) inmovilizaron una  $\alpha$ -amilasa en un intervalo de 30 a 80 °C. Su temperatura optima de inmovilización la encontraron a los 50 °C, aunque no fue estable en gran medida la inmovilización ya que si bien en temperaturas superiores a los 50 °C la actividad de la enzima se mantenía por encima del 60 % llegando incluso al 80 % de actividad relativa. En temperaturas inferiores a temperatura optima, la actividad se encontraba en valores cercanos al 40 % de actividad relativa. La inmovilización diseñada por ellos solo es eficiente a temperaturas superiores a la óptima pero deficiente a temperaturas inferiores. Cakmakci y cols. (2014) evaluaron la temperatura óptima de una  $\alpha$ -amilasa inmovilizada. Encontraron una temperatura óptima de 50 °C, en comparación con la enzima libre que de igual manera se analizó. La temperatura optima cambio pero esto se atribuye al cambio conformacional que sufrió la enzima por la unión al soporte. A medida que la temperatura aumenta, la actividad de la enzima disminuye gradualmente y al igual que con la enzima libre, en 80 °C es donde se observa la menor

actividad enzimática aunque ahora reteniendo el 60 % de la actividad de trabajo, aunque sigue una cinética de actividad muy parecida a la de la enzima libre esta retención del 60 % es un aspecto positivo ya que en la inmovilización eso es lo que se busca, la retención de actividad por parte de la enzima inmovilizada.

### **6.6.1 Coeficiente de temperatura (Q10)**

El efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción se midió en términos del cociente de temperatura (Q10). Para ello se calculó Q10 con la ecuación de Dixon y Webb (Eyring y cols., 1939). Usando la ecuación de Dixon y Webb los valores de Q10 para la enzima libre fue de 1.57 y el valor de Q10 para la enzima inmovilizada fue de 1.01. Un bajo Q10 como el que se muestra en esta tesis para la enzima inmovilizada, refleja que el cambio en la temperatura no tiene efecto significativo en la estructura terciaria de la enzima por sobre los 40 °C (Ghosh y cols., 2015). Esto concuerda con los resultados mostrados en la Figura 7 donde se observa que la actividad relativa de la amilasa por encima de los 40 °C no cae más allá del 80 %. Por otra parte, en la misma figura se aprecia como la enzima libre pierde actividad por encima de los 40 °C lo cual se relaciona con su valor de Q10. Lo que indica que además de la temperatura intervienen otros factores que alteran su estructura terciaria y por lo tanto esta alteración se refleja en su pérdida de actividad. Los valores de Q10 se usan para inferir si las reacciones metabólicas examinadas son controladas por la temperatura o por algún otro factor. Generalmente las reacciones enzimáticas muestran valores de Q10 de entre 1 y 2 y cualquier desviación de este valor es indicio de la participación de algún otro factor ajeno a la temperatura en el control de la velocidad de reacción (Shing y Chhatpar 2011). Samantha y cols. (2014) determinaron el Q10 de una  $\alpha$ -amilasa, encontrando un valor de 1.0 para Q10 en un intervalo de temperaturas desde 30 °C a 100 °C. Rath y cols. (2012) evaluaron el efecto de la temperatura en un intervalo de 20 °C a 100 °C sobre una  $\alpha$ -amilasa soluble e inmovilizada. Para cada una de ellas encontraron un valor de Q10 de 1.85 y 1.19 respectivamente. Parashar y Satyanarayana. (2016) calcularon el Q10 para una amilasa nativa y una quimérica. El valor presentado por ellos para el Q10 fue de 1.69 y 1.29 respectivamente.

## 6.7 Parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos fueron determinados mediante la ecuación de Lineweaver-Burk. El valor de  $V_{max}$  para la  $\alpha$ -amilasa libre y la  $\alpha$ -amilasa inmovilizada fue de 21.89 mol/(ml\*min) y 7.46 mol/(ml\*min) respectivamente. El valor para  $K_m$  de la  $\alpha$ -amilasa libre y de la  $\alpha$ -amilasa inmovilizada fue de 5.40 mg/ml y 1.46 mg/ml respectivamente. Se determinó el valor para  $K_{cat}$  el cual corresponde a 4.37  $\text{E}^4/\text{S}$  para la amilasa libre y 1.49  $\text{E}^4/\text{S}$  para la amilasa inmovilizada. Los valores de  $V_{max}$  muestran que el valor de  $V_{max}$  de la  $\alpha$ -amilasa libre es tres veces mayor que el de la  $\alpha$ -amilasa inmovilizada, lo cual indica que la  $\alpha$ -amilasa libre cataliza con mayor rapidez y por lo tanto actúa como mejor biocatalizador de la hidrólisis del almidón (Swarnalatha y cols., 2013). De igual manera se aprecia como el valor de  $k_m$  para la  $\alpha$ -amilasa inmovilizada es cuatro veces menor que el  $K_m$  de la  $\alpha$ -amilasa libre. Este resultado indica que la afinidad por el sustrato de la enzima inmovilizada es mayor debido probablemente, al microambiente generado por el soporte el cual altera la estructura terciaria de la  $\alpha$ -amilasa inmovilizada. Generando con esto, que probablemente el sitio activo este más expuesto al sustrato (Swarnalatha y cols., 2013). Un alto valor de  $K_{cat}$  y un bajo valor de  $K_m$ , son indicativos de la eficiencia de la enzima (Xie 2013). Estos resultados sugieren que la inmovilización altera la estructura terciaria de la  $\alpha$ -amilasa perdiendo rapidez en cuanto a la catálisis, pero ganando afinidad de la amilasa hacia su sustrato. El valor de  $K_m$  para una enzima nos da una idea sobre la afinidad de la enzima por el sustrato mientras que, por otro lado, el valor de  $V_{max}$  provee información acerca del intervalo máximo de la reacción de la enzima cuando la enzima es saturada por el sustrato (Shin y cols., 2011). Cakmakci y cols., 2012 obtuvieron los valores de  $V_{max}$  y  $K_m$  de una amilasa libre y una amilasa inmovilizada. Los valores de  $V_{max}$  de la enzima libre y la enzima inmovilizada corresponden a 10 mg/(mlmin) y 0.042 mg/(mlmin) respectivamente. Para el parámetro de  $K_m$  de la enzima libre fue de 0.55 mg/ml y el  $K_m$  de la enzima inmovilizada fue de 1.37 mg/ml. El  $K_m$  de la enzima inmovilizada es diferente de la de la enzima libre debido a limitaciones difusionales, efectos estéricos y fuerza iónica. Los

resultados de la inmovilización demostraron que la afinidad de la amilasa por su sustrato se redujo durante la inmovilización. Cakmakci y cols. (2014), calcularon las propiedades catalíticas de la enzima libre y de la enzima inmovilizada mediante la ecuación de Michaelis-Menten. El valor de  $K_m$  fue de 0.55 g/ml y 0.49 mg/ml para la amilasa libre y para la amilasa inmovilizada respectivamente. Los bajos valores de  $K_m$  muestran que la afinidad de la amilasa por el sustrato incremento durante la inmovilización. Los valores de  $V_{max}$  de la enzima libre y de la enzima inmovilizada fueron de 10 mg/(mlmin) y 0.11 mg/(mlmin) respectivamente. La diferencia entre los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  tanto de la amilasa libre como de la amilasa inmovilizada se deben probablemente a las limitaciones de difusión y de la membrana de inmovilización. Ernest y cols. (2012) determinaron los parámetros cinéticos de una amilasa inmovilizada y una amilasa soluble. Obtuvieron un  $K_m$  de 23.50 mg/ml y 33.62 mg/ml. Para  $V_{max}$  obtuvieron 37.73 mg/(ml\*min) para la amilasa inmovilizada y 35.78 mg/(ml\*min) para la amilasa soluble. Los parámetros cinéticos de la enzima inmovilizada demuestran que la inmovilización aumenta la velocidad de reacción de la enzima y proyecta mayor afinidad a su sustrato.

### **6.7.1 Energía de activación**

La energía de activación ( $E_a$ ) de la amilasa libre como de la amilasa inmovilizada se determinó usando la ecuación de Arrhenius. Los valores resultantes mediante la ecuación mencionada indican que el valor de  $E_a$  para la amilasa libre es de 37.16 KJ/mol y  $E_a$  para la amilasa inmovilizada es de 1.37 KJ/mol. Al comparar ambas  $E_a$ , se observa que la  $E_a$  de la amilasa inmovilizada es un 96 % menor que su contraparte de la amilasa libre. Este bajo valor de  $E_a$  indica que el sitio activo es favorable para la formación del complejo enzima-sustrato y por lo tanto, la catálisis requiere menor energía (Singh y cols., 2011). La energía de activación es la cantidad de energía necesaria para alcanzar el estado de transición y de esta manera la reacción pueda ser llevada a cabo. Las enzimas disminuyen la energía de activación de una reacción química hasta un punto donde una baja cantidad de energía es suficiente para llevar a los reactantes a su estado de transición (Huma y cols., 2012). Rath y cols. (2012) determinaron

la energía de activación para una  $\alpha$ -amilasa soluble e inmovilizada, reportando un valor de  $E_a$  de 12.79 KJ/mol y 3.94 KJ/mol respectivamente. Parashar y Satyanarayana. (2016), determinaron la  $E_a$  de una amilasa nativa y una amilasa quimérica. El valor para  $E_a$  de la amilasa nativa fue de 38.3 KJ/mol y  $E_a$  de 50.12 KJ/mol para la amilasa quimérica. Ghosh y cols. (2015) calcularon la energía de activación de una  $\alpha$ -amilasa obteniendo una  $E_a$  de 14.13 KJ/mol.

### 6.8 Reusabilidad de la inmovilización

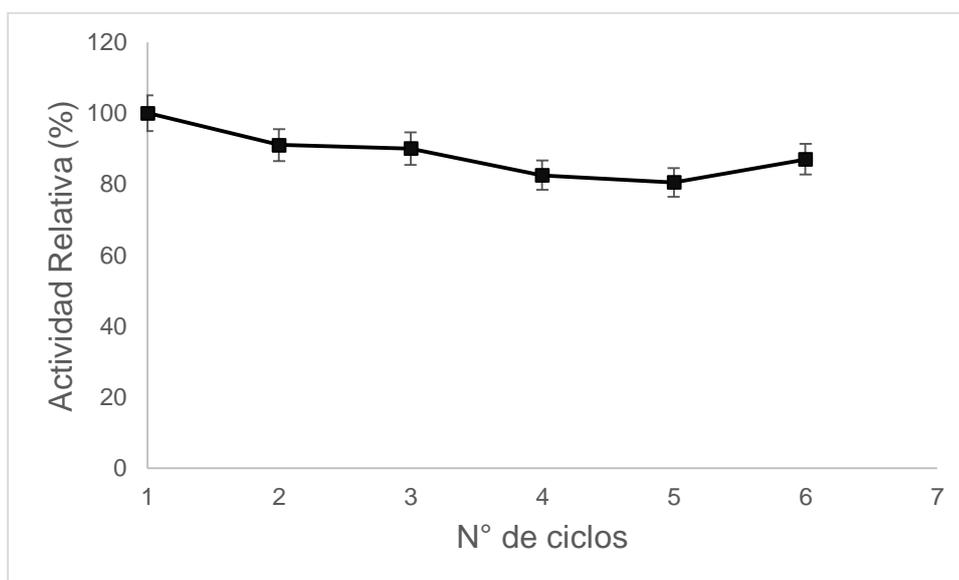


Figura 19. Ciclos de reuso de la  $\alpha$ -amilasa inmovilizada.

La gráfica de resultados generada por nuestro trabajo se muestra en la Figura 9. Para determinar los ciclos de reuso, en otras palabras, cuantas veces se podía reutilizar la enzima inmovilizada, se usaron las siguientes condiciones experimentales. En un medio de pH 5, ya que fue en ese pH donde encontramos mayor actividad de la inmovilización, 1 % de almidón, 40 °C y 6 ciclos de 10 minutos cada uno, terminado el ciclo descartamos el sobrenadante y agregamos nuevo sustrato y nuevo amortiguador. La figura 9 muestra una tendencia que desde el tercero hasta el sexto ciclo oscila entre el 90 y 80 % de actividad relativa. Estos resultados proponen que la inmovilización es estable al reuso y que la actividad no disminuye más allá del 80 %. Lo anterior indica que la fijación por coprecipitación resulta ser efectiva para la unión de la enzima

hacia el soporte ya que ésta, no se libera nuevamente hacia el medio. Cakmakci y cols. (2014) determinaron los ciclos de reuso de la  $\alpha$ -amilasa inmovilizada. Las condiciones que usaron fueron en pH 6, que fue donde ellos obtuvieron mayor actividad de la enzima inmovilizada, 1 % de almidón y 50 °C por 5 minutos por un lapso de 20 ciclos, al final de cada ciclo retiraban el sobrenadante y añadiendo nuevo sustrato y nuevo buffer. Sus resultados muestran que la actividad relativa de la enzima inmovilizada al final de los 20 ciclos oscilo alrededor de los 57.62 %, tomando en cuenta que cada ciclo duró un lapso de 5 minutos entonces el tiempo total de prueba fue de 100 minutos, se observa como la actividad de la enzima se pierde de forma paulatina hasta tomar una forma estable después del ciclo 17. Khan y cols. (2014) evaluaron los ciclos de reuso de su  $\alpha$ -amilasa inmovilizada en condiciones de 8 ciclos de 24 horas de duración cada uno y observaron que la actividad enzimática se mantuvo por encima del 90 % después de 4 ciclos y al finalizar el número de ciclos que fue 8, la actividad termino en un 77 %. Por lo tanto, el nanomaterial le confiere estabilidad a la estructura enzimática logrando que después de 8 días de almacenamiento la enzima sea aun activa en un 77 %. Cakmakci y cols. (2012) evaluaron los ciclos de reuso de una  $\alpha$ -amilasa inmovilizada durante 15 ciclos de 24 horas cada uno en a pH 6 y 50 °C. Dicha determinación muestra que al final del ciclo número 12, la actividad relativa fue de 76.52 % y se mantuvo hasta el final de los ciclos. La actividad solo se redujo un 23.48 % con respecto a la actividad inicial. El nanomaterial mantiene parcialmente rígida la enzima por lo que esta no se desnaturaliza por completo, sino que su sitio activo se mantiene estable.

## **7. CONCLUSIONES**

Se usó un total de 9.58 gramos de  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ , 3.28 gramos de  $\text{FeSO}_4$  y 1.02 gramos de quitosano para obtener una masa final en la reacción de 11.53 gramos. La cinética de absorción descrita en esta tesis para el soporte, indica que tiene una rápida fijación del mismo al cabo de 5 minutos ya que en ese tiempo fue absorbida el 100 % de la proteína. Aunque al pasar estos 5 minutos la proteína fue liberada nuevamente al medio. El análisis termogravimétrico mostró una caída en el peso total de la enzima y una estabilidad de soporte hasta los 890 °C. La amilasa con el soporte desarrollado cae dentro de la clasificación de los hidrocoloides. La amilasa libre mostró un pH óptimo de 5 (3.40 U/g de enzima). La actividad relativa de la enzima libre fue inversamente proporcional conforme el pH aumentaba. La inmovilización resultó ser más efectiva, pues si bien el punto máximo de actividad se alcanzó a pH 4 (2.37 U/g de soporte), la estabilidad de la actividad se mantuvo por encima del 80 % aun con el aumento del pH. Tanto enzima libre como inmovilizada obtuvieron un óptimo de temperatura a los 40 °C (5.79 U/g de proteína y 2.59 U/g de soporte). La enzima libre mostró una actividad inversamente proporcional a la temperatura mientras que la enzima inmovilizada permaneció estable y su actividad no cayó por más del 80 %. El coeficiente de temperatura de la inmovilización fue de 1.01 lo que refleja que la temperatura es el único factor que altera la enzima pero debido a la inmovilización, esta alteración es mínima en la estructura terciaria de la enzima. Es por eso que la actividad de la enzima se mantiene por encima del 80 %. Al mantener su actividad por encima del 80 % en condiciones ajenas a su óptimo, sugiere que la inmovilización resultó ser efectiva contra la desnaturalización. La desnaturalización se evitó de manera parcial, ya que se logra rescatar la cuarta parte de la actividad de la amilasa. Los parámetros cinéticos de  $K_m$  y  $V_{max}$  muestran que la inmovilización disminuye la velocidad de reacción, pero aumenta su constante de afinidad. Los valores tanto de pH como de temperatura de la enzima libre, son mayores que los mostrados por la inmovilización. Al disminuir la velocidad de reacción la enzima trabaja más lento, es menos eficiente, pero esto se compensa con el aumento de su  $K_m$ , por lo que la enzima es más afín hacia el sustrato. La energía de activación muestra que la inmovilización solo necesita 1.37 KJ/mol en

comparación con la enzima libre que necesita 37.16 KJ/mol.  $E_a$  y  $K_m$  indican la facilidad con la que la enzima se une al sustrato. La reusabilidad del soporte se mantuvo por sobre el 80 % de la actividad por un tiempo de una hora. En términos generales la inmovilización enzimática resulta ser un método viable cuando los sustratos se encuentran en medios donde los pH's y las temperaturas son inviables para la actividad de la enzima libre o no inmovilizada. La enzima inmovilizada mantuvo gran parte de su actividad aun en condiciones que resultan ser desfavorables para la catálisis como lo son pH's y temperaturas elevadas. La velocidad de la enzima para transformar el sustrato a producto se vio mermada. La afinidad hacia el sustrato compensa lo anterior puesto que se la enzima inmovilizada se volvió más afín hacia él y por lo tanto lo puede transformar en producto con una mayor facilidad. El decremento en la velocidad de la reacción se puede compensar dejando más tiempo la enzima con el sustrato, puesto que tiene mayor afinidad hacia el sustrato, y en teoría aprovecharía todo el sustrato.

## **8. BIBLIOGRAFÍA**

**Amaro** A, García BE, Vázquez DG, Amaya S, CastañoE, Guevara RG, Loera O, Regalado C. Homologue expression of a fungal endo-1,4- $\beta$ -D-xylanase using submerged and solid substrate fermentations. *Afr J Biotech.* **2011**;10:1760-1767.

**Ajay** Kumar Gupta, Mona Gupta. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *J Mol Biol.* **2005**;26:3995-4021.

**Bradford** MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **1976**;72:248-254.

**Bulte** JW, Douglas T, Mann S, Frankel RB, Moskowitz BM, Brooks RA, Baumgarner CD, Vymazal J, Strub MpP, Frank JA. Magnetoferritin: characterization of a novel superparamagnetic MR contrast agent. *Journal of magnetic resonance imaging.* **1994**;4:497-505.

**Chang** M, Juang R. Activities, stabilities, and reactions kinetics of three free and chitosan-clay composite immobilized enzymes. *Enzyme Microb Tech.* **2004**;36:75-82.

**Cai** Xuran, Yan Hong, Zhengbiao Gu, Yayuan Zhang. The effect of electrostatic interactions on pasting properties of potato starch/xanthan gum combinations. *J Food Int.* **2011**;44:3079-3086.

**Cakmakci** Emrah, Asli Beyler Cigil, Ozkan Danil, Serap Demir y Memet Vezir Kahraman. Immobilization of alpha-amylase on aminated polyimide membrane: Preparation, characterization, and properties. *J Starch.* **2014**;66:274-280.

**Cakmakci** Emrah Ozkan Danis, Serap Demir, Yusuf Mulazim y Memet Vezir Kahraman. Alpha-Amylase Immobilization on Epoxy Containing Thiol-Ene Photocurable Materials. *J Microbiol Biotechnol.* **2013**;23:205-210.

**Cao**, L., van Langen, L., Sheldon, R.A. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**;14:387-394.

**Chen** JP, Wu WT. Electrospun polyacrylonitrile nanofibrous membranes for lipase immobilization. *J Mol Catal B Enzym* **2007**;47:117-124.

**Cipolatti** EP, Silva MJA, Klein M, Feddern V, Feltes MMC, Oliveira JV, Ninow JL, de Oliveira D. Review: Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization. *J Mol Catal B Enzym.* **2014**;99:56-67.

**Cui** L, Jia J, Guo Y, Liu Y, Zhu P. Preparation and characterization of IPN hydrogels composed of chitosan and gelatin cross-linked by genipin. *Carbohydr Polym.* **2014**;99:31-38.

**Dai** Y-N, Li P, Zhang J-P, Wang A-Q, Wei Q. A novel pH sensitive N-succinyl chitosan/alginate hydrogel bead for nifedipine delivery. *Biopharm Drug Dispos.* **2008**;29:173-184.

**Datta** S, Christena L.R, Sriramulu Y.R, Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *Biotechnol* **2013**;3:1-9.

**Do Nascimento** JRO, Júnior AV, Bassinello PZ, Cordenunsi BR, Mainardi JA, Purgatto E, Lajolo FM. Betaamylase expression and starch degradation during banana ripening. *Postharvest Biol.* **2006**;40:41-47.

**El-Ghaffar** M. A. Abd, M. S. Hashem. Immobilization of  $\alpha$ -Amylase onto Chitosan and Its Amino Acid Condensation Adducts. *Polym Sci.* 2009;112:805-814.

**Feng** Jia, Balaji Narasimhan, Surya Mallapragada. Materials-Based Strategies for Multi-Enzyme Immobilization and Co-Localization: A Review. *J. Biotechnol.* **2014**;2:111.

**Fernandez-Lorente**, G., Terreni, M., Mateo, C., Bastida, A., Fernandez-Lafuente, R., Dalmases, P., Huguet, J., Guisan, J.M. Modulation of lipase properties in macro-aqueous systems by controlled enzyme immobilization: enantioselective hydrolysis of a chiral ester by immobilized *Pseudomonas* lipase. *Enzyme Microb Tech.* **2001**;28:389-396.

**Gallagher** Warren. FTIR Analysis of Protein Structure. **1997**.

**Gao** Ruixia, Xinru Mu, Junjie Zhang and Yuhai Tang. Specific recognition of bovine serum albumin using superparamagnetic molecularly imprinted nanomaterials prepared by two-stage core-shell sol-gel polymerization. *Chem. B.* **2014**;2:783.

**Ghosh** Priyanka, Arpan Das, Soumi Gayen, Kesha Chandra Mondal, Uma Ghosh. Statistical optimization of  $\alpha$ -amylase production from *Penicillium notatum* NCIM 923 and kinetics study of the purified enzyme. *Enzyme Microb.* **2015**;592:179-188.

**Gusakov** AV. Proteinaceous inhibitors of microbial xylanases. *Biophys Chem.* **2011**;75:1185-1199.

**Gulay** Bayramoglu & Begum Altintas & M. Yakup Arica. Immobilization of glucoamylase onto polyaniline-grafted magnetic hydrogel via adsorption and adsorption/cross-linking. Biochemical Processing and Biomaterial Research Laboratory, **2012**.

**Huma** Tayyaba, Muhammad Hamid Rashid, Muhammad Rizwan Javed y Asma Ashraf. Gamma ray mediated mutagenesis of *Phialocephala humicola*: Effect on kinetics and thermodynamics of amylase production. Afr J Microb. **2012**;6:4639-4646.

**Hwang** E.T., Lee H., Kim J.H., Tatavarty R., Gu M.B. Highly-stable magnetically-separable organic-inorganic hybrid microspheres for enzyme entrapment. Mater Biol Appl. **2011**;21:6491-6493.

**Illanes** A, Wilson L, Caballero E, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM. Crosslinked penicillin acylase aggregates for synthesis of beta-lactam antibiotics in organic medium. J. Biotechnol. **2006**;133:189-202.

**Kaur** S y Dhillon GS. Review article: The versatile biopolymer chitosan: potential sources, evaluation of extraction methods and applications. Appl Microbiol Biotechnol. **2014**;40:155-175.

**Kawaguti** HY, Manrich E, Sato HH. Production of isomaltulose using *Erwinia* sp. D12 cells: culture medium optimization and cell immobilization in alginate. Biotechnol Appl Biochem.. **2006**;29:270-277.

**Krause** MH, Kwong KK, Gragoudas ES, Young LH. MRI of blood volume with superparamagnetic iron in choroidal melanoma treated with thermotherapy. Mater Sci Eng. **2004**;22:779-787.

**Krenkova** J, Svec F. Less common applications of monoliths: IV. Recent developments in immobilized enzyme reactors for proteomics and biotechnology. Biotechnol Appl Biochem. **2009**;32:706-718.

**Kumari** Arpana, Arvind M. Kayastha. Immobilization of soybean (*Glycine max*) amylase onto Chitosan and Amberlite MB-150 beads: Optimization and characterization. Enzyme Microb Tech. **2011**;69:8-14.

**Kuo** Chia-Hung, Guan-Jie Chen, Yawo-Kuo Twu, Yung-Chuan Liu y Chwen-Jen Shieh. Optimum Lipase Immobilized on Diamine-Grafted PVDF Membrane and Its Characterization. Eng Chem Res. **2012**;51:5141-5147.

**Lalonde**, J., Margolin, A. Immobilization of enzymes. In: Drauz, K., Waldmann, H. (Eds.), *Enzyme Catalysis in Organic Chemistry*, second ed. Wiley-VCH, Weinheim. *Enzyme Microb Tech.* **2002**;163-184.

**Lee**, J., Na, H.B., Kim, B.C., Lee, J.H., Lee, B., Kwak, J.H., Hwang, Y., Park, J.G., Gu, M.B., Kim, J., Joo, J., Shin, C.H., Grate, J.W., Hyeon, T., Kim, J. Magnetically-separable and highly-stable enzyme system based on crosslinked enzyme aggregates shipped in magnetite-coated mesoporous silica. *J Mater Chem.* **2009**;19:7864-7870.

**Lee** J, Isobe T, Senna M. Preparation of ultrafine Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> particles by precipitation in the presence of PVA at high pH. *J Interface Sci.* **1996**;177:490-494.

**Li** Y, Yan B, Deng C, Yu W, Xu X, Yang P, Zhang X. Efficient on-chip proteolysis system based on functionalized magnetic silica microspheres. *Proteomics* **2007**;7:2330-2339.

**Li** G, Jiang Y, Huang K, Ding P, Chen J. Preparation and properties of magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> chitosan nanoparticles. *Chem Eng J.* **2008**;466:451-456.

**Mallin** H, Menyess U, Vorhaben T, Höhne M, Bornscheuer UT. Immobilization of two (R)-amine transaminases on an optimized chitosan support for the enzymatic synthesis of optically pure amines. *Chem Eng J.* **2013**;5:588-593.

**Manickam** B, Sreedharan R, Elumalai M. 'Genipin' - The natural water soluble cross-linking agent and its importance in the modified drug delivery systems: An overview. *Chem Eng J.* **2014**;11:139-145.

**Mao** Shen, Yujing Yu, Guodong Fan, Guang Chen, Ying min Jin, Wenyuan Tang y Wenping Jia. The synthesis and characterization of monodispersed chitosan-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles via a facile one-step solvothermal process for adsorption of bovine serum albumin. *Biotechnol Lett.* **2014**;9:296.

**Miletic**, N.; Nastasovic, A.; Loos, K. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications. *Methods Biotechnol Immobil Enzym.* **2012**, in press.

**Miller** GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem.* **1959**;31:426-428.

**Morales** MA, de Souza EC, de Amorim ASCM, Soares JM, Galembeck F. Size selected synthesis of magnetite nanoparticles in chitosan matrix. *Appl Surf Sci.* **2013**;275:71-74.

**Nielsen** JE, Borchert TV. Protein engineering of bacterial  $\alpha$ -amylases. *Biochem Biophys.* **2000**;1543:253-274.

**Pavlidis**, I.V., Tziaila, A.A., Enotiadid, A., Stamatis, H., Gournis, D. Enzyme immobilization on layered and nanostructured materials. In: Loos, K. (Ed.), *Biocatalysis in Polymer Chemistry. Biotechnol Progress.* **2011**:35-63.

**Polizeli** MLTM, Corrêa ECP, Polizeli AM, Jorge JA. Hydrolases from microorganisms used for degradation of plant cell wall and bioenergy. En: Buckeridge MS, Goldman GH, Eds. *Routes to Cellulosic Ethanol.* Springer. **2011**.

**Quignard** F, Di Renzo F, Guibal E. From Natural Polysaccharides to Materials for Catalysis, Adsorption, and Remediation. *Biochem.* **2011**;294:165-197.

**Quiocho**, F.A., Richards, F.M. Intermolecular cross linking of a protein in the crystalline state: carboxypeptidase-A. *Enzyme Microb Tech.* **1964**;52:833-839.

**Quiocho**, F.A., Richards, F.M. The enzymic behavior of carboxypeptidase-A in the solid state. *Biochem.* **1966**:4062-4076.

**Ramos** de la Peña AM, Renard CMGC, Wicker L, Montañez JC, García LA, Contreras JC. Environmental friendly cold-mechanical/sonic enzymatic assisted extraction of genipin from genipap (*Genipa americana*). *Enzyme Microb Tech.* **2014**;21:43-49.

**Rana** M, Kumari A, Chauhan G, Chauhan K. Modified chitosan microspheres in non-aggregated amylase immobilization. *J Biol Macromol.* **2014**;66:46-51.

**Ranjbakhsh** E, Bordbar AK, Abbasi M, Khosropour AR, Shams E. Enhancement of stability and catalytic activity of immobilized lipase on silica-coated modified magnetite nanoparticles. *Chem Eng J.* **2012**;179:272-276.

**Rath** Parthasarathi, Pallavi Tripathi y Arvind M. Kayastha. Immobilization of  $\alpha$ -amylase from germinated mung beans (*Vigna radiata*) on Fuller's earth by adsorption. *J Plant Biochem Biotechnol.* **2012**:229–234.

**Reetz**, M.T., Tielmann, P., Wiesenhofer, W., Konen, W., Zonta, A. Second generation sol–gel encapsulated lipases: robust heterogeneous biocatalysts. *J Mol Catal B Enzym.* **2003**;345:717-728.

**Reye** John T., Jian Lu, Kendra E. Maxwell, Sujit Banerjee. Enhancement of cellulase catalysis of wood pulp fiber by cationic polyelectrolytes. *Biomass and Bioenergy* **2011**:4887-4891.

**Roy**, J.J., Abraham, T.E. Strategies in making cross-linked enzyme crystals. *Chem. Rev.* **2004**;104:3705-3721.

**Santos**, J.C., Nunes, G.F.M., Moreira, A.B.R., Perez, V.H., de Castro, H.F. Characterization of *Candida rugosa* lipase immobilized on poly(Nmethylolacrylamide) and its application in butyl butyrate synthesis. *Chem Eng Technol.* **2007**;30:1255-1261.

**Su** Z, Yu Y, Liang C, Li L, Yu S. Properties of chitosan-immobilized cellulose in ionic liquid. *Biotechnol Appl Biochem.* **2013**;60:231-235.

**Sussman** JL, Lin D, Jiang J, Manning NO, Prilusky J, Ritter O, Abola EE. (). Protein \*Data Bank (PDB): database of threedimensional structural information of biological macromolecules. *Phys Chem B.* **1998**;54:1078-1084.

**Schafhauser** DY, Storey KB. Coimmobilization of amyloglucosidase and pullulanase onto granular chicken bone for enhanced starch degradation. *Biotechnol Appl Biochem.* **1993**;17:103–113.

**Selvan** ST, Hayakawa T, NogamiM, KobayashiY, Liz-Marzan LM, Hamanaka Y, Nakamura AJ. Sol–gel derived gold nanoclusters in silica glass possessing large optical nonlinearities. *Phys Chem B* **2002**;106:10157-10162.

**Shakeel** Ahmed Ansari, Qayyum Husain. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials. *Biotechnol Adv.* **2012**;30:512–523

**Sheldon** RA. Croos-linked enzyme aggregates (CLEA´s): stable and recyclable biocatalysis. *Biochem Soc Trans.* **2007**:1583-1587.

**Sheldon** RA. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Appl Microbiol Biotechnol.* **2011**;92:467-477.

**Sheldon** RA. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Adv Synth Catal.* **2007**;349:1289-1307.

**Shete** PB, Patil RM, Thorat ND, Prasad A, Ningthoujam RS, Ghosh SJ, Pawar SH. Magnetic chitosan nanocomposite for hyperthermia therapy application: Preparation, characterization and in vitro experiments. *Appl Surf Sci.* **2014**;288:149-157.

**Simberg** D, Duza T, Park JH, Essler M, Pilch J, Zhang L, Derfus AM, Yang M, Hoffman RM, Bhatia S, Sailor MJ, Ruoslahti E. Biomimetic amplification of nanoparticle homing to tumors. *Proc Anal Nat Sci* **2007**;104:932-936.

**Singh** BD. Biotechnology expanding horizons. Kalyani, India Soleimani M, Khani A, Najafzadeh K (2011)  $\alpha$ -Amylase immobilization on the silica nanoparticles for cleaning performance towards starch soils in laundry detergents. *J Mol Catal B-Enzym* **2009**;74:1-5.

**Singh** Vandana, Pramendra Kumar. Carboxymethyl tamarind gum–silica nanohybrids for effective immobilization of amylase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2011**; 70:67–73.

**Singh** Vandana, Shakeel Ahmad. Synthesis and characterization of carboxymethyl cellulose-silver nanoparticle (AgNp)-silica hybrid for amylase immobilization. *Cell* **2012**:1759–1769.

**Singh** Vandana, Shakeel Ahmad. Carboxymethyl cellulose-gelatin-silica nanohybrid: An efficient carrier matrix for alpha amylase. *International J Biol Macromol* **2014**;67:439-445.

**Swarnalatha** V, Aluri ER, Dhamodharan R. Immobilization of  $\alpha$ -amylase on gum acacia stabilized magnetite nanoparticles an easily recoverable and reusable support. *J Mol Catal B Enzym.* **2013**;96:6-13.

**Thinh** NN, Hanh PT, Ha Le TT, Anh Le N, Hoang TV, Hoang VD, Dang le H, Khoi NV, Lam TD. Magnetic chitosan nanoparticles for removal of Cr (VI) from aqueous solution. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* **2013**;33:1214-1218.

**Vidinha**, P., Augusto, V., Almeida, M., Fonseca, I., Fidalgo, A., Ilharco, L., Cabral, J.M.S., Barreiros, S. Sol–gel encapsulation: an efficient and versatile immobilization technique for cutinase in non-aqueous media. *J Biotechnol.* **2006**;121:23-33.

**Valerio** SG, Alves JS, Klein MP, Rodrigues RC, & Hertz PF. High operational stability of invertase from *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on chitosan nanoparticles. *Carbohydr Polym.* **2013**;92:462-468.

**Van der Maarel** MJEC, van der Veen B, Uitdehaag JCM, Leemhuis H, Dijkhuizen L. Properties and applications of starchconverting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *J Biotechnol.* **2002**;94:137-155.

**Varma** RS: Journey on greener pathways: From the use of alternate energy inputs and benign reaction media to sustainable applications of nano-catalysts in synthesis and environmental remediation. *Green Chem.* **2014**;16:2027–2047.

**Vulfson**, E.N., Halling, P.J., Holland, H.L. *Enzymes in Nonaqueous Solvents: Methods and Protocols.* *Carbohydr Polym.* **2001**.

**Wang** Yingying, Ping Su, Siming Wang, Jingwei Wu, Jun Huang and Yi Yang. Dendrimer modified magnetic nanoparticles for immobilized BSA: a novel chiral magnetic nano-selector for direct separation of racemates. *J Chem.* **2013**.

**Yewale** T, Singhal RS, Vaidya AA. Immobilization of inulinase from *Aspergillus niger* NCIM 945 on chitosan and its application in continuous inulin hydrolysis. *Biocatal Agric Biotechnol.* **2013**;2:96-101.

**Yuan** Y, Chesnutt BM, Utturkar G, Haggard WO, Yang Y, Ong JL, Bumgardner JD. The effect of cross-linking of chitosan microspheres with genipin on protein release. *Carbohydr Polym.* **2007**;68:561-567.

**Zhouli** Wang, Tianli Yue, Yahong Yuan, Rui Cai, Chen Niu, Caixia Guo. Kinetics of adsorption of bovine serum albumin on magnetic carboxymethyl chitosan nanoparticles. *J Biol Macromol.* **2013**;58:57-65.

**Zhu** H.Y., R. Jiang, L. Xiao, G.M. Zeng. Preparation, characterization, adsorption kinetics and thermodynamics of novel magnetic chitosan enwrapping nanosized Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and multi-walled carbon nanotubes with enhanced adsorption properties for methyl orange. *Biotechnol.* **2011**;101:5063-5069.

## 9. ANEXO

Santiago de Querétaro, a 7 de junio del 2016

CONSEJO ACADÉMICO  
FACULTAD DE QUÍMICA  
PRESENTE

Por medio de la presente, el que suscribe Dr. Aldo Amaro Reyes solicito amablemente se considere el cambio de título del trabajo de tesis registrado como "INMOVILIZACIÓN DE UNA  $\alpha$ -AMILASA EN UN SOPORTE MAGNÉTICO DE QUITOSANO" considerada como opción de titulación del **C. Alejandro Corona Vidal** con número de expediente **223105** de la carrera de **Licenciado en Biotecnología**. El nuevo título será "PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA ALFA-AMILASA RETICULADA EN UN SOPORTE MAGNETICO". La petición de este cambio de título obedece a que el nuevo título se adecua en mayor medida a las actividades específicas del trabajo realizado.

Por otro lado, también me permito hacer otra petición para que las secciones de RESULTADOS y DISCUSIÓN sea considerado como una sola sección en el trabajo de tesis antes discutido: "PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA ALFA-AMILASA RETICULADA EN UN SOPORTE MAGNETICO". El planteamiento de estas peticiones obedece a que una sola sección permitirá un mejor entendimiento y mayor coherencia a lo descrito en dicho trabajo.

Sin más por el momento, quedo de ustedes en espera de una respuesta favorable a la presente.



Dr. Aldo Amaro Reyes  
Facultad de Química