

**BIOTRANSFORMACIÓN DE COLORANTES ORGÁNICOS EN PROCESOS
CATALIZADOS CON PEROXIDASAS DE PALMA REAL (*ROYSTONEA REGIA*).**

POR: CARLOS ALBERTO GRATERÓN SANTOS.

**LABORATORIO DE BIOQUÍMICA.
GRUPO DE INVESTIGACIÓN DE BIOQUÍMICA E INGENIERÍA DE
PROTEÍNAS.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
BUCARAMANGA
COLOMBIA
2006**

**BIOTRANSFORMACIÓN DE COLORANTES ORGÁNICOS EN PROCESOS
CATALÍZADOS CON PEROXIDASAS DE PALMA REAL (*ROYSTONEA REGIA*).**

POR: CARLOS ALBERTO GRATERÓN SANTOS.

**TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OPTAR AL
TÍTULO DE QUÍMICO.**

**DIRIGIDO POR: RODRIGO TORRES SÁEZ
PROFESOR ESCUELA DE QUÍMICA.
FACULTAD DE CIENCIAS**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
BUCARAMANGA
COLOMBIA
2006**

Nota de aceptación.

FIRMA DE DIRECTOR

FIRMA DEL JURADO

FIRMA DEL JURADO

DEDICATORIA

**A mi madre, abuela y hermano, y en general a
mi familia, y a todos los profesores y amigos
que estuvieron presentes en este proceso de
formación**

AGRADECIMIENTOS

A Omaira Santos, por todo el apoyo recibido durante estos años de mi vida académica.

A Gonzalo Graterón por sus orientaciones en cada una de las facetas de mi vida.

A Roberto Graterón por su colaboración para terminar este proyecto académico.

A Rodrigo Torres Sáez por sus explicaciones y enseñanzas en este proceso académico.

A los calificadores por acompañarme en el proceso de evaluación.

A William Larrota por su colaboración para que este proyecto se llevara a cabo.

A Claudia Ortiz por su colaboración en el proyecto.

A todos mis amigos por compartir esos momentos que quedaran en el recuerdo.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCION	1
2. MARCO TEORICO	3
2.1 MARCO DE ANTECEDENTES.....	3
2.2 ENZIMAS COMO CATALIZADORES BIOLÓGICOS	5
2.2.1 RESEÑA HISTÓRICA	5
2.2.2 DEFINICIÓN DE ENZIMAS	5
2.2.3 LAS OXIDOREDUCTASAS.	7
2.2.4 BIOTRANSFORMACIÓN CON PEROXIDASAS.....	7
2.2.5 PEROXIDASAS DE PALMA REAL.....	10
2.2.5.1 ESTABILIDAD ENZIMÁTICA FRENTE A TEMPERATURA Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.	12
2.2.6 INMOVILIZACIÓN DE PROTEÍNAS.....	13
2.2.6.1 ENTRECruzamiento DE AGREGADOS ENZIMAICOS (CLEAS).	14
2.3 COLORANTES ORGÁNICOS.....	15
2.3.1 CLASES DE COLORANTES	15
2.3.1.1 COLORANTES DISCRETOS.....	15
2.3.1.2 COLORANTES SUSTANTIVOS.	16
2.3.1.3 COLORANTES MORDIENTES.	16
2.3.1.4 COLORANTES A LA TINA.	16
2.3.2 COLORANTES MÁS UTILIZADOS EN LA INDUSTRIA.	16
2.3.2.1 Colorantes nitrados y nitrosados.	16
2.3.2.2 COLORANTES AZOICOS.	16
2.3.2.3 COLORANTES DEL DIFENIL Y TRIFENIL METANO.....	17
2.3.2.4 COLORANTES INDIGOIDES.	18
2.3.2.5 COLORANTES DE ANTRAQUINONA.....	18
2.3.2.6 COLORANTES AZUFRADOS O FOSFORADOS	19

2.4 TRATAMIENTO ENZIMÁTICO DE LOS EFLUENTES CONTAMINADOS CON COLORANTES ORGÁNICOS.....	19
3. OBJETIVOS.....	20
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
4.1 MATERIALES.....	22
4.1.1 REACTIVOS.....	22
4.1.2 SUSTRATOS.....	22
4.1.3 .ENZIMAS.....	24
4.2 MÉTODOS.....	24
4.2.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE PEROXIDASA DE PALMA REAL (RPP).....	24
4.2.2 DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS.....	24
4.2.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA RPP.....	24
4.2.4. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD FRENTE A TEMPERATURA Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.....	25
4.2.5 ESTUDIO DEL EFECTO DE VARIABLES AMBIENTALES SOBRE LA DECOLORIZACIÓN DE COLORANTES ORGÁNICOS.....	26
4.2.6 ANÁLISIS POR HPLC DE LA REACCIÓN CATALIZADA POR LA PEROXIDASA.....	26
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
5.1 ESTUDIOS DE ESTABILIDAD ENZIMÁTICA.....	27
5. CÁLCULO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	27
5.1.2 ESTABILIDAD DE RPP POR TEMPERATURA.....	29
5.1.3 ESTABILIDAD ENZIMÁTICA FRENTE A PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.....	31
5.2 BIOTRANSFORMACIÓN DE LOS COLORANTES.....	33
5.2.1 BIOTRANSFORMACIÓN DE ANARANJADO DE METILO.....	33
5.2.2 BIOTRANSFORMACIÓN DE PARDO DE BISMARCK.....	39
5.2.3 BIOTRANSFORMACIÓN DE VIOLETA DE METILO.....	43
5.3 EVALUACIÓN DE LA DECOLORIZACIÓN DE LOS TINTES POR HPLC.....	49
5.3.1 NARANJA DE METILO.....	49

5.3.2 PARDO DE BISMARK.....52
6. CONCLUSIONES.....56
7. RECOMENDACIONES.....58

LISTADO DE TABLAS:

Tabla 1. Clasificación de las enzimas según su función.	6.
Tabla 2. Peso molecular y punto isoeléctrico de peroxidasas vegetales.	11.
Tabla 3. Características del anaranjado de metilo.	22.
Tabla 4. Características del Pardo de Bismark.	23.
Tabla 5. Características del violeta de metilo.	23.
Tabla 6. Actividades volumétrica y específica del extracto enzimático	27.
Tabla 7. Constantes de inactivación térmica para la RPP soluble.	30.
Tabla 8. Constantes de inactivación por peróxido de hidrógeno.	32.
Tabla 9. Parámetros óptimos para la reacción del metil naranja con RPP	38.
Tabla 10. Parámetros óptimos para la reacción del pardo de Bismark con RPP.	43.
Tabla 11. Parámetros óptimos para la reacción del violeta de metilo con RPP.	48.

LISTADO DE ESQUEMAS

Esquema 1. Mecanismo general de reacción de las peroxidasas	7.
Esquema 2. Formación del cpdI por la peroxidasa	8.
Esquema 3. Sustratos donadores de electrones en las reacciones catalizadas con Peroxidasas	9.
Esquema 4. Resumen de mecanismos de los ciclos de las peroxidasas	10.
Esquema 5. Inactivación suicida por peróxido	13.
Esquema 6. Formación de CLEA	15.
Esquema 7. Ejemplos de colorantes tipo azo	20.
Esquema 8. Mecanismo propuesto para la reacción del guayacol con RPP	28.
Esquema 9. Ciclo catalítico, posible mecanismo de la oxidación del naranja de metilo con RPP	51.
Esquema 10. Ciclo catalítico 2, posible mecanismo de la oxidación del pardo de Bismark con RPP.	54.

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Estabilidad térmica de RPP soluble a diferentes temperaturas	29.
Figura 2. Estabilidad térmica de RPP soluble a diferentes temperaturas	29.
Figura 3. Estabilidad de la RPP frente al peróxido de hidrógeno.	31.
Figura 4. Estabilidad de la RPP frente al peróxido de hidrógeno	32.
Figura 5. Cinética de la remoción naranja de metilo con RPP.	34.
Figura 6. Efecto de pH en la biotransformación de metil naranja con RPP.	34.
Figura 7. Efecto de la concentración H_2O_2 en la reacción de remoción de anaranjado de metilo con RPP	35.
Figura 8. Efecto de la concentración de anaranjado de metilo en la reacción catalizada con RPP.	36.
Figura 9. Efecto de cantidad de RPP sobre la remoción del colorante.	37.
Figura 10. Espectro de absorción del naranja de metilo	37.
Figura 11: Espectro de absorción del naranja de metilo tratado con RPP	38.
Figura 12. Cinética de remoción de Pardo de Bismark con RPP	39.
Figura 13. Efecto de pH en la biotransformación de pardo de Bismark con RPP.	39.
Figura 14. Efecto de la concentración H_2O_2 en la reacción de remoción con RPP.	40.
Figura 15. Efecto de la concentración del pardo d Bismark en la reacción catalizada con RPP.	41.
Figura 16. Efecto de la cantidad de RPP en la remoción de colorante	41.
Figura 17. Espectro de absorción del Pardo de Bismark	42.
Figura 18. Espectro de absorción del Pardo de Bismark, tratado con RPP.	43.
Figura 19. Cinética de la remoción de violeta de metilo con RPP.	44.
Figura 20. Efecto de pH en la biotransformación de Violeta de metilo con RPP	44.
Figura 21. Efecto de la concentración de H_2O_2 en la reacción de remoción con RPP	45.
Figura 22. Efecto de la concentración de violeta de metilo en la reacción catalizada con RPP.	46.
Figura 23. Efecto de la dosis de RPP en al remoción de colorante	47.
Figura 24. Espectro de absorción del Violeta de metilo	47.

Figura 25. Espectro del Violeta de metilo tratado con RPP.	48.
Figura 26. Perfil cromatográfico del anaranjado de metilo.	49.
Figura 27. Perfil cromatográfico del anaranjado de metilo, tratado con RPP.	50.
Figura 28. Perfil cromatográfico de pardo de Bismark.	52.
Figura 29. Perfil cromatográfico de pardo de Bismark, tratado con RPP.	53.
Figura 30. Curva de calibración para determinar la concentración de proteínas por el método de Bradford.	63.
Figura 31. Determinación de la actividad volumétrica de la RPP en diferentes disoluciones del extracto enzimático.	64.

Titulo: **BIOTRANSFORMACIÓN DE COLORANTES ORGÁNICOS EN PROCESOS CATALÍZADOS CON PEROXIDASAS DE PALMA REAL (*ROYSTONEA REGIA*).**

Autor: Carlos Alberto Graterón**.

Palabras claves: Peroxidasas, Colorantes, CLEAs.

En este trabajo se realizó la decolorización de diferentes tintes, tales como: metil naranja, pardo de Bismark, metil violeta, utilizando preparaciones enzimáticas de peroxidasa de palma real (PPR) en forma soluble (ES) y entrecruzada-agregada con glutaraldehído (CLEA). La decolorización de los colorantes se determinó mediante espectrofotometría UV-visible y HPLC en fase reversa, observándose una disminución total de la banda de absorción para naranja de metilo y demostrándose una remoción mayor al 50% para todos los colorantes, utilizando tanto la enzima en forma soluble como CLEA bajo diferentes condiciones de reacción tales como pH, cantidad de enzima, temperatura, concentración de peróxido de hidrógeno y de los colorantes.

En consecuencia, se demostró que es factible la utilización de peroxidasas para remover colorantes orgánicos tóxicos desde aguas residuales y en pre-tratamiento enzimático de procesos de biodegradación microbiana.

*Proyecto de grado

**Facultada de ciencias. Escuela de química. Director: Dr. Rodrigo Torres Saez.

TITLE: BIOTRANSFORMATION OF ORGANIC DYE BY ROYAL PALM PEROXIDASAS (*ROYSTONEA REGIA*) CATALYZED PROCESS.

Author: Carlos Alberto Grateron**.

Keywords: Peroxidases, Dyes, CLEAs.

In this work, decolorization of different azo-dyes, such as methyl orange, Bismark brown and methyl violet was carried out by using of enzyme preparations or Royal Palm peroxidase (RPP) in both soluble and cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). Dye decolorization was determined by UV-visible spectrophotometry and reverse phase-HPLC, obtaining a total decrease in the absorption band of methyl orange and demonstrating a dye removal greater than 50% for all dyes, by using of enzyme in both soluble and CLEA form under different reaction conditions such as; pH, amount of the enzyme, temperature, hydrogen peroxide and dye concentration.

In consequence, it was demonstrated that it is feasible using peroxidases for both toxic dye removal from waste water and in enzymatic pre-treatment in microbial biodegradation processes.

* Project of degree

** Faculty of sciences. School of chemistry: Dr. Rodrigo Torres Saez.

1. INTRODUCCION

Uno de los campos más promisorios de las enzimas es su utilización en procesos de biorremediación de efluentes contaminados con moléculas orgánicas de difícil degradación. De esta manera, es posible llevar a cabo la oxidación enzimática de efluentes que contengan colorantes orgánicos de difícil decolorización. Sin embargo, los procesos enzimáticos requieren de condiciones ambientales adecuadas para su óptimo funcionamiento [Obinger, 1996; Lobarzeweski, 1991; Sakharov, 1999]. Si estas condiciones se alteran, las enzimas pueden llegar a desnaturalizarse y perder su actividad frente a los sustratos [Adam, 1999]. Es por ello que para el caso de los procesos de oxidación catalizados por enzimas, tales como las peroxidadas, se hace necesario determinar los parámetros óptimos de reacción tales como: tiempo de contacto enzima-sustrato, concentración de la enzima, pH de la fase acuosa, concentración del sustrato y concentración de peróxido de hidrógeno, que permitan obtener los mejores rendimientos de la reacción. Por lo tanto, es posible determinar la actividad catalítica que presenta la enzima frente a diferentes tipos de moléculas orgánicas cuando el sistema de transformación enzimática se encuentra bajo condiciones óptimas de reacción [Akasaka, 1995; Vesga, 2000].

De esta forma, el uso de enzimas en procesos de biorremediación, surge como una alternativa interesante para la remoción de compuestos orgánicos contaminantes [Aitken, 1993; Candelas, 1997]. Uno de estos contaminantes, son los colorantes orgánicos que contaminan efluentes y que provienen de diferentes fuentes industriales. Estos colorantes son, en su mayoría, compuestos aromáticos altamente tóxicos, recalcitrantes y no biodegradables que hacen parte de las aguas residuales de industrias como curtiembres (Pardo de Bismark), pinturas (violeta de metilo) y de alimentos (Anaranjado de metilo), donde son utilizados como insumos para coloración de algunos de sus productos. Existen diferentes métodos para tratar estos desechos, pero el problema es que son procesos

costosos y que, en muchos casos, sus residuos resultan ser igual o más peligrosos para el medio ambiente.

En la actualidad se usan procesos biotecnológicos para la degradación de dichos contaminantes [Zille, 2004]. Estos procesos utilizan microorganismos y enzimas como agentes degradadores, oxidativos y despolimerizadores, para facilitar la degradación o biotransformación de estos tintes por el medio ambiente [Miland, 1996.]

2. MARCO TEORICO

2.1 MARCO DE ANTECEDENTES

Durante la última década, se han desarrollado diversos estudios sobre el rol de las enzimas en la biotransformación de moléculas orgánicas contaminantes.

Therese Stachyrin y sus colaboradores (1995), realizaron un estudio sobre la oxidación de dibenzotiofeno, utilizando como catalizadores las enzimas peroxidasa de rábano picante (HRP), hemoglobina (Hb) y albúmina de suero de bovino (BSA), obteniéndose rendimientos hasta de un 100% de oxidación con la hemoglobina y 50% con la peroxidasa de rábano, y con una actividad poco significativa para la BSA bajo las mismas condiciones de reacción.

A su vez, Reiko Akasaka y colaboradores (1995), utilizaron la peroxidasa de rábano picante para catalizar la hidroxilación de benceno, cuando el benceno fue utilizado como el solvente de la reacción. También se utilizó la peroxidasa inmovilizada sobre poly (γ -metil-L glutamato) quien catalizó la reacción de hidroxilación con una actividad más alta que la enzima libre.

Posteriormente, Tim Grotienhuis (1998), utilizó como fuente enzimática el hongo de la pudrición blanca *Bjerkandera spp* para oxidar hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), mostrando alta eficiencia en la degradación de benzo α -pireno. Se demostró que la actividad enzimática de las peroxidasas aumentaba por adición de surfactantes al sistema de reacción.

A su vez, Sara E Maloney (1998), llevó a cabo estudios con los hongos de pudrición blanca *Phanerochaete chrysosporium* y *Phanarate sordida*, en la degradación de insecticidas organoclorados como el pentaclorofenol, mostrando grandes rendimientos en la reacción de oxidación.

Por otro lado, Neil. C Bruce (1999) y su grupo de investigación, aislaron varios microorganismos para tratar explosivos altamente tóxicos como TNT, GTN y RDX, por medio de procesos oxidativos y reductivos. En este caso, las *Pseudomonas spp* demostraron gran capacidad en la desnitración del TNT, logrando metabolizarla casi hasta tolueno.

De manera alternativa Rafael Vásquez-Duhalt (2002), realizó un estudio sobre la estabilidad de las peroxidasas por peróxido de hidrógeno, analizando el límite en la concentración de peróxido que puede resistir la proteína antes de desactivarse, efecto que se conoce como inactivación suicida.

Andrea Zinho y col. (2004), realizaron un estudio sobre los potenciales redox necesarios para la decolorización oxidativa de colorantes azo sulfurados, utilizando como biocatalizadores lacasa de *Trametes villosa* y levadura, demostrándose que los colorantes son más fácilmente tratados con lacasa que con levadura.

Recientemente, Mohan y colaboradores (2005), realizaron un estudio de la remoción por oxidación del colorante azo, ácido negro 10BX, utilizando como biocatalizador peroxidasa de rábano picante libre e inmovilizada sobre poliacrilamida y obteniéndose un porcentaje de remoción del 65 %.

Todos estos estudios han demostrado la capacidad de las enzimas (peroxidasas) y/o microorganismos en la degradación y biotransformación de compuestos orgánicos contaminantes.

2.2 ENZIMAS COMO CATALIZADORES BIOLÓGICOS

2.2.1 RESEÑA HISTÓRICA

Las enzimas se han venido empleando, desde hace varios años, como una herramienta eficaz para diferentes procesos de biotransformación, tales como la fabricación de queso, vino y cerveza. A mediados del siglo XVIII, el científico Antoine Laurent Lavoiser (1743-1794) empezó a utilizar los microorganismos como fuente enzimática, y fue el primero en establecer las bases cuantitativas en los procesos de la fermentación alcohólica. Buchner hizo el primer reporte sobre estabilización de enzimas. A su vez, en el experimento de jugo de levadura prehidratado, Luis Pasteur descubrió que las enzimas estaban íntimamente ligadas con la estabilidad de las células, mientras que en 1896 William Kuhne propuso el nombre de enzima en (en) y zyme (levadura) para estas macromoléculas [Castillo, 2000].

2.2.2 DEFINICIÓN DE ENZIMAS

Las enzimas son catalizadores biológicos muy eficientes en procesos de biotransformación, y que aceleran las reacciones químicas por disminución de la energía de activación de un gran número de procesos químicos. Además, poseen alta especificidad de sustrato, es decir, reaccionan con un solo tipo de sustratos o con compuestos estructuralmente similares estereo y enantioselectivamente [O Brein, 1995].

Las enzimas son proteínas, lo que significa que tienen estructuras tridimensionales complejas de cadenas polipeptídicas, las cuales dependen de los estados de oxidación de los grupos amino y carboxílicos; por consiguiente, la estabilidad estructural depende del pH. La temperatura es otro factor que influye sobre la estructura de la proteína, debido a que altas temperaturas pueden desnaturalizar su estructura principalmente por el rompimiento de enlaces puente de hidrógeno que mantiene su estructura terciaria y cuaternaria. Un gran número de enzimas contienen constituyentes no peptídicos, como por ejemplo, cadenas con alto contenido de carbohidratos. Este tipo de enzimas no pueden funcionar por sí solas, y necesitan un constituyente no peptídico llamado *cofactor*, el cual puede ser un ión o una molécula [Rodríguez, 2000].

Tabla 1. Clasificación de las enzimas según su función, (IUPAC-EC (comisión de enzimas)) [Castillo, 2001].

Clase	Tipo de reacción
Oxidoreductasas	Oxidación/ Reducción
Transferasas	Reacciones de transferencia de grupo
Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis
Liasas	Reacciones de eliminación
Isomerasas	Reacciones de isomerización
Ligasas	Enlaces de síntesis acoplados a la hidrólisis

2.2.3 LAS OXIDOREDUCTASAS:

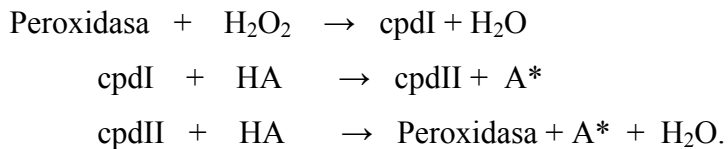
Son hemoproteínas que poseen funciones como: transporte de electrones, producción de energía (citocromo), transferencia de oxígeno (monooxigenasas), y la oxidación de sustratos (*peroxidasas*), [Hinner, 1996].

Las peroxidasas son glicoproteínas globulares con peso molecular de 42000Da, en promedio. De los cuales, un 72% corresponde a la porción proteica y el 23.8% restante, al grupo hemo (Grupo prostético).

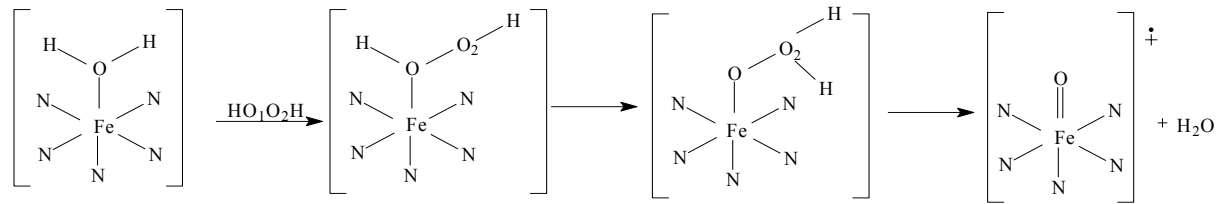
2.2.4 BIOTRANSFORMACIÓN CON PEROXIDASAS:

Las peroxidasas catalizan la oxidación de un gran número de compuestos por medio de la acción de hidroperóxidos orgánicos o H₂O₂. Un mecanismo generalizado de la acción de las peroxidasas, se puede resumir como sigue: La peroxidasa reacciona con el peróxido, la enzima pierde 2 electrones, formándose una especie oxidada muy reactiva denominada compuesto 1 (cpdI). Posteriormente, el cpdI reacciona con una molécula de sustrato (HA) que dona un electrón a la enzima convirtiéndola en el denominado compuesto (cpdII) y formando una especie A*. Finalmente, el cpdII reacciona con otra molécula de HA, para regresar a su forma nativa. El mecanismo anterior se puede resumir en el siguiente esquema.

Esquema 1. Mecanismo general de reacción de las peroxidasas [Solano, 2003].



Esquema 2: Formación del cpdI por la peroxidasa [Solano, 2003].



Etapas: 1

2

3

4

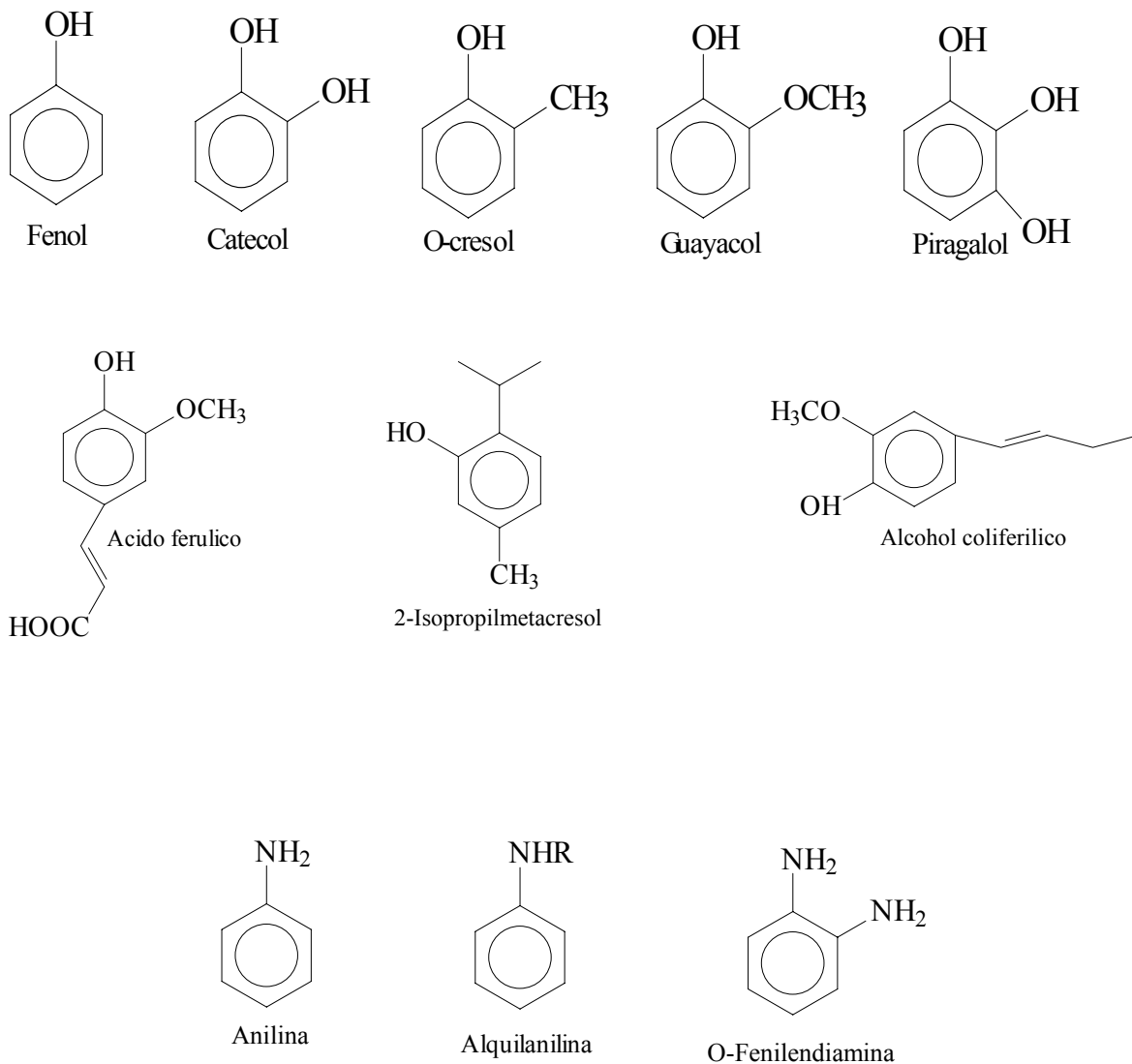
Las reacciones de óxido/reducción se pueden llevar a cabo por la buena disposición espacial del grupo hemo en la estructura de la proteína. El catión central de este grupo es el Fe⁺³, el cual posee número de coordinación de 6, y está enlazado a cuatro nitrógenos que pertenecen a la porfirina del grupo hemo. Todo este arreglo se encuentra en el mismo plano, un quinto enlace se forma con el nitrógeno de la histidina vecinal y la sexta posición se encuentra coordinada con una molécula de H₂O.

En el esquema 2, se observa cómo en la etapa 1 el agua está coordinada al hierro del grupo hemo de la peroxidasa, en la etapa 2, el HOOH se coordina al sitio activo de la proteína, y la reacción continúa con la donación de un protón por parte del peróxido a alguna base de Brönsted, la cual puede ser la histidina distal de la proteína. En la etapa 3, un residuo ubicado en la región distal que puede ser histidina o arginina dona un protón al oxígeno que no está ligado con el hierro, con la correspondiente disociación simultánea del enlace oxígeno-oxígeno del peróxido para formar la etapa cuatro.

La reducción del peróxido le cuesta a la enzima la donación de un electrón por parte del Fe⁺³, convirtiéndose en Fe⁺⁴, el otro electrón lo dona la porfirina quedando el complejo como catión radical [Wirstam, 1999].

Una gran variedad de moléculas orgánicas intervienen en el ciclo catalítico de las peroxidasa como agentes reductores, para que la enzima vuelva a su estado nativo. En un ciclo catalítico se oxidan dos moléculas de sustrato y se producen dos moléculas de agua [Riabov, 1996].

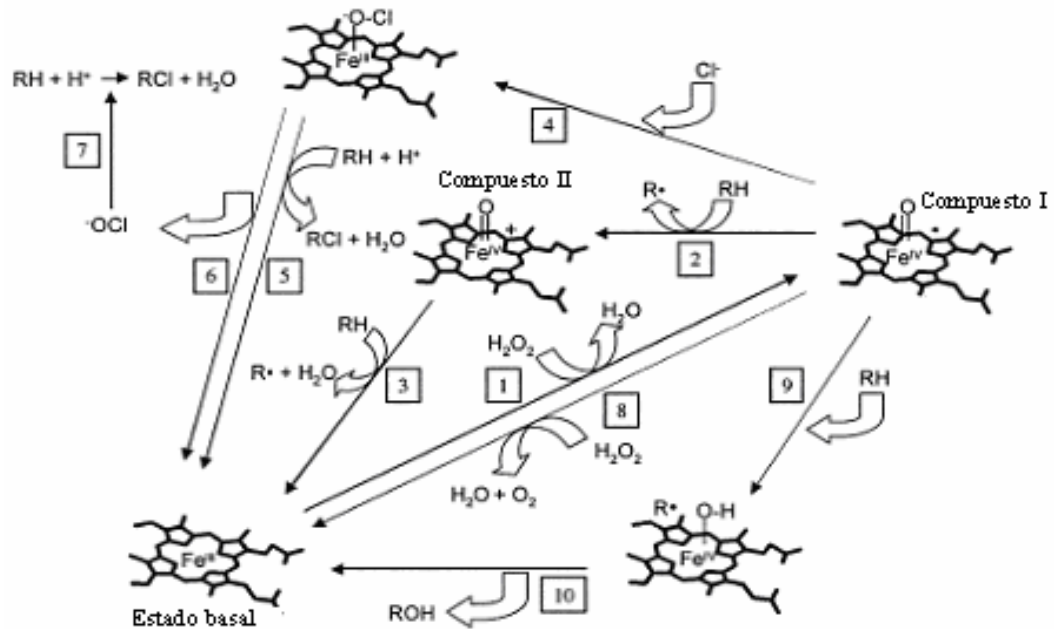
Esquema 3. Sustratos donadores de electrones en las reacciones catalizadas con peroxidasa [Carey, 2000].



En el esquema 4 se muestran los mecanismos para las diferentes rutas en los ciclos catalíticos de las peroxidasa: En la ruta 1 se produce el compuesto I por la reducción de peróxido a agua, en la ruta 2 se oxida la primera molécula de sustrato formándose el

compuesto II, y por la vía 3 reacciona otra molécula de sustrato, reduciendo el hierro IV de la porfirina a hierro III, recuperando la enzima su estado basal.

Esquema 4: Resumen de mecanismos de los ciclos de las peroxididasas [Vásquez-Duhalt, 2002].



2.2.5 PEROXIDASAS DE PALMA REAL

La palma real es un árbol de tronco cilíndrico que alcanza alturas de 10 a 24 metros y presenta hojas plumosas de 2.40- 3.00m de longitud, conformada por segmentos de 75 cm de largo. El tronco está cubierto por la vaina de la hoja que forma una “lámina” ancha, en cuya base nacen las inflorescencias blancas y las infrutescencias doradas o color marrón oscuro, siendo sus resistentes raíces son abundantes y profundas. El árbol crece relativamente rápido, alcanzando su máximo desarrollo en unos diez años. Se cultiva mejor a altitudes de 900- 1000m sobre el nivel del mar y se propaga por semillas. Pertenece a la familia de las palmáceas (palmae). Las palmas son generalmente tropicales, aunque otras pueden ser ubicadas en Norteamérica subtropical, donde son cultivadas. Su nombre científico es *Roystonea regia*, en honor al científico norteamericano que trabajó en Puerto Rico, Roy Stone, aunque la planta como tal no tiene gran uso industrial [Sakharov, 1999].

Las hojas de *Roystonea regia* presentan altos contenidos de enzimas, peroxidases, alcanzando niveles de 700U por g de hoja, las cuales se mantienen constantes durante todo el año y en varias etapas del desarrollo. La actividad de las peroxidases ha sido medida en diferentes épocas del año, encontrándose que la concentración de las enzimas es independiente de factores como la edad de la planta, condiciones climatológicas, y altura de la palma, entre otras.

Por otro lado, la peroxidasa de palma real (RPP) es una glicoproteína extracelular de peso molecular 51 KDa, que se encuentra en mayor concentración en las hojas verdes de dicha planta. Su peso relativamente es alto en comparación con las otras peroxidases, lo cual sugiere un alto grado de glicosilación. Su espectro de absorción tiene un máximo en 403nm, conocida con el nombre de banda Soret la cual es característica de las peroxidases vegetales, y es generada por el grupo prostético [Vesga, 2003].

Tabla 2: Peso molecular y punto isoeléctrico de peroxidases vegetales [Obinger, 1996]:

Fuente de enzima	Peso molecular (KDa)	Punto isoeléctrico
Palma africana	57	3.8
Palma real	51	3.5
Alfalfa	48	9.2
Maíz	48	3.5
Rábano coreano	44	9.0
Rábano picante	44	8.9
Maní	40	8.9
Batata	40	4.5
Soya	37	4.1
Tabaco	36	3.5

Las peroxidasas de palma real son enzimas muy estables, pueden tener tolerancia a condiciones extremas y son catalíticamente activas a pH drásticos, y temperaturas hasta de 90°C. Se ha observado que las peroxidasas de palma real son las únicas que resisten estos valores, en comparación con enzimas comerciales como las peroxidasas de rábano picante (HRP) que sufren desactivación térmica a 70°C [Berenzin, 1995].

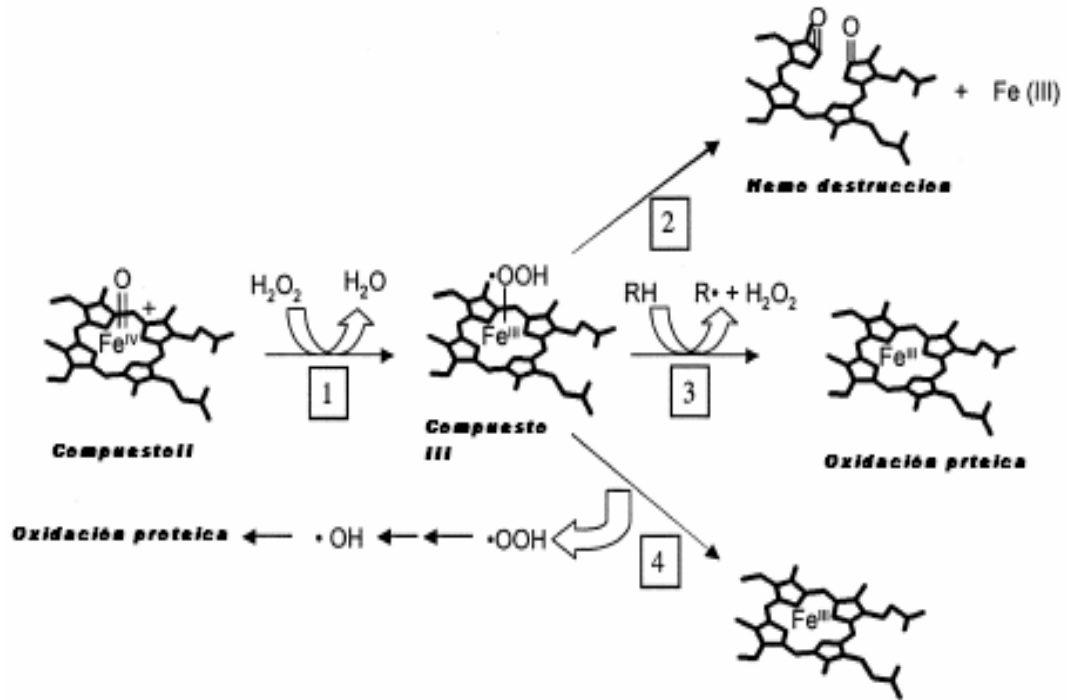
2.2.5.1 ESTABILIDAD ENZIMÁTICA FRENTE A TEMPERATURA Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.

La estabilidad térmica de la proteína se puede determinar monitoreando como disminuye velocidad de una reacción que sea catalizada por ésta, debido al aumento de la temperatura en el medio de reacción. Por ejemplo, la formación del tetraguayacol, por medio de la oxidación del guayacol en el proceso catalizado con peroxidasas.

Normalmente las RPP son inactivadas por la presencia de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno. El mecanismo propuesto para la desactivación de la peroxidasa, incluye en el primer paso, la activación en el cual el peróxido de hidrógeno transforma el Fe (III) a Fe (IV), ruta 1 en el esquema 4. Posteriormente la oxidación de una molécula de sustrato para formar el compuesto II. Ruta 2 en el esquema 4, subsecuentemente este compuesto puede seguir tres rutas:

- 1- Oxidación de una molécula de sustrato, ruta 3 en el esquema 4.
- 2- Reacción con un cloruro para formar ClO- Fe (III), ruta 4 en el esquema 4.
- 3- La reacción del compuesto II con otra molécula de peróxido para formar el compuesto III, ruta 1 esquema 5, y por consiguiente la destrucción del grupo hemo e inactivación irreversible de la peroxidasa [Vásquez, 2005].

Esquema 5: Inactivación suicida por peróxido



2.2.6 INMOVILIZACIÓN DE PROTEÍNAS

Las enzimas inmovilizadas que se utilizan en procesos de biotransformación presentan diversas ventajas, entre las que se encuentran: reducción de costos de proceso ya que es más fácil separar la proteína del medio de reacción, posibilidad de operación continua y recuperación del biocatalizador. Asimismo se mejora la estabilidad, actividad y selectividad en la enzima inmovilizada.

Infortunadamente, el uso de materiales poliméricos como soportes de inmovilización produce una disminución en la actividad catalítica de la enzima. Además, en el sistema de reacción, el 99% de la masa es material catalíticamente inactivo. La elaboración de soportes poliméricos de inmovilización es una tarea ardua que requiere de grandes tiempos de trabajo, debido a que hay que mantener la calidad de la proteína intacta.

2.2.6.1 ENTRECruzAMIENTO DE AGREGADOS ENZIMAICOS (CLEAs).

Recientemente se desarrolló una nueva forma de inmovilización de enzimas, llamada entrecruzamiento de agregados enzimáticos (CLEAs).

Esta técnica consta de una etapa de precipitación y agregación de la enzima, la cual es inducida por la adición de sales, solventes orgánicos, polímeros no iónicos y ácidos. Esta etapa de precipitación es comúnmente utilizada como método de purificación de proteínas [Sheldon, 2004]. Estos agregados físicos son estructuras supramoleculares unidas por enlaces no covalentes rediseñados cuando son dispersados en agua. La formación de estos agregados físicos es posible debido a un cambio en el estado de hidratación de las moléculas de la enzima, o por la alteración de la constante electrostática de la solución por la adición de un agente de agregación o precipitación apropiado.

Investigaciones recientes muestran que para concentraciones altas de precipitante los resultados obtenidos son muy buenos, lográndose un rendimiento del 100% en la actividad catalítica. Una razón para esta alta retención de la actividad es la competencia entre agregación y desnaturalización. Por el contrario, concentraciones menores de 70% (v/v) mostraron inactivaciones parciales debido a que la precipitación es incompleta.

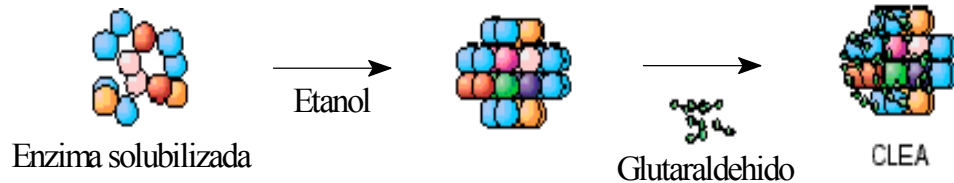
Así mismo, se observó que el comportamiento catalítico de los diferentes agregados físicos depende de las propiedades de los agentes precipitantes utilizados, esto parece posible debido a que cada agente precipitante induce a una conformación diferente de la enzima.

La siguiente etapa es la de entrecruzamiento del agregado físico. Este proceso consiste básicamente en la formación de enlaces entre los grupos reactivos del agente bifuncional y los residuos aminoácidos de la enzima. En esta etapa se mantiene la estructura del

agregado y la actividad catalítica de la proteína individual. De esta forma, el rendimiento de la actividad del agregado enzimático entrecruzado excede al de la enzima nativa. Este hecho experimental ha sido observado con lipasas y posteriormente con otras enzimas, y se denomina hiperactivación, la cual puede ser originada por un cambio conformacional de la proteína inducido por el estado de agregación.

Se conocen varios agentes entrecruzantes, siendo el glutaraldehído el más usado por su precio económico y alta versatilidad química.

Esquema 6: Formación de CLEA



2.3 COLORANTES ORGÁNICOS.

Los colorantes orgánicos son compuestos aromáticos, capaces de unirse fuertemente a la fibra, y son químicamente estables, además de soportar bien la acción de la luz. Además, son compuestos que pueden llegar a ser altamente peligrosos y tóxicos para el medio ambiente y la salud humana debido a que ellos en algunas ocasiones son fundidos con metales pesados.

2.3.1 CLASES DE COLORANTES [<http://www.colorantes.co/industriales>]:

2.3.1.1 COLORANTES DISCRETOS.

Existen colorantes ácidos y básicos. Los colorantes ácidos son sales de ácido sulfúrico o carboxílicos que se precipitan sobre la fibra. Los colorantes básicos son sales amoniacales o complejos formados por cloruro de zinc o aminas. Estos dos tipos de tintes se emplean especialmente en el teñido de lanas y poliamidas sintéticas. Algunos colorantes básicos, de elevado peso molecular, son absorbidos por el algodón y el rayón.

2.3.1.2 Colorantes sustantivos.

Son colorantes que pueden teñir directamente las fibras de algodón.

2.3.1.3 Colorantes mordientes.

El mordiente es un producto que se adiciona a la fibra y es absorbida por ella, logrando consecutivamente atraer el colorante. Un ejemplo de este tipo de tinte es el ácido tánico, el cual se usa como mordiente para los colorantes básicos. Este término se usa principalmente para los tintes que se adicionan en forma de óxidos metálicos como mordiente, tales como los óxidos de aluminio y cromo para formar precipitados insolubles.

2.3.1.4 Colorantes a la tina.

Son sustancias insolubles que se pueden reducir a materiales alquil-solubles. El colorante se aplica en su forma reducida y se oxida en presencia de la fibra.

2.3.2 COLORANTES MÁS UTILIZADOS EN LA INDUSTRIA:

2.3.2.1 Colorantes nitrados y nitrosados:

Son nitro-nitroso derivados del benceno y naftaleno con algún grupo fenólico o amino. El más antiguo de estos colorantes es el “amarillo de alfa naftol”. Se usa especialmente como colorante de los productos que se emplean para la alimentación: Actualmente, los nitrocolorantes más importantes son las nitrofenilaminas, que dan tonos amarillos, naranjas y castaños, tales como el “pardo de amino naftol C”.

2.3.2.2 Colorantes azoicos:

Esta clase de colorantes constituye el mayor grupo de las tinturas. Estos colorantes se preparan acoplando una amina aromática diazotada con un fenol o una amina aromática.

El

más sencillo de estos colorantes es el “amarillo de anilina”, que corresponde al “para-amino azo-benceno”. $C_6H_5 - N = N - C_6H_4NH_2$

Se usa para teñir lana y seda, su color es fugaz. Se emplea para preparar otros colorantes con dos grupos azo.

La Crisoidina: Pertenece al mismo grupo. Se requiere para la preparación del prontosil (con un grupo SO_2NH_2), que es una sulfamida que se utiliza contra los estreptococos.

El Pardo de Bismark: Se emplea en curtiembres para teñir el cuero.

Rojo de Metilo: Es un valioso indicador.

El Rojo Congo: Tiñe el algodón de color rojo, pero el color cambia a azul por la acción de los ácidos minerales. Se emplea, por ello, como indicador.

Naranja de metilo: es un valioso indicador utilizado en la industria de alimentos y análisis químico.

2.3.2.3 Colorantes del Difenil y Trifenil Metano

Son tinturas básicas para lana, seda o algodón, mordentado con ácido tánico. Son colorantes muy estimados por su color brillante. Tienen el inconveniente de no ser resistentes a la luz o al lavado, excepto aplicados a fibras acrílicas. Ejemplo de ellos es el “verde malaquita”.

Violeta de Metilo: Se prepara oxidando la N,N-dimetil anilina con CuCl_2 . Es la tintura empleada en tintas púrpuras, lápices indelebles y cintas para máquinas de escribir, en general para pinturas.

Violeta Cristal: Es importante en la fabricación de la Violeta de Genciana, que se emplea como antiséptico. Se mezcla violeta cristal con violeta de metilo.

Ftaleínas: Aunque no se emplea como tintura, la fenolftaleína es el representante más importante de este grupo. Se usa como indicador de reacciones de ácido-base. Su principal importancia es como medicamento a base de laxantes. Junto con tretaiodofenolftaleína, se

emplea para el examen radiológico de la vesícula, el cual se acumula en la vesícula en forma de lodo pesado, los cuales son opacos a los rayos X.

2.3.2.4 Colorantes indigoides:

Indigo: Es el colorante vegetal utilizado desde la antigüedad. Las vestiduras de las momias egipcias fueron teñidas con índigo. En muchas plantas se encuentra en forma de un glucósido, el indican. La fórmula molecular del índigo es $C_{16}H_{10}N_2O_2$. Es una sustancia insoluble en agua. Es de color azul oscuro con reflejos bronceados. Se aplica en la industria

textil. Es resistente a la luz y al lavado, y su bajo costo hace que sea el colorante azul más empleado.

Púrpura de Tiro: Es un colorante natural, muy empleado por las antiguas civilizaciones. En Creta, se cree que se empleaba ya en el año de 1600 A.C. Se obtenía de unos moluscos de la familia *murex*. Para producir un gramo de púrpura se necesitaban 9.000 moluscos, aproximadamente.

2.3.2.5 Colorantes de Antraquinona

Pertenecen a las tinturas mordientes. El representante más conocido es la alizarina, tintura natural, ya conocida por los antiguos egipcios y persas. Existe en la raíz de la planta conocida como rubia. La alizarina es poligenética, produce diferentes colores, con diferentes mordientes. Con Mg da color violeta, con mordiente a base de calcio da color rojo púrpura, con mordiente de bario da color azul, con aluminio da color rosado, con cromo da color castaño violeta y con hierro (ferroso), da color negro violeta. Se empleó para producir el color rojo turco en el algodón.

2.3.2.6 Colorantes Azufrados o Fosforados

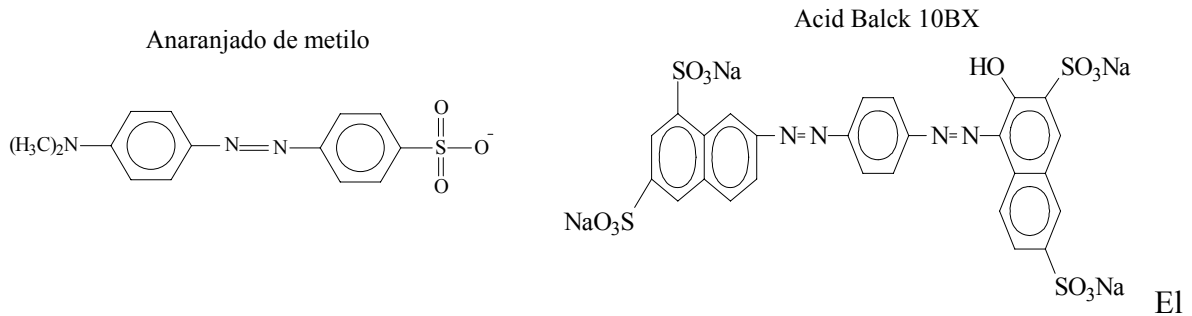
Incluyen a los colorantes preparados por calentamiento de materias orgánicas con azufre y sulfato de sodio (tionación). Los primeros colorantes azufrados eran amarillos y pardos y se producían calentando aserrín, estiércol y azufre. Más tarde, se produjeron tinturas negras, azules, verdes, amarillas y naranjas. Estos colorantes se emplean solamente en tintura de algodón, ya que atacan a las proteínas y fibras de éster.

2.4 TRATAMIENTO ENZIMÁTICO DE LOS EFLUENTES CONTAMINADOS CON COLORANTES ORGÁNICOS

Entre todas las clases químicas de colorantes, los de tipo azo son considerados los más recalcitrantes, no biodegradables y persistentes, y su tratamiento es una de las tareas más desafiantes en la comunidad ambiental.

El tratamiento de estos compuestos se puede llevar a cabo por métodos fisicoquímicos; sin embargo, los problemas de estas técnicas son sus altos costos, la generación de lodos ilimitados y la producción de contaminantes secundarios que pueden llegar a ser más peligrosos que los materiales de partida. No obstante, estos tintes también se pueden biodegradar por los métodos convencionales de tratamiento de aguas residuales. Estos métodos microbianos son los más utilizados y potencialmente ventajosos debido a su eficiencia, compatibilidad con el medio ambiente, menor consumo de energía y uso de reactivos.

Esquema 7: Ejemplos de colorantes tipo azo



pretratamiento enzimático es una alternativa viable a los métodos convencionales debido a su naturaleza selectiva, mínima inhibición por sustancias tóxicas y a que son procesos que pueden operar sobre rangos de alta concentración de sustrato, y bajo tiempo de residencia de la enzima en la reacción [Akasaka,1995].

Las reacciones catalizadas con enzimas son mucho más rentables que los métodos químicos convencionales debido a sus altas velocidades de reacción y estereoespecificidad. Además, las condiciones de operación son mucho menos drásticas, por ejemplo, la temperatura de los ensayos puede ser igual a la del ambiente, lo cual lo convierte en un proceso químico verde.

Las enzimas pueden trabajar sobre compuestos recalcitrantes [Aiteken, 1993] removiéndolos por precipitación o biotransformación, generando alternativas interesantes para el tratamiento de efluentes contaminados. Se ha demostrado que las fuentes de las enzimas tienen una estrecha relación con la capacidad de degradación en los tintes [Bucke, 1998]. Sin embargo, el mayor problema al que se ve enfrentada la biorremediación por enzimas es que hay que lograr mantener su estabilidad en la mezcla de reacción y es por ello que se hace necesario un estudio de la capacidad de la enzima para trabajar en diferentes condiciones tales como; exceso de peróxido de hidrógeno en la mezcla de reacción, temperatura y pH extremos para la estabilidad estructural de la enzima, de manera que mejoren los porcentajes de decolorización de los efluentes y poder usar la enzima en procesos industriales de tratamiento ambiental [Mohan,2005]

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general.

Determinar la capacidad que posee la peroxidasa de palma real (RPP) para llevar a cabo la biotransformación y decolorización de diferentes tipos de colorantes orgánicos en solución.

3.2 Objetivos específicos

- Extraer las (RPP) a partir de las hojas de palma real, *Roystonea regia*.
- Establecer la estabilidad de la enzima frente a la temperatura y el pH.
- Determinar la estabilidad de la enzima frente a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno.
- Determinar las constantes catalíticas y constantes de inactivación para la reacción de (RPP).
- Evaluar la decolorización de los colorantes anaranjado de metilo, violeta de metilo y pardo de Bismark por la (RPP).
- Determinar los valores de pH y temperatura óptimos para la acción de la peroxidasa sobre los colorantes orgánicos.
- Medir el efecto de parámetros tales como: concentración de RPP y H_2O_2 , pH de la fase acuosa, concentración de los sustratos, y tiempo óptimo sobre la velocidad de reacción.

4. MATERIALES Y MÉTODOS:

4.1 MATERIALES

4.1.1 REACTIVOS.

Todos los reactivos para las soluciones y los sustratos utilizados en esta tesis fueron de grado analítico proporcionados por Merck y Sigma Chemical Co.

4.1.2 SUSTRATOS.

Se utilizó guayacol de Sigma-Aldrich Chem. Co, (St. Louis, USA) como sustrato natural de la peroxidasa, peróxido de hidrógeno, 30% (v/v) de Merck (Darmstad, Germany) y diferentes tipos de colorantes orgánicos: Los colorantes utilizados y sus características fisico-químicas fueron los siguientes:

Naranja de metilo. Es un colorante azoico, utilizado como indicador y en la industria de alimentos, Las especificaciones técnicas se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: Características del anaranjado de metilo

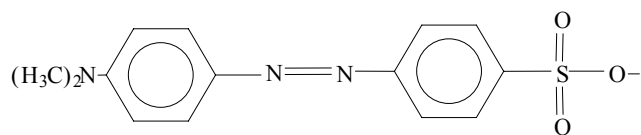
- Nombre común: Anaranjado de metilo

Cas = 547-58-0

Solubilidad: 5g/L (20⁰C)

Riesgos: toxico por ingestión

Estructura:



Pardo de Bismark. Es un colorante azoico utilizado en las curtiembres para teñir el cuero. Las especificaciones técnicas se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: Características del pardo de Bismark

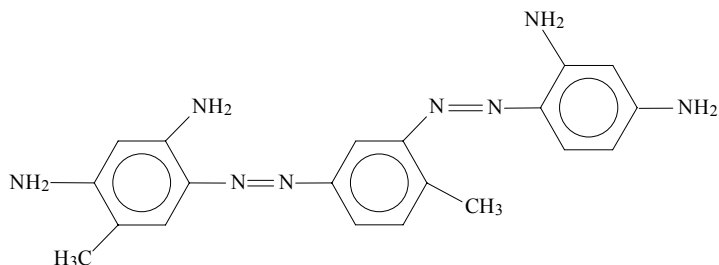
- Nombre común: Pardo de Bismark

Cas: 5421-66-9

Solubilidad: 8g/L (20°C)

Riesgo: Nocivo por ingestión

Estructura:



Violeta de metilo. Es un colorante de difenil metano y es utilizado en las tintas púrpuras, lápices indelebles y cintas para máquinas de escribir. Las especificaciones técnicas se muestran en la siguiente tabla 5.

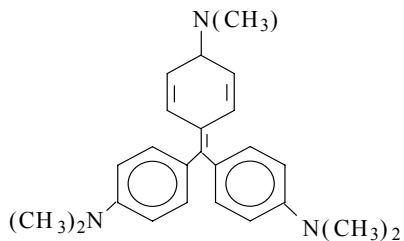
Tabla 5: Características del violeta de metilo.

Nombre común: Violeta de metilo

Cas = 548-62-9

Solubilidad: 30g/L (25°C)

Riesgos: Nocivo por ingestión, posibilidad de efectos irreversibles para la salud.
Estructura:



4.1.3 .ENZIMAS. Se utilizó la peroxidasa de Palma Real (*Roystonea regia*).

4.2 MÉTODOS:

4.2.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE PEROXIDASA DE PALMA REAL (RPP)

La extracción de la enzima se llevó a cabo por el procedimiento reportado por Solano, (2003) y Castillo (2000; 2001). En primer lugar, las hojas fueron lavadas con agua, cortadas en trozos, trituradas en molino de granos y agitadas en shaker con buffer fosfato pH 4.3 como solución extractora. A continuación, la solución resultante se filtró al vacío, para posteriormente realizar despigmentación de la solución filtrada, para este propósito se utilizó polietilenglicol, PEG (PM=10 kDa) al 14%(p/v) y sulfato de amonio al 10%(p/v). Una vez realizado este procedimiento, se separó la fase orgánica de la fase acuosa obtenida, y se almacenó a 4 °C para ser utilizada en los ensayos de biotransformación de los colorantes. La RPP extraída de la hoja de palma real contenía una actividad volumétrica de 90U/mL

4.2.2 DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

Se cuantificó el contenido de proteínas en un espectrofotómetro marca spectronic 20 Genesis mediante el método de Bradford (1975) y utilizando como curva patrón soluciones de albúmina de suero de bovino (BSA) entre 0.1 y 1 mg/mL.

4.2.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA RPP

La determinación de la actividad de la RPP fue realizada por análisis colorimétrico en un espectrofotómetro (Merk, Espectrocuant super nova 400) utilizando como sustrato guayacol y peróxido de hidrógeno.

Los ensayos fueron realizados a 25 °C y buffer fosfato 50 mM de pH 6.0, H₂O₂ 4.8 (mM), guayacol a 0.2% (p/v), con diluciones enzimáticas (1/10; 1/25; 1/50; 1/75; 1/100; 1/500). La velocidad de formación del producto de reacción, el tetraguayacol, fue monitoreada a

470nm utilizando como coeficiente de extinción molar del guayacol un valor de $5200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [Doerge, 1997].

4.2.4. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD FRENTE A TEMPERATURA Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.

Se determinó la estabilidad térmica de la RPP en un intervalo de temperatura entre (60-96°C), utilizando como sustrato la mezcla, buffer fosfato 50 mM de pH: 6.0, H_2O_2 4.8 (mM), y guayacol 0.2 % (p/v).

Se cuantificó para diferentes tiempos de reacción (5, 10 15 30 minutos), como disminuía la velocidad de formación del tetraguayacol por desactivación térmica de la RPP, y se estableció la constante de inactivación para cada temperatura.

Se incubaron 3mL del extracto enzimático a cada una de las temperaturas y tiempos establecidos. Posteriormente, se dejó que el extracto alcanzara temperatura ambiente y se midió su actividad con el sustrato.

La estabilidad frente al peróxido de hidrogeno del extracto enzimático, se determinó en un intervalo de (0.1-1mM), utilizando como sustrato, buffer fosfato 50mM de pH: 6.0, H_2O_2 4.8 (mM), guayacol (0.2%(p/v)).

Se cuantificó para diferentes tiempos de incubación en cada concentración como disminuía la velocidad de formación del tetraguayacol, y se estableció la caída en la actividad para cada concentración de peróxido de hidrógeno. Se incubaron 3 mL de una disolución (1:100) del extracto enzimático con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno en un rango de 0.1 a 1mM. Posteriormente, se midió la actividad de la RPP a diferentes tiempos.

4.2.5 ESTUDIO DEL EFECTO DE VARIABLES AMBIENTALES SOBRE LA DECOLORIZACIÓN DE COLORANTES ORGÁNICOS.

Se llevaron a cabo varios experimentos de biotransformación variando los parámetros ambientales: pH desde (3-10), H₂O₂ desde (0.1-10 mM), concentración de los colorantes (1.8-23mg/L) y RPP (1.8-9U), dejando el tiempo de reacción constante y así se determinaron los valores óptimos de los parámetros para los procesos de degradación. Inicialmente, se determinó para cada uno de los colorantes la longitud de onda analítica (λ_{max}) de absorción por barrido en el UV-VIS entre (250-700nm.) en un espectrofotómetro UV-visible (Merck, espectroquant super nova 400 y Perkin Elmer, lamda 4B).

4.2.6 ANÁLISIS POR HPLC DE LA REACCIÓN CATALIZADA POR LA PEROXIDASA.

La cromatografía de alta resolución HPLC, se utilizó para realizar el análisis cualitativo de los productos de oxidación de la reacción de los colorantes con la peroxidasa de palma real. Para este propósito la reacción se realizó con la proteína insolubilizada, en forma de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs). Los CLEAs de RPP fabricados para la remoción de los colorantes, se utilizó etanol al 70% (v/v) como agente precipitante de 1mL del extracto de RPP, glutaraldehído al 1 % como agente entrecruzante, y se dejaron en agitación por 12 horas, después se lavaron con buffer fosfato pH 6.0, dos veces, y se centrifugó para obtener la enzima inmovilizada [Linqui, 2005].

Se utilizó un HPLC (Agilent 1100 series) con columna en fase reversa (eclipse XDB-C18 4.6* 150 mm, empacada con partículas de 5 μ m de tamaño). La separación de los productos de oxidación del naranja de metilo y pardo de Bismark fueron detectado a 225nm. Se utilizó como fase móvil la mezcla de solventes metanol- agua en proporción 80:20 (v/v), con un flujo de 0.5 mL/min. Las muestras sin tratamiento enzimático y con los productos de la oxidación fueron diluidas en proporción 1/20 y se detectaron 10 minutos después de la inyección

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 ESTUDIOS DE ESTABILIDAD ENZIMÁTICA.

5.1.1 CÁLCULO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

En una primera etapa, se determinó el rango de linealidad de la peroxidasa de palma, para determinar la mejor dilución para trabajar posteriormente en los experimentos de decolorización de las moléculas previamente seleccionadas. y conocer las unidades de actividad de la enzima (U), que se utilizarían en cada experimento. En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos de los estudios de rango de linealidad de la peroxidasa de palma.

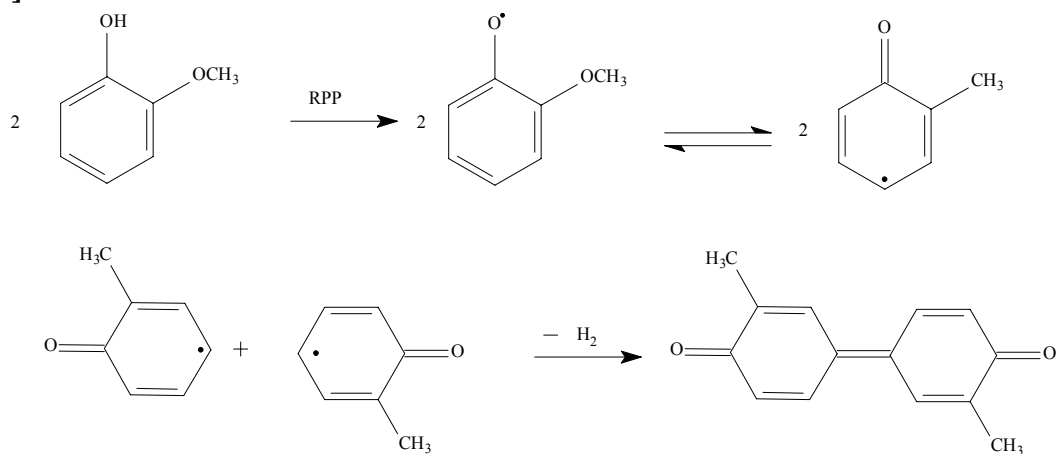
Tabla 6: Actividades volumétrica y específica del extracto enzimático:

Dilución	Actividad volumétrica (U/mL)	Actividad Especifica (U/mg)
1/10	93	660
1/25	89	631
1/50	88	624
1/75	88	624
1/100	93	660
1/500	88	624
Promedio	90 ± 2.2	637 ± 16.3

La peroxidasa de palma presenta en promedio un valor de actividad específica de 637 ± 16 U/mg de proteína, debido a esto se considera la RPP como una especie catalíticamente

activa sobre el guayacol, y esto permite llevar a cabo los estudios de remoción sobre los colorantes orgánicos. En el esquema 7 se muestra la reacción del guayacol con la peroxidasa de palma.

Esquema 8: Mecanismo propuesto para la reacción del guayacol con RPP [Solano, 2003].



En el primer paso la RPP, oxida una molécula de guayacol para formar el Cpd II, posteriormente reacciona con otra molécula de guayacol para regresar a su forma nativa. Los dos radicales que se formaron en este ciclo, se unen para formar la especie oxidada del guayacol, tetraguaiacol.

En los anexos 1 y 2 se muestran las curvas para determinar proteínas y de cada una de las diluciones, así como los cálculos para determinar el contenido proteico, la actividad volumétrica y específica.

5.1.2 ESTABILIDAD DE RPP POR TEMPERATURA.

Las siguientes figuras muestran como cambia la actividad volumétrica de la RPP a diferentes tiempos de incubación, manteniendo la temperatura constante.

Figura 1: Estabilidad térmica de RPP soluble a diferentes temperaturas

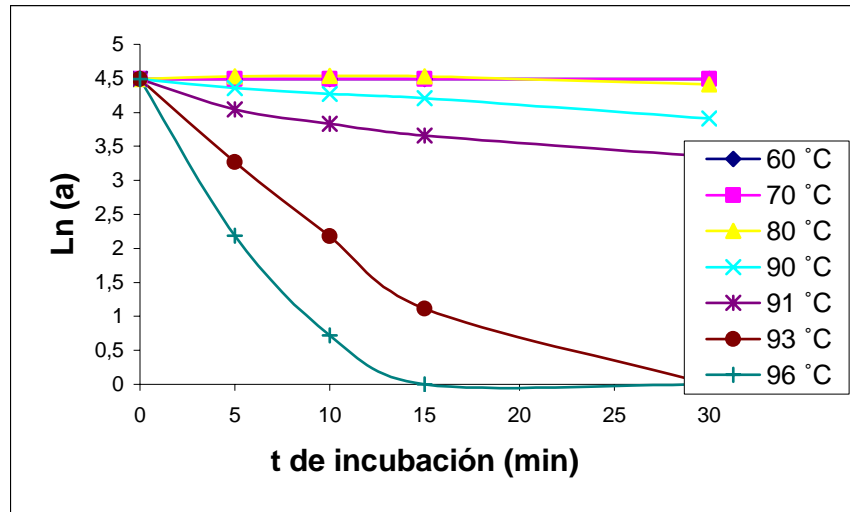
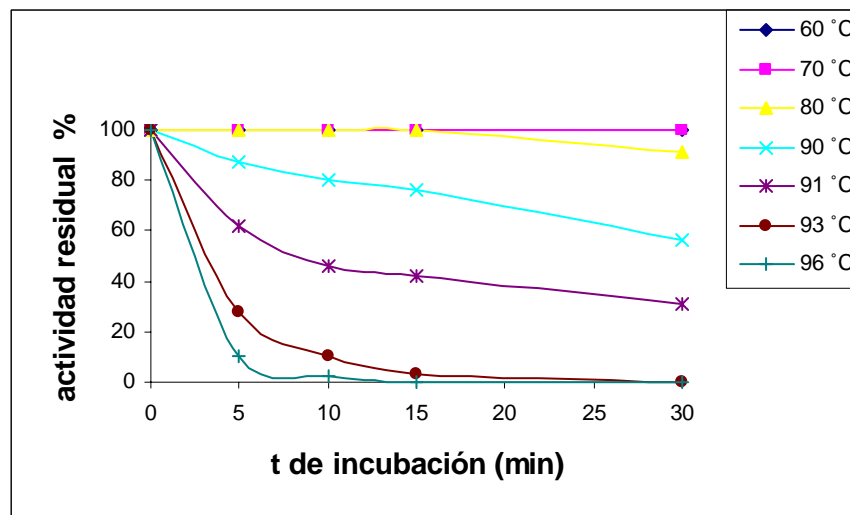


Figura 2: Estabilidad térmica de RPP soluble a diferentes temperaturas



En las figuras 1 y 2, y en la Tabla 7, se muestran los resultados de estabilidad de la enzima soluble frente a las diferentes temperaturas evaluadas. En ellas se puede observar que la peroxidasa de palma real mostró gran estabilidad térmica en su forma soluble, manteniendo su actividad enzimática constante a temperaturas de 70 °C en los tiempos estudiados. No obstante, la estabilidad de la enzima comienza a decaer a temperaturas mayores 80 °C, siendo unas 20 veces menos estable a 93 °C que a 80 °C.

En la figura 1, se observa claramente la dependencia de la actividad catalítica de la RPP con la temperatura, a medida que ésta aumenta, la proteína pierde totalmente su actividad. Esto se debe a que la proteína se desnatura con mayor facilidad a temperaturas altas, por efecto del rompimiento de las interacciones intermoleculares que mantienen su estructura tridimensional.

En la tabla 7 se muestran las constantes de inactivación de la RPP, para diferentes temperaturas. A medida que la temperatura aumenta, la constantes de inactivación también se incrementan, lo que significa que entre más alta sea la temperatura del medio de reacción más alta será la frecuencia de desactivación de la proteína.

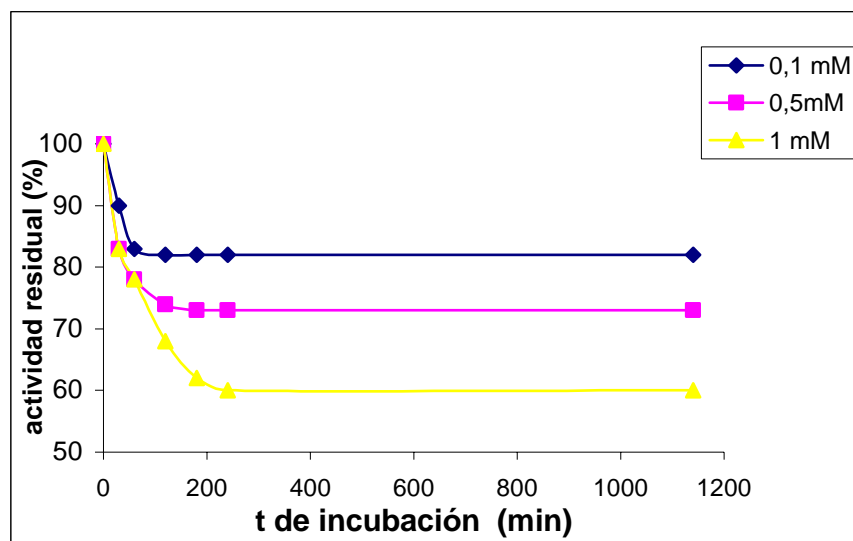
Tabla 7: Constantes de inactivación térmica para la RPP soluble

T (°C)	k_i (seg ⁻¹)
80	0.0068
90	0.0186
91	0.034
93	0.146
96	0.298

5.1.3 ESTABILIDAD ENZIMÁTICA FRENTE A PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.

En las siguientes figuras se puede apreciar el efecto de inactivación suicida que sufre la peroxidasa por el efecto del peróxido de hidrógeno.

Figura 3: Estabilidad de la RPP frente al peróxido de hidrógeno.



La figura 3 muestra la destrucción que sufre la molécula de peroxidasa, por el efecto suicida. A medida que se aumenta la concentración de peróxido de hidrógeno, la actividad cae hasta un 60 %, que en la reacción con cada uno de los colorantes se ve reflejado en una alta disminución en la remoción, debido a que el centro activo de la proteína se destruye, liberando al hierro porfirínico a la solución como Fe (III) [Vásquez-Duhalt, 2002].

La proteína solo pierde un 20 % de su actividad catalítica a 1 hora de reacción con H_2O_2 . Debido a esto se puede pensar que el efecto de inactivación suicida no solo está regido por la cantidad de peróxido de hidrógeno, sino que también depende del tiempo de reacción entre el peróxido y la enzima.

Teniendo en cuenta un modelo cinético de primer orden se calcularon las constantes de inactivación para peróxido (anexo 3).

Figura 4: Estabilidad de la RPP frente al peróxido de hidrógeno

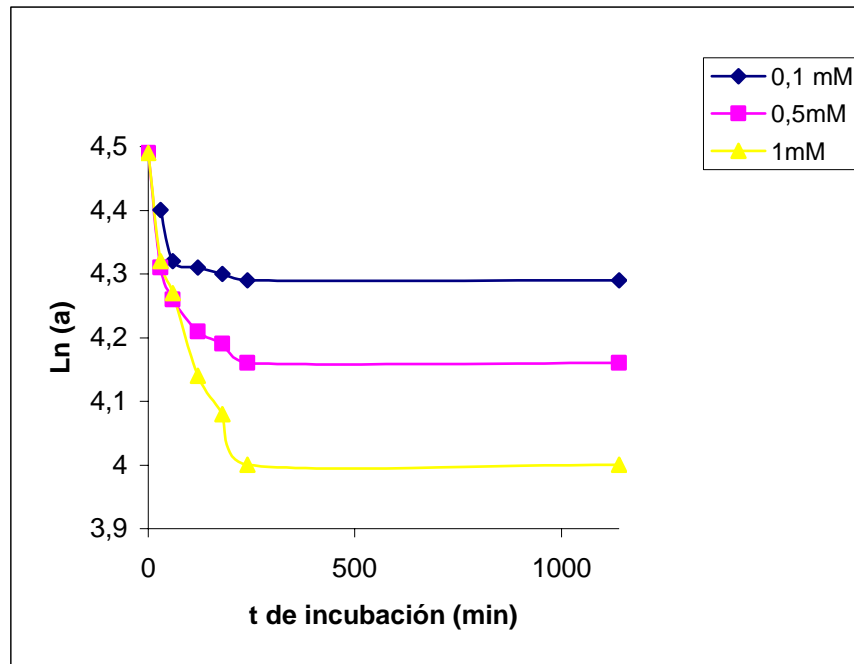


Tabla 8: Constantes de inactivación por peróxido de hidrógeno.

[H ₂ O ₂] mM	K _i seg ⁻¹ x 10 ⁻⁵
0.1	1.1
0.5	1.8
1	3

En la figura 4 y la tabla 8 se observa un efecto de desactivación de la peroxidasa de palma por el peróxido de hidrógeno. En consecuencia las reacciones se llevaron a cabo en un límite de concentración de peróxido que no causara una inactivación total de la proteína, de modo que la remoción de los colorantes fuera efectiva.

5.2 BIOTRANSFORMACIÓN DE LOS COLORANTES

En primer término, se calcularon las longitudes de onda de máxima absorción para cada uno de los colorantes en el ultravioleta – visible. Los resultados fueron los siguientes:

Anaranjado de metilo: 504nm.

Violeta de metilo: 588nm.

Pardo de Bismark: 450nm.

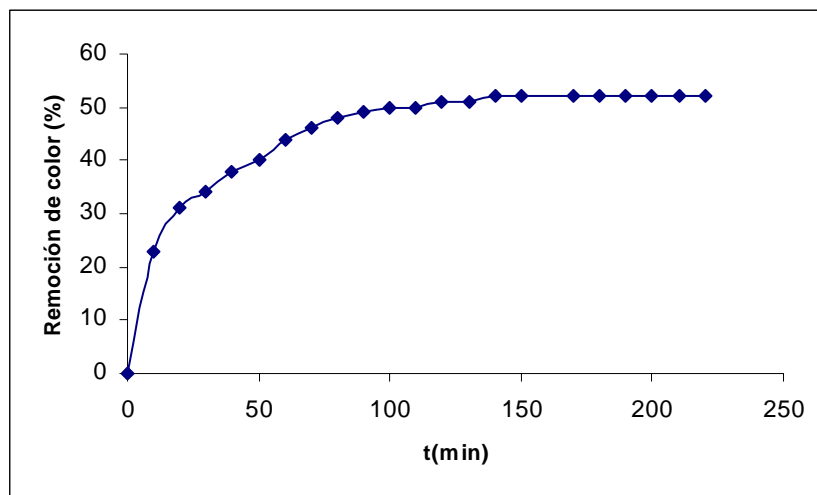
Se determinó para cada uno de los colorantes la velocidad de la reacción con RPP por espectrofotometría VIS y de esta manera se cuantificaron los porcentajes de remoción.

5.2.1 BIOTRANSFORMACIÓN DE ANARANJADO DE METILO:

La reacción para determinar el tiempo óptimo de contacto se hizo en una serie de viales que contenían 3mL de la mezcla de reacción: buffer fosfato 50 mM de pH: 3.0, concentración de colorante: 16mg/L, H₂O₂ 0.5mM y 9U de RPP.

En la figura 5 se observa que la reacción de decolorización es significativa hasta 140 minutos, alcanzando un porcentaje de remoción de color del 52%.

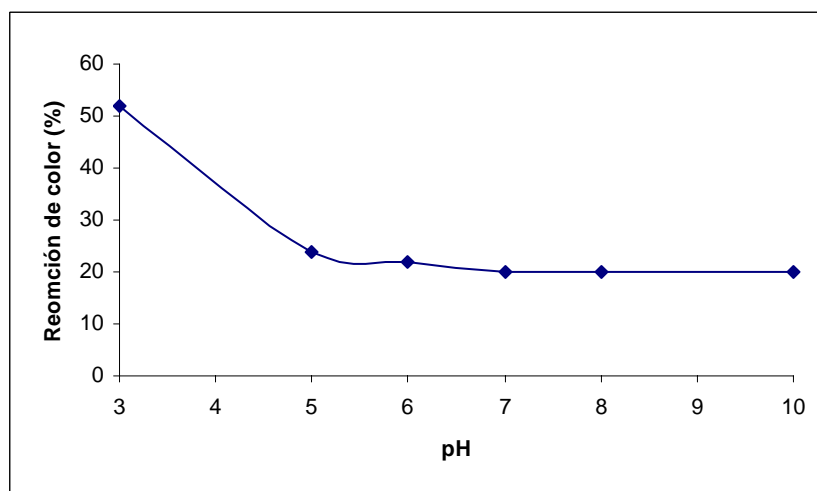
Figura 5: Cinética de la remoción naranja de metilo con RPP.



Posteriormente, se optimizó el pH en un rango de 3-10, donde cada 3mL de mezcla de reacción contenía: 16mg/L de tinte, H₂O₂ 0.5mM y 9U de RPP.

En la figura 6 se observan los resultados obtenidos con el efecto del pH sobre la decoloración de naranja de metilo. En ella se puede ver que el valor máximo de remoción para la reacción catalizada con RPP fue de 52% para un pH de 3.0

Figura 6: Efecto de pH en la biotransformación de metil naranja con RPP.

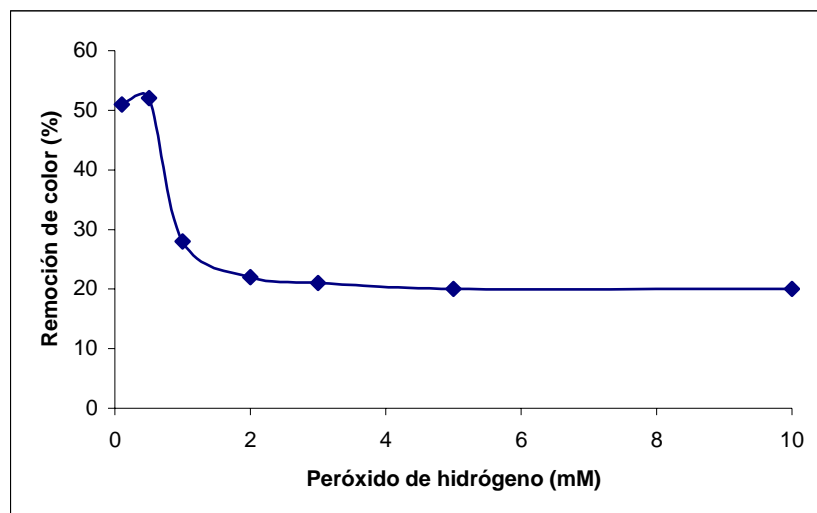


El peróxido de hidrógeno oxida a la enzima llevándola a una forma reactiva en la cual la RPP esta en capacidad de transformar dos moléculas de sustrato vía radicales libres para

volver a su forma nativa (Valderrama, 2002). Cuando la concentración del peróxido no es la óptima, la enzima puede sufrir desactivación, lo que se ve reflejado en la disminución de la actividad catalítica de la RPP.

De esta manera, se optimizó la concentración de peróxido de hidrógeno en un rango de 0.1-10mM, donde 3mL de la mezcla de reacción estaba compuesta de: Solución de fosfato 50 mM de pH 3.0, anaranjado de metilo 16mg/L, 9U de RPP y un tiempo de reacción de 140 min. En la figura 7, se observa que el valor óptimo de peróxido de hidrógeno para realizar la decolorización del anaranjado de metilo es de 0.5mM.

Figura 7: Efecto de la concentración H_2O_2 en la reacción de remoción de anaranjado de metilo con RPP



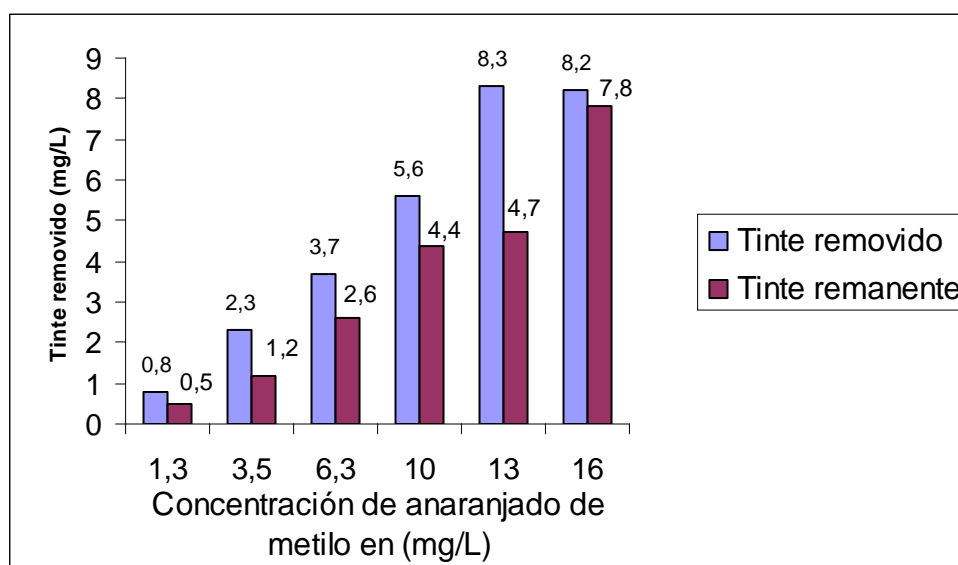
La concentración del sustrato tiene una fuerte influencia en las reacciones catalizadas con enzimas. Se puede incrementar la concentración del tinte hasta que la enzima alcance el grado de saturación de los sitios activos y entonces la velocidad no tendrá cambios significativos.

Para evaluar el efecto de concentración del colorante se realizaron mediciones de decolorización para valores diferentes de concentración de colorante (entre 1.3-16mg/L).

La reacción se llevó a cabo en Buffer fosfato pH 3.0, H₂O₂ 0.5mM, 9 U de RPP y un tiempo de reacción de 140min.

En la figura 8 se puede observar que a una concentración de 13mg/L de anaranjado de metilo se satura la RPP y si se incrementa la concentración del colorante no aumentará su remoción.

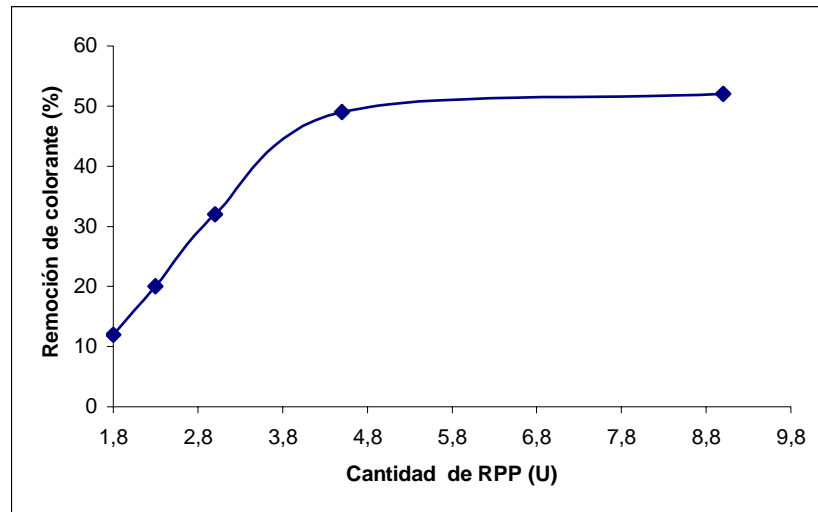
Figura 8: Efecto de la concentración de anaranjado de metilo en la reacción catalizada con RPP.



La figura 8 muestra que la enzima logra degradar 8.3mg/mL de colorante como valor máximo. Por consiguiente, si se sigue aumentando la concentración de colorante en el medio de reacción y se mantienen constantes las 9 U de peroxidasa la remoción no superará los 8.3 mg/mL.

La capacidad de transformación del sustrato depende de la cantidad de enzima, sin embargo, el valor óptimo de la concentración enzimática es independiente de la cantidad de tinte utilizado. Las unidades de enzima se variaron en un rango de (1.8-9U). La mezcla de reacción estaba compuesta por: Buffer fosfato 50 mM de pH 3.0, H₂O₂ 0.5mM, metil naranja 16 mg/L, tiempo de reacción 140min.

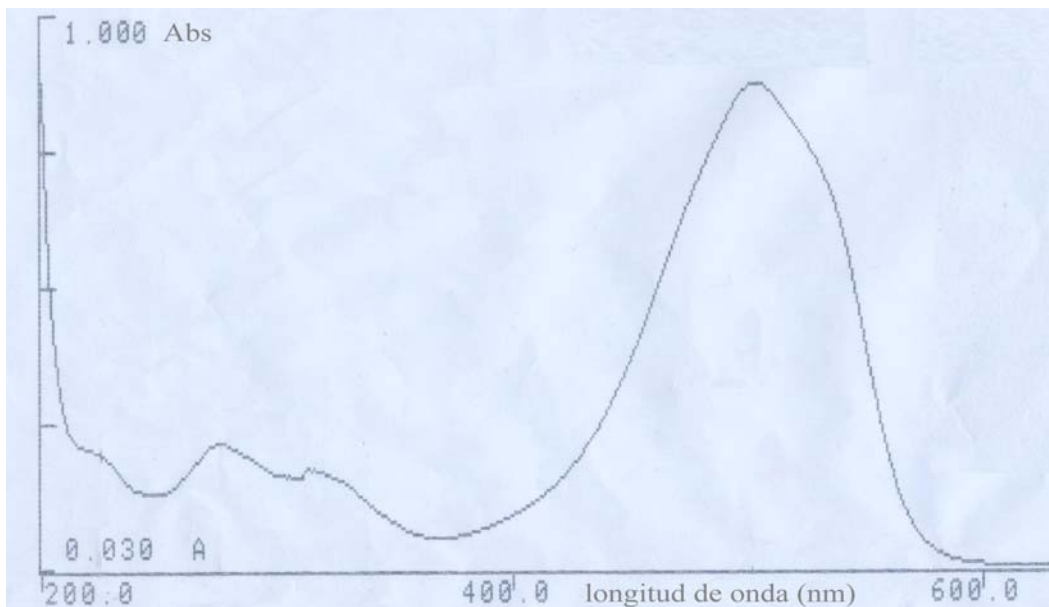
Figura 9: Efecto de cantidad de RPP sobre la remoción del colorante.



Los resultados muestran que en el intervalo entre 4.5-9U la remoción no aumenta significativamente con el aumento de enzima añadida a la mezcla de reacción. Por consiguiente, la reacción se puede realizar con 4.5U de enzima alcanzando una remoción de 49%.(ver figura 9)

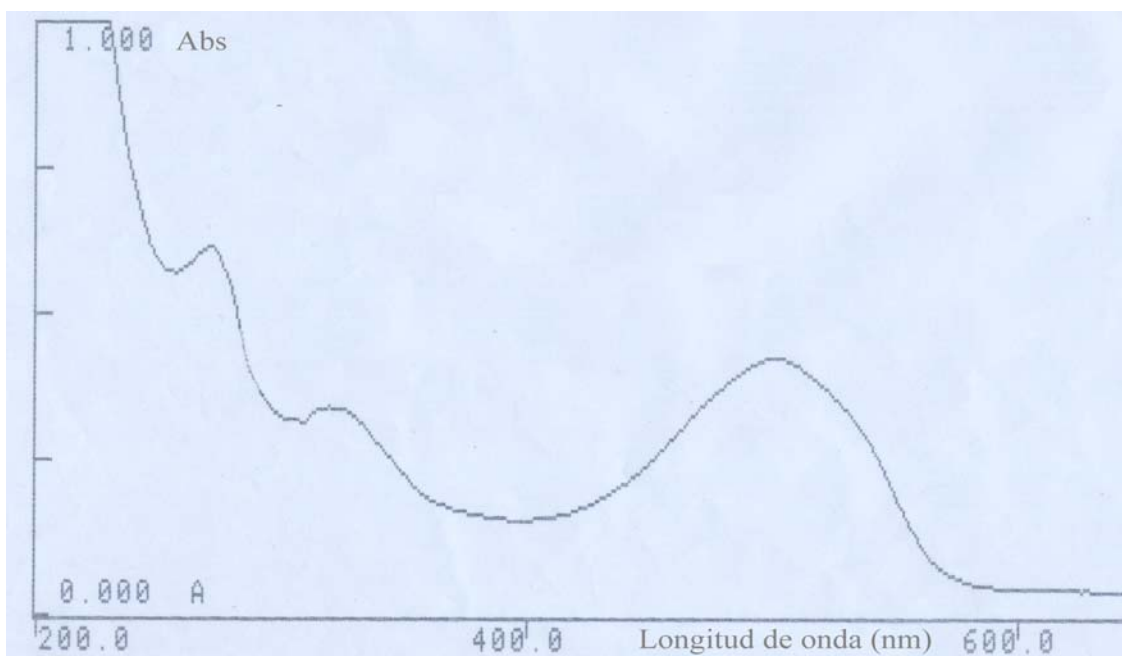
A su vez, se evaluaron los espectros de absorción del colorante sin tratar y tratado con RPP, para ello se valoró la reacción con los parámetros óptimos obtenidos para la reacción con la enzima libre.

Figura 10: Espectro de absorción del naranja de metilo



Como se observa en la figura 10, la longitud de onda de máxima absorción corresponde a 504nm. El carácter de cromóforo de este colorante, puede ser debido al grupo azoico que se encuentra en la estructura molecular del colorante. Al destruirse este grupo, la banda de absorción debe disminuir su intensidad (Ver Fig. 11).

Figura 11: Espectro de absorción del naranja de metilo tratado con RPP



De acuerdo con los resultados obtenidos en las experiencias anteriores, en la Tabla 8 se muestran los valores óptimos de los parámetros de reacción enzimática con naranja de metilo.

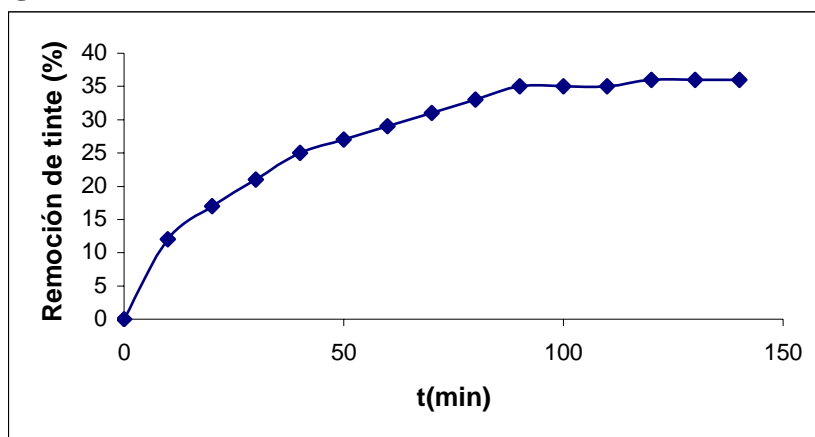
Tabla 9: Parámetros óptimos para la reacción del metil naranja con RPP

Parámetro	Unidades	Valor
Tiempo de contacto enzima - sustrato	minutos	140
pH	-	3.0
Peroxido de Hidrógeno (H ₂ O ₂)	mM	0.5
[Naranja de Metilo]	mg/L	13
Dosis RPP	U de guayacol	4.5
Remoción	%	64

5.2.2 BIOTRANSFORMACIÓN DE PARDO DE BISMARCK.

Inicialmente se optimizó el tiempo de reacción enzimática de decolorización del colorante. La composición del medio de reacción fue: buffer fosfato 50 mM de pH: 3.0, concentración de colorante 23mg/L, H₂O₂ 0.5mM, RPP 9U, en un volumen de ensayo de 3mL.

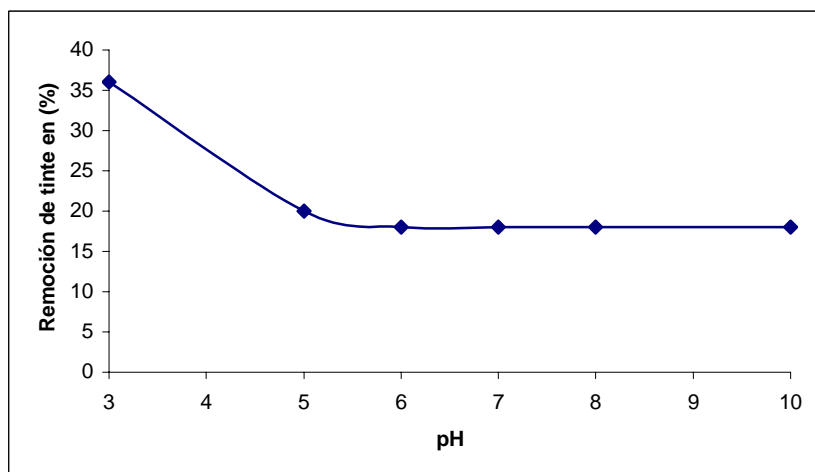
Figura 12: Cinética de remoción de Pardo de Bismark con RPP



En la figura 12 se observa que para un tiempo de 90 min se alcanza un máximo de remoción del 35%. Así que todos los ensayos de optimización para este colorante fueron hechos a 90min.

A continuación, se evaluó el efecto del pH sobre la remoción en un rango de pH de 3-10, donde 3mL de mezcla de reacción contenía: 23mg/L de tinte, H₂O₂ 0.5mM, y 9U de RPP.

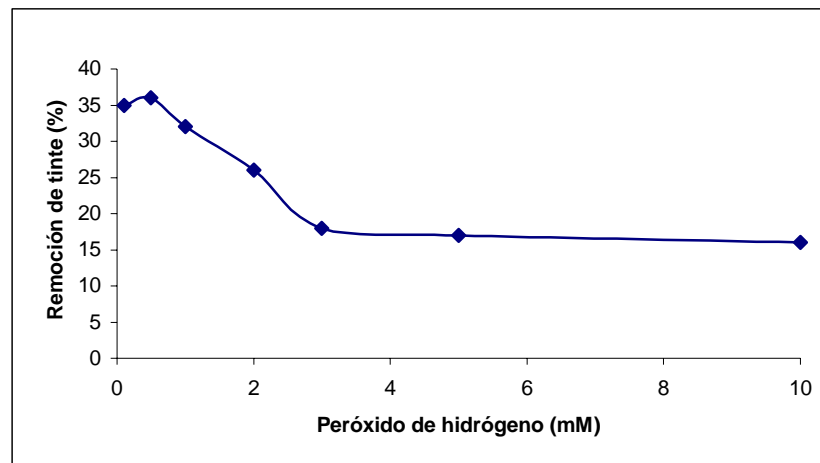
Figura 13: Efecto de pH en la biotransformación de pardo de Bismark con RPP.



En la figura 13 se observa que a pH 3.0 se alcanza un valor máximo en la remoción, alcanzando una decolorización de 37%. La capacidad de decolorización depende en forma lineal del potencial redox de la RPP, y éste a su vez es inverso al pH de la solución. Esto significa que el potencial de oxidación de la peroxidasa aumenta con la disminución del pH [Zille, 2004].

Posteriormente, se optimizó la concentración de peróxido de hidrógeno en un rango de 0.1-10mM, donde 3mL de la mezcla de reacción estaba compuesta de: Buffer fosfato pH 3.0, pardo de Bismark 23mg/L, RPP 9U. Tiempo de reacción 90min.

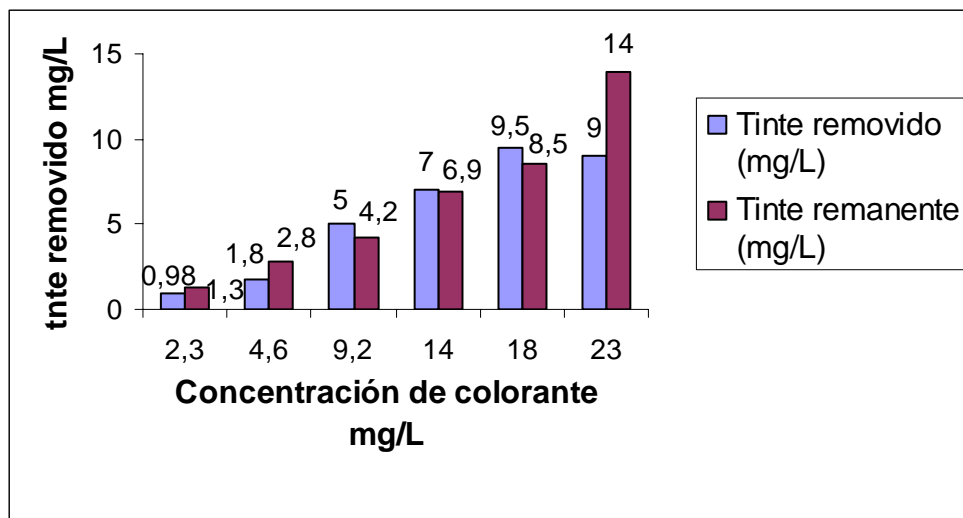
Figura 14: Efecto de la concentración H_2O_2 en la reacción de remoción con RPP



En la figura 14 se muestra que la concentración óptima de peróxido de hidrógeno para lograr 37% en el proceso de remoción de pardo de Bismark fue 0.5mM. Si se aumenta esta concentración se genera un efecto de inactivación suicida.

Posteriormente, los estudios se realizaron para valores diferentes de concentración de colorante entre 2.3-23mg/L. La reacción estaba compuesta de: Buffer fosfato 50 mM de pH 3.0, H_2O_2 0.5mM, RPP 9U, tiempo de reacción 90 min.

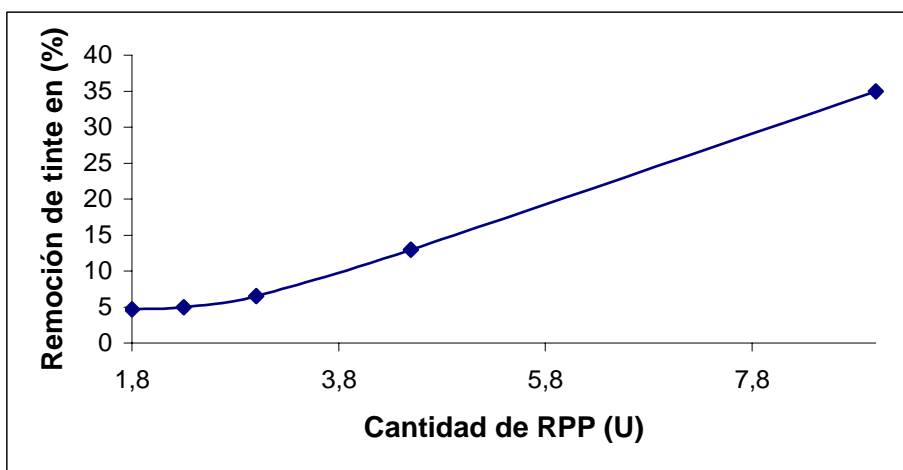
Figura 15: Efecto de la concentración del pardo d Bismark en la reacción catalizada con RPP.



Como se observa en la figura 15, El valor óptimo en la concentración es de 18 mg/L, debido a que si se sigue aumentando la concentración de sustrato, la remoción no aumentará, por consiguiente se alcanza un valor en la remoción de color de 53 %.

Consecutivamente se optimizaron las unidades de enzima variándose en un rango de 1.8-9U. La mezcla de reacción estaba compuesta por: Buffer fosfato pH 3.0, H₂O₂ 0.5mM, pardo de Bismark 23mg/L y un tiempo de reacción de 90min.

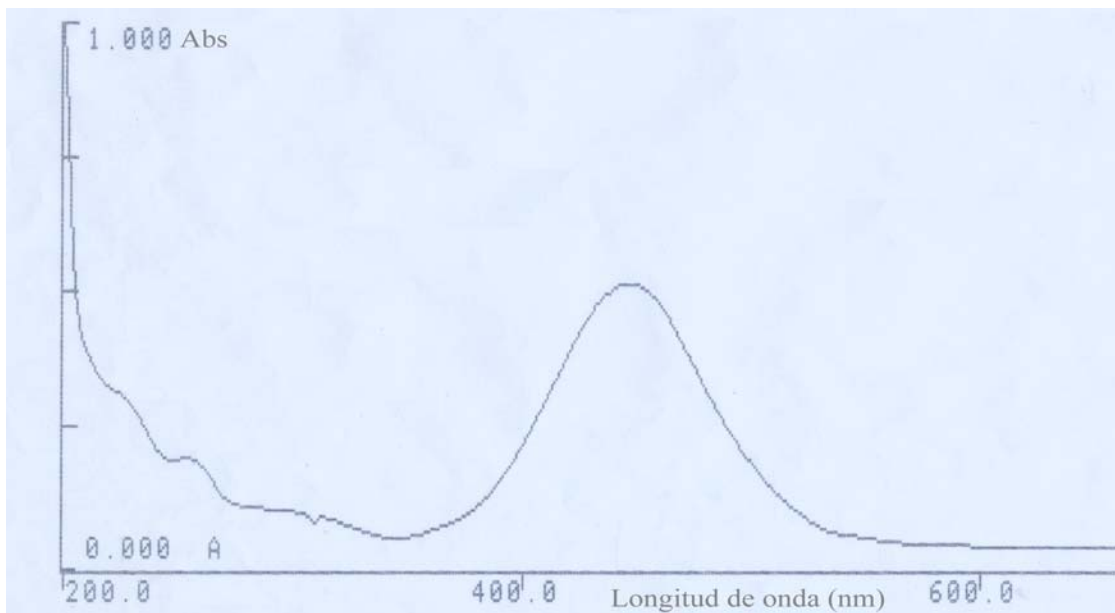
Figura 16: efecto de la cantidad de RPP en la remoción de colorante



La figura 16 muestra que con 9 unidades de RPP la reacción de biotransformación es más efectiva alcanzando un valor de 35% en la remoción. Además, es claro que no se presenta ningún fenómeno de saturación de los sitios activos de la proteína, lo que sugiere que bajo estas condiciones si se aumenta la cantidad de biocatalizador se deberían alcanzar mayores valores de remoción de color.

Las figuras 17 y 18 muestran los espectros de absorción del pardo de Bismark, sin tratar y tratado con RPP.

Figura 17: Espectro de absorción del Pardo de Bismark



La longitud de onda de máxima absorción para el pardo de Bismark en el visible es 450nm. Esta banda de absorción obedece, a las transiciones que se presenta en la molécula por los grupos azo, y las conjugaciones con las demás insaturaciones del sistema. Al alterarse este sistema por acción de la peroxidasa, esta banda debería disminuir su intensidad.

Figura 18: Espectro de absorción del Pardo de Bismark, tratado con RPP.

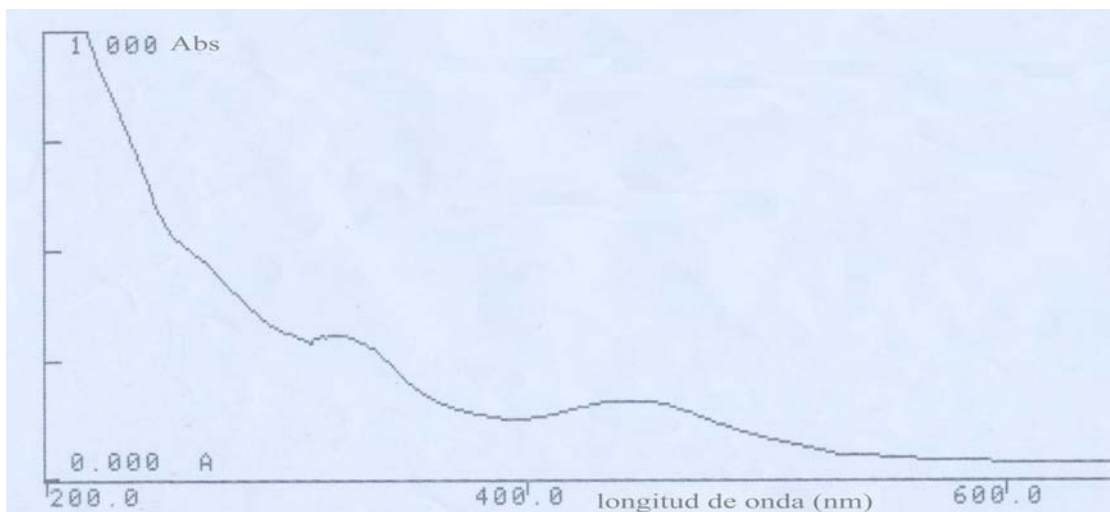


Tabla 10: Parámetros óptimos para la reacción del pardo de Bismark con RPP.

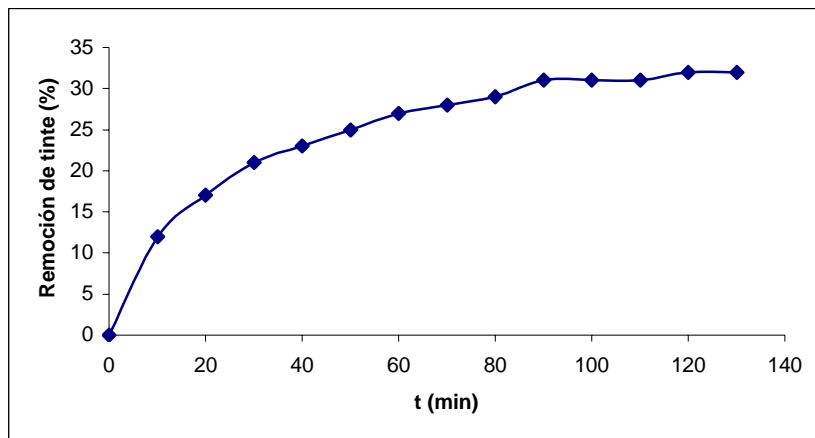
Parámetro	Unidades	Valor
Tiempo de contacto enzima - sustrato	minutos	90
pH	-	3.0
Peroxido de Hidrógeno (H ₂ O ₂)	mM	0.5
[pardo de Bismark]	mg/L	18
Dosis RPP	U de guayacol	9
Remoción	%	52

5.2.3 BIOTRANSFORMACIÓN DE VIOLETA DE METILO.

Inicialmente se optimizó el tiempo de reacción. La composición del medio de reacción fue: buffer fosfato pH: 3.0, concentración de colorante 9mg/L, H₂O₂ 0.5mM, y 9U de RPP, en

un volumen de total de 3mL. La reacción se detuvo cuando el porcentaje de remoción del colorante se mantuvo constante, y de esta forma se definió el tiempo óptimo de reacción.

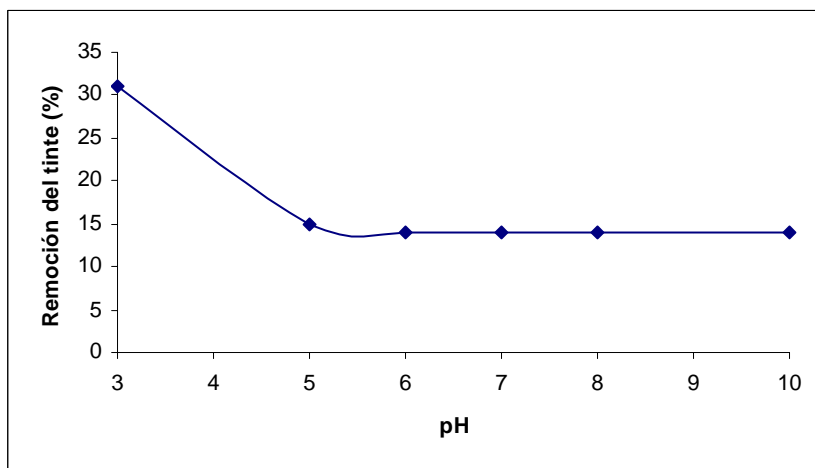
Figura 19: Cinética de la remoción de violeta de metilo con RPP.



En la figura 19 se observa que se alcanza una remoción máxima de 32% en 90 min. Después de este tiempo, la decolorización no aumenta porque se estarían saturando los sitios activos de la proteína. Todos los ensayos de optimización de los parámetros estudiados se realizaron para 90 min y 25 °C.

En la remoción de violeta de metilo se optimizó el pH en un rango de 3-10, donde cada 3mL de mezcla de reacción contenía: 9mg/L de tinte, H₂O₂ 0.5mM, y 9U de RPP.

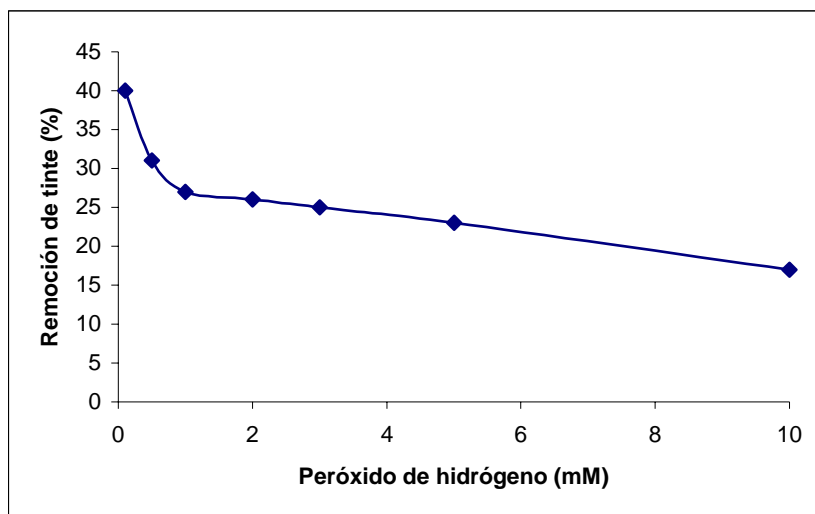
Figura 20: Efecto de pH en la biotransformación de Violeta de metilo con RPP



La figura 20 se observa que el mayor porcentaje de remoción se alcanza a un pH de 3.0 con un valor de 31%. Nuevamente se obtiene un efecto del pH en la decolorización, que está a su vez relacionado con el potencial de oxidación de la proteína. El potencial de oxidación de la RPP, aumenta con la disminución del pH. No es posible trabajar a pHs más bajos debido a que muy probablemente la enzima se desnaturaliza, perdiendo así su actividad catalítica.

Se optimizó la concentración de peróxido de hidrógeno en un rango de 0.1-10mM, donde 3mL de la mezcla de reacción estaba compuesta de: Buffer fosfato pH 3.0, Violeta de metilo 9mg/L, 9U de RPP y un tiempo de reacción de 90min.

Figura 21: Efecto de la concentración de H_2O_2 en la reacción de remoción con RPP

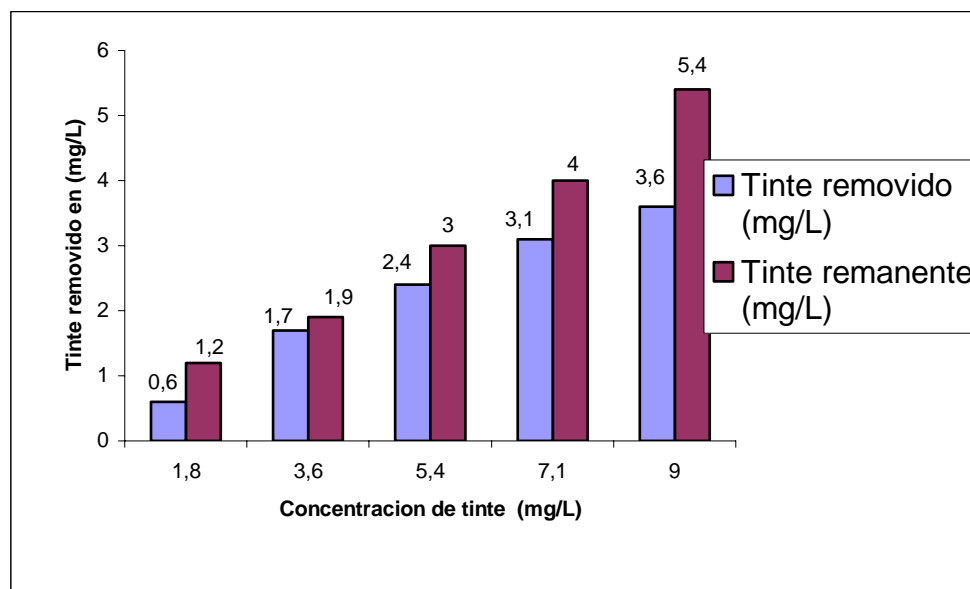


La figura 21 muestra que la concentración óptima de peróxido de hidrógeno es de 0.1mM para el proceso de biotransformación del colorante. A valores mayores de H_2O_2 se produciría el efecto de inactivación suicida.

Posteriormente, se realizó la reacción de biotransformación a diferentes valores de concentración de colorante entre 1.8-9mg/L. La reacción se llevó a cabo en: Buffer fosfato pH 3.0, H₂O₂ 0.5mM, 9U de RPP, tiempo de reacción 90 min.

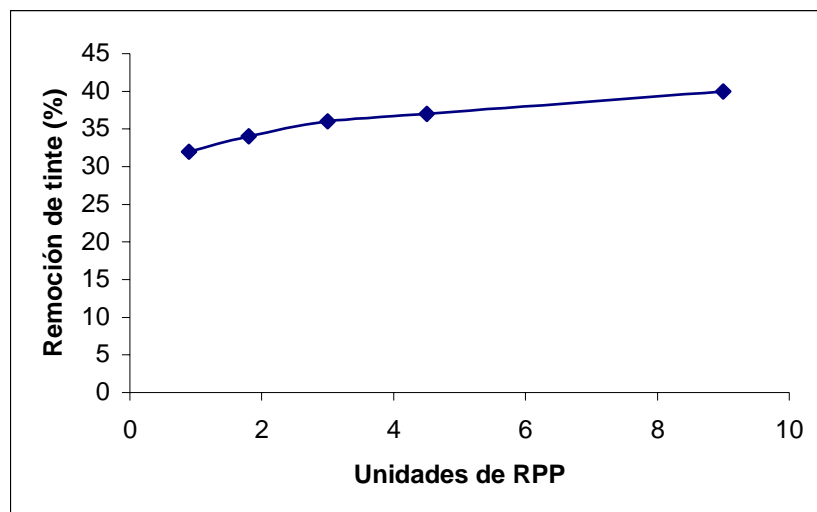
La figura 22 muestra que para una concentración de 9mg/L de violeta de metilo, la remoción alcanza un 40% Por consiguiente, si se aumenta la concentración de tinte, la reacción de biotransformación no aumentará significativamente, debido a que la proteína probablemente se encuentre saturada y por esto queda colorante sin remover.

Figura 22: Efecto de la concentración de violeta de metilo en la reacción catalizada con RPP.



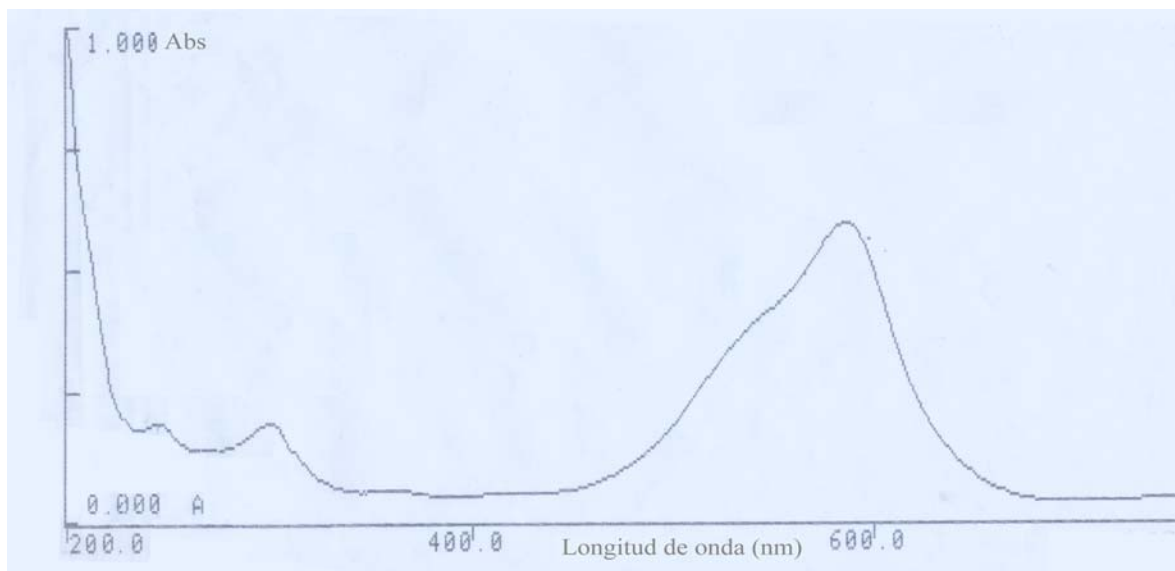
Finalmente, se evaluó el efecto de la cantidad de unidades de enzima sobre la velocidad de biotransformación, utilizando un rango de 0.9-9 U de peroxidasa. La mezcla de reacción estaba compuesta por: Buffer fosfato pH 3.0, H₂O₂ 0.5mM, Violeta de metilo 9mg/L, y un tiempo de reacción 90min.

Figura 23: Efecto de la dosis de RPP en al remoción de colorante



Como se observa en la figura 23, la cantidad de enzima no influye de manera clara en los procesos de remoción, debido a que para 4.5U se obtiene un rendimiento de 37% y para 9U se obtiene un rendimiento de 40 %. En consecuencia, no se produjo una variación considerable en el rango estudiado. Por lo tanto, se decidió trabajar con 4.5 U para llevar a cabo el proceso de remoción del colorante.

Figura 24: Espectro de absorción del Violeta de metilo



De la figura 24, se puede ver que la longitud de onda de máxima absorción en el visible para este tinte es de 588nm. Este espectro de absorción se puede producir por el sistema

conjugado de enlaces π , que tiene la molécula. Al alterarse este sistema π conjugado, la banda de máxima absorción debería disminuir, tal como se muestra en la figura 25.

Figura 25: Espectro del Violeta de metilo tratado con RPP.

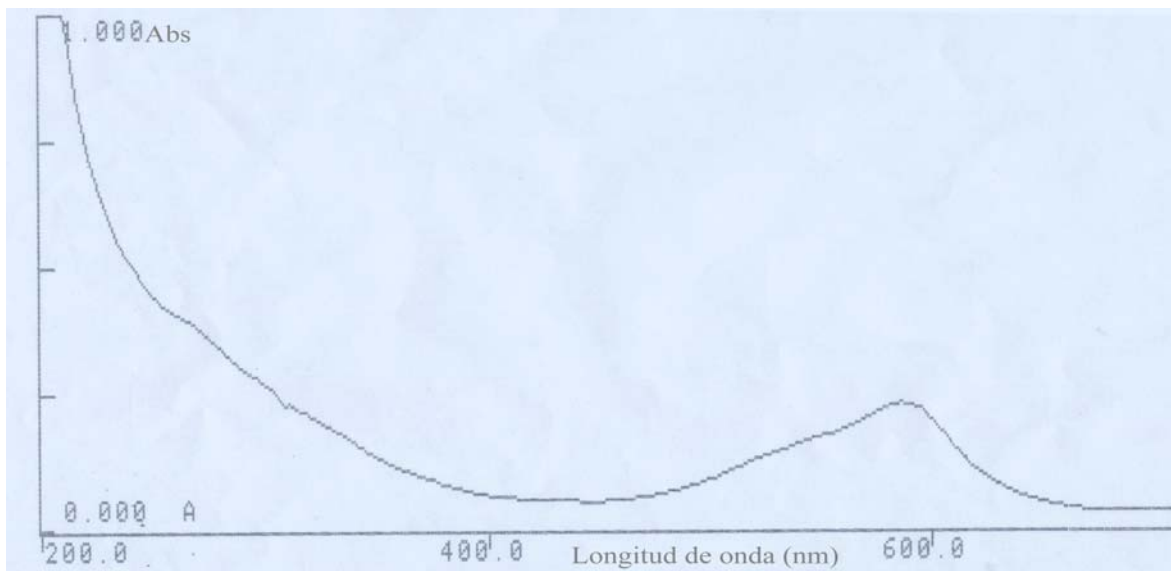


Tabla 11: Parámetros óptimos para la reacción del violeta de metilo con RPP.

Parámetro	Unidad	valor
Tiempo de contacto enzima – sustrato	minutos	90
pH	-	3.0
Peróxido de Hidrógeno (H ₂ O ₂)	mM	0.1
[violeta de metilo]	mg/L	9.0
Dosis RPP	U de guayacol	4.5
Remoción	%	40

En cada uno de los espectros de los colorantes se observó una clara disminución de la banda de máxima absorción en el espectro visible, esta variación permitiría suponer que la concentración de los colorantes disminuyó, lo que evidencia una biotransformación de la molécula por acción de la actividad catalítica de la peroxidasa.

5.3 EVALUACIÓN DE LA DECOLORIZACIÓN DE LOS TINTES POR HPLC.

5.3.1 NARANJA DE METILO

La reacción de biotransformación de naranja de metilo se determinó utilizando la técnica analítica de HPLC. En la figura 26 se muestra el cromatograma del colorante sin tratamiento, el cual mostró un pico en 2.827 minutos. Después del tratamiento enzimático con RPP el perfil cambió y aparecieron dos nuevos picos, en 2.749 y en 3.885 minutos.

Figura 26: Perfil cromatográfico del anaranjado de metilo.

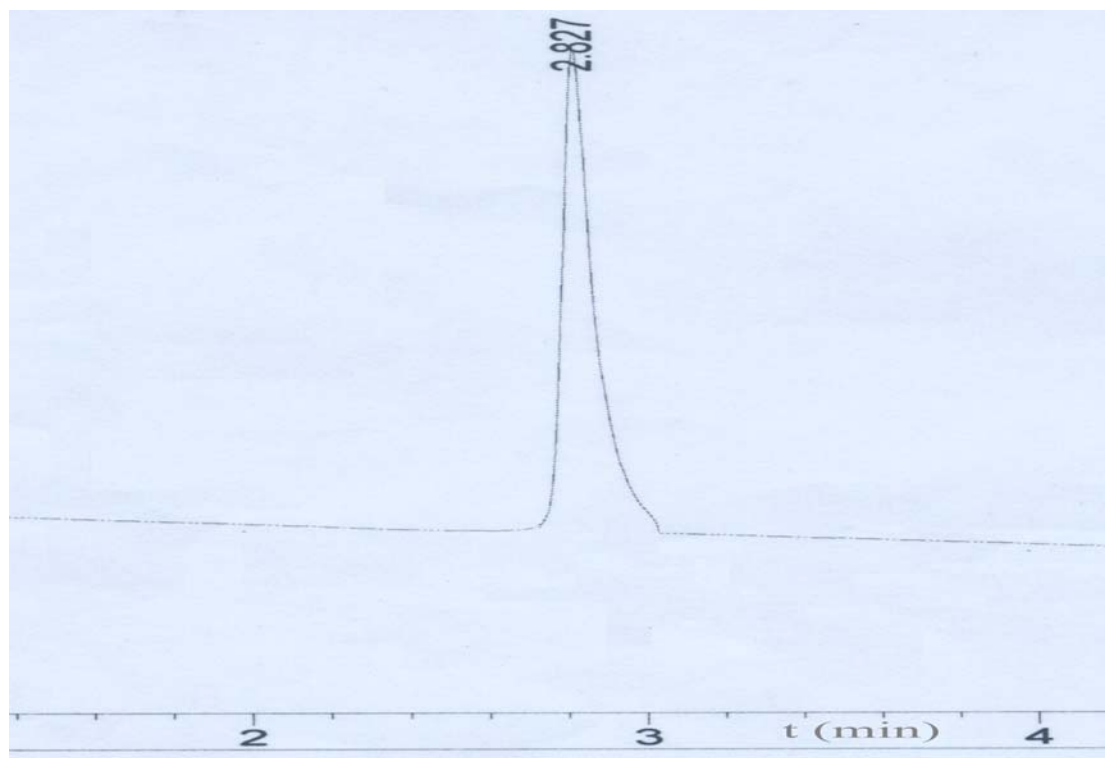
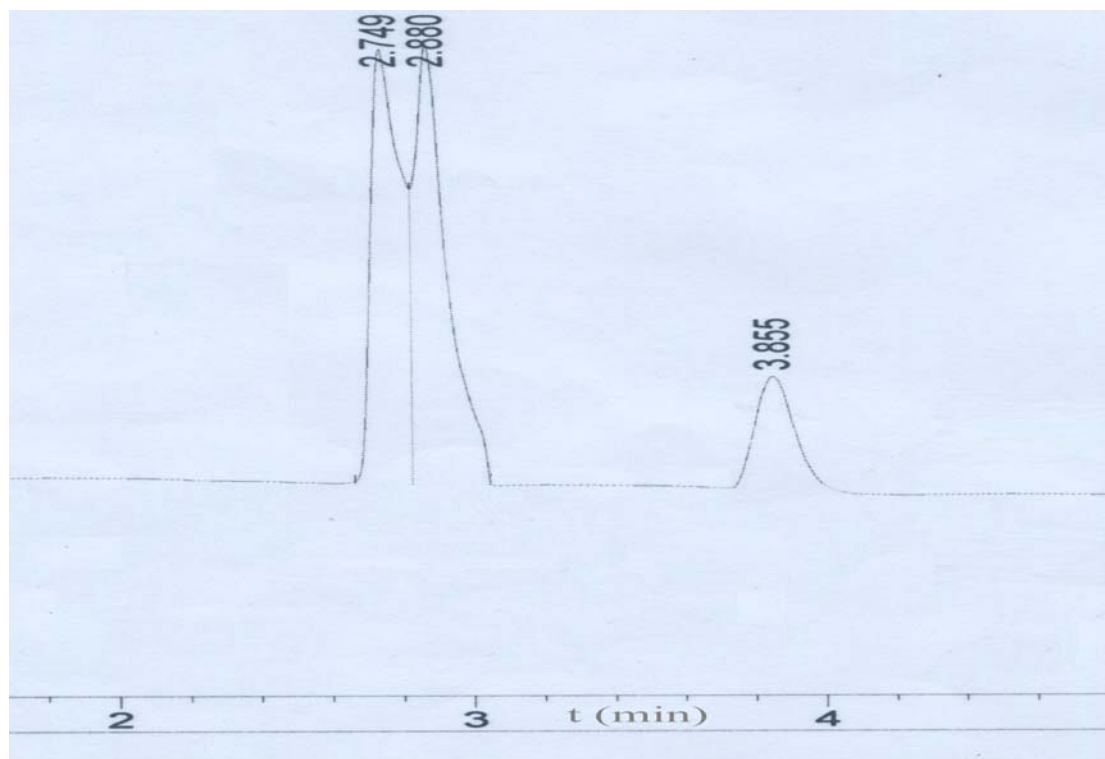


Figura 27: Perfil cromatográfico del anaranjado de metilo, tratado con RPP.

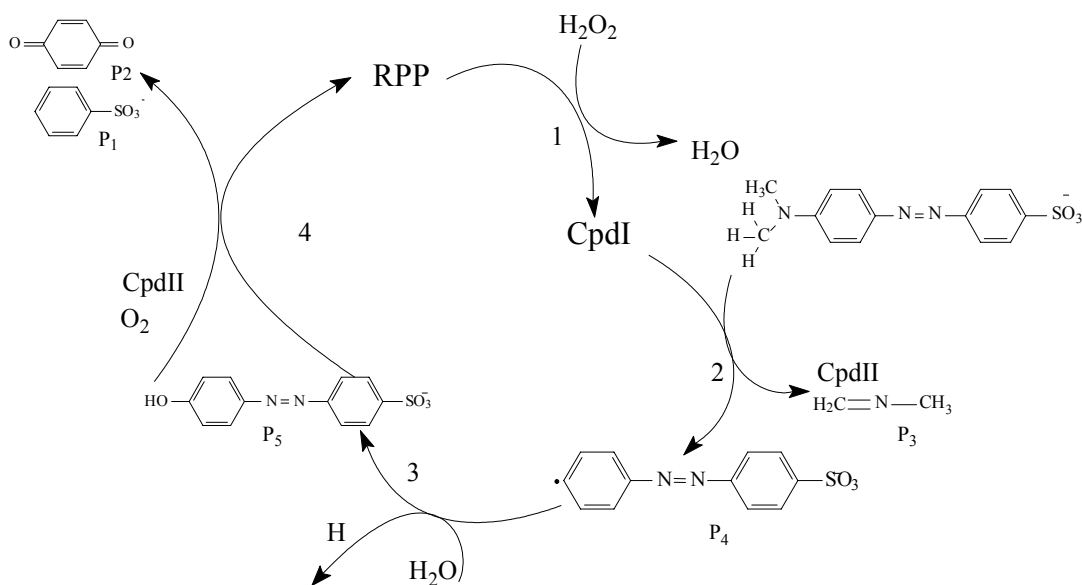


La aparición del pico en 2.749 minutos sugiere la presencia de un fragmento con mayor polaridad que la molécula de partida, debido a esto se retiene menos en la fase estacionaria y disminuye su tiempo de retención (t_R).

Por otro lado, el pico en 3.885 minutos pertenecería al otro fragmento formado por la oxidación con RPP. Este fragmento es menos polar, por consiguiente permanece menos tiempo en la fase móvil, aumentando así su tiempo de retención.

Los picos obtenidos con el tratamiento enzimático sugieren un fraccionamiento del anaranjado de metilo. Recientemente, algunos autores han propuesto un posible mecanismo de oxidación de compuestos azos tales como el naranja de metilo [Torres y Col., 2003].

Esquema 9: Ciclo catalítico, posible mecanismo de la oxidación del naranja de metilo con RPP.



De acuerdo con este mecanismo, en el segmento 1 del ciclo 1 ocurre la oxidación de la hemoproteína, transformando su átomo de hierro (III) a hierro (IV), formando el cpd I. En la vía 2, ocurre la oxidación de una molécula de sustrato, para formar el cpd II, P₄ y P₃. La imina formada, P₃, no se registraría en el perfil cromatográfico debido a que esta no absorbería en 225nm.

En la ruta 3, P₄ reacciona con una molécula de agua para formar P₅. Este producto seguiría el mecanismo registrado en [Torres, 2003], formándose la quinona y el ácido bencensulfónico, P₁ y P₂, respectivamente.

Es claro que el ácido es más polar que la quinona, y por ende la señal que aparece en 2.749 minutos podría ser la de este compuesto, y el pico en 3.885 minutos, correspondería a la quinona. Comparando las áreas de estos dos picos con la del sustrato en la figura 26, la suma de estas tres áreas, corresponde al área total de la señal en la figura 25. Esto permite concluir que el rendimiento en la remoción obtenido con el CLEA y la proteína libre es igual a 61%.

Por otro lado, el ciclo se podría interrumpir en la segunda etapa, obteniéndose como productos de reacción P₃ y P₄, lo cual indicaría que P₃ sería el pico en 3.885 minutos y P₄ en 2.749 minutos.

Sin embargo, es necesario realizar un análisis por espectrometría de masas para corroborar la ruta que sigue la oxidación de la molécula de anaranjado de metilo. No obstante, estas experiencias y su evaluación por espectrofotometría UV-visible y HPLC demuestran de manera preliminar la biotransformación del anaranjado de metilo

5.3.2 PARDO DE BISMARCK.

Figura 28: Perfil cromatográfico de pardo de Bismark.

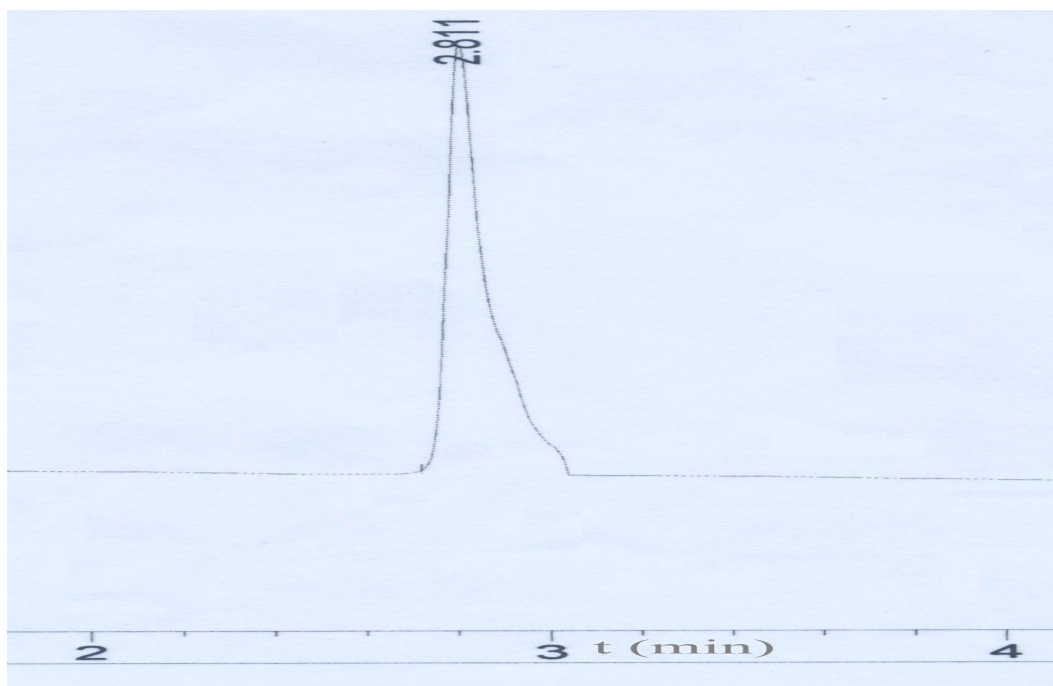
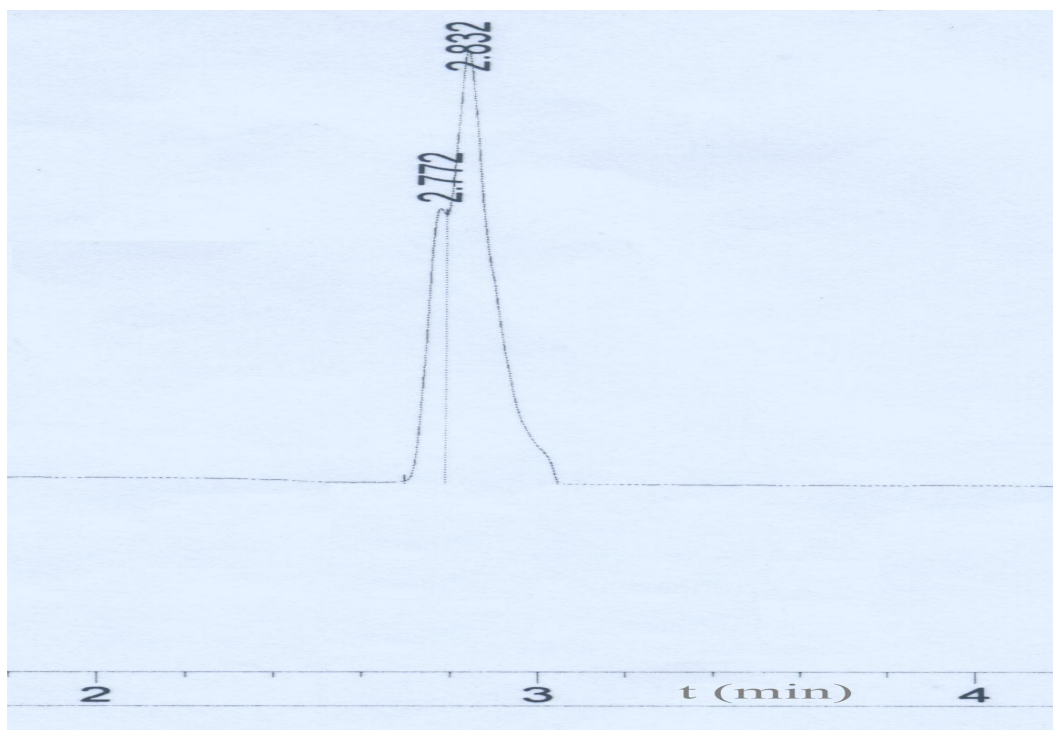


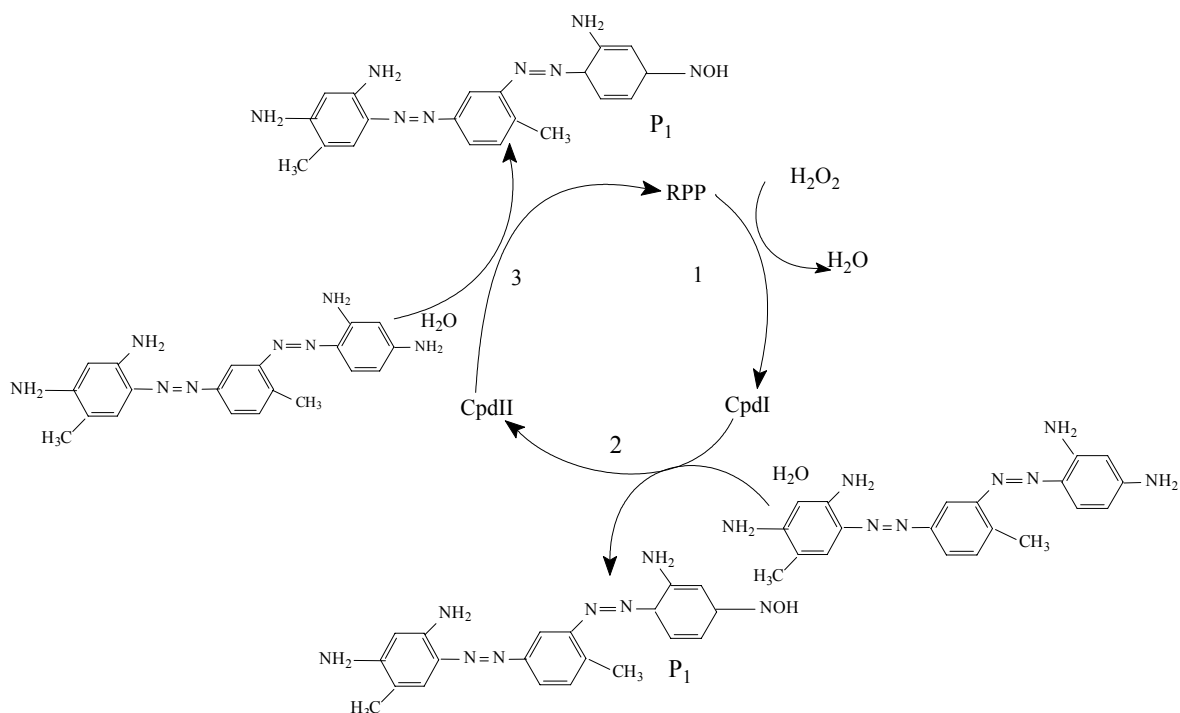
Figura 29: Perfil cromatográfico de pardo de Bismark, tratado con RPP.



En las figuras 28 y 29, se muestran los resultados con los cromatogramas correspondientes a la biotransformación del Pardo de Bismark. En la Figura 28 se observa la aparición de una señal en 2.811 minutos, correspondiente al pardo de Bismark. Después del tratamiento, (Ver figura 29), aparece un nuevo pico en 2.772 minutos. Esto podría deberse a que la molécula no sufre una fragmentación, pero hay un cambio estructural, convirtiéndola en una molécula más polar, producto de la oxidación que sufrió en la reacción con la RPP.

En el siguiente esquema se muestra el posible producto de oxidación del pardo de Bismark con RPP.

Esquema 10: Ciclo catalítico 2, posible mecanismo de la oxidación del pardo de Bismark con RPP.



En la ruta 1, se oxida la RPP convirtiéndose en la especie activa, oxidándose el hierro (III) a hierro (IV), y formándose de esta manera el cpdI. Posteriormente en la ruta 2, el cpdI se reduce al cpdII, oxidando a una molécula de pardo de Bismark, que posiblemente tenga la forma de P₁, una hidroxil amina. A continuación el cpdII oxida a otra molécula de sustrato regresando la RPP a su estado nativo.

En la figura 29, la señal que aparece en 2.772 minutos, se deba muy probablemente a la presencia de un compuesto cuya estructura es muy similar a la del P₁ en el ciclo 2. Como se observa, la estructura del P₁ es la forma oxidada del pardo de Bismark, una especie más polar, y por consiguiente se retiene menos en la fase estacionaria de la columna, logrando un tiempo de retención menor que la molécula de partida.

No fue posible el análisis por HPLC de la reacción del violeta de metilo con el extracto enzimático, ya que esta molécula es muy apolar y la columna empleada en este trabajo podría sufrir deterioro estructural. En consecuencia, se recomienda utilizar una columna C-8 para el análisis cromatográfico.

Sin embargo, es necesario realizar un análisis por espectrometría de masas para corroborar la ruta que sigue la oxidación de los colorantes estudiados. No obstante, estas experiencias y su evaluación por espectrofotometría UV-visible y HPLC demuestra de manera preliminar la biotransformación de los colorantes.

6. CONCLUSIONES

Se demostró que la actividad volumétrica y específica de las peroxidasas de palma real solubles son altas a pesar de su bajo contenido de proteínas en el extracto enzimático, obteniéndose valores de 90U/mL y 637U/mg, respectivamente.

La peroxidasa de palma real en el extracto enzimático, posee una gran estabilidad térmica, expresando actividad catalítica inclusive a 91⁰C. Lo anterior muestra que en las condiciones estudiadas el uso de RPP podría ser una alternativa interesante para trabajar en procesos de biorremediación, bajo condiciones relativamente drásticas de temperatura y pH.

Los resultados experimentales obtenidos en este trabajo muestran la eficiencia de las peroxidasas en las reacciones de oxidación de moléculas altamente tóxicas y poco biodegradables. Sin embargo, la capacidad que tiene la enzima para la remoción de estos colorantes depende de parámetros de reacción tales como: tiempo y pH de la reacción, concentración del peróxido de hidrógeno, concentración de los colorantes y cantidad de RPP.

Uno de los parámetros que más influyó en la eficiencia de la reacción de oxidación fue el pH, debido a que la enzima alcanzó su máxima actividad a valores ácidos. Para valores ligeramente básicos el biocatalizador exhibió actividad mínima en la remoción.

La peroxidasa de palma real se insolubilizó en forma de CLEA, obteniéndose para el naranja de metilo, el violeta de metilo y para el pardo de Bismark valores similares de remoción en comparación con la reacción que utilizó la proteína soluble, y alcanzando valores de remoción de 63%, 40 %, 53%, respectivamente.

La familia de moléculas más susceptibles a la reacción de oxidación catalizada por peroxidasa de palma fueron aquellas que contenían en su estructura un grupo azoico, lo que convierte a esta técnica en una alternativa viable para el tratamiento de efluentes contaminados con este tipo de colorantes, como por ejemplo, las aguas residuales de las curtiembres.

7. RECOMENDACIONES:

Determinar la estructura de los productos de oxidación de la biotransformación de los colorantes con peroxidasa por HPLC acoplado a espectrometría de masas.

Inmovilizar la proteína sobre soportes sólidos, como poliacrilamida y resinas epóxicas, y determinar por medio de análisis en UV-Vis y HPLC, que sucede en la remoción de estos colorantes con la RPP.

Purificar por medio de columnas la proteína, y establecer una comparación entre los porcentajes de remoción de la proteína en el extracto y las diferentes iso-enzimas de peroxidasa presentes en el extracto enzimático.

Realizar el análisis por HPLC, con una columna C-8, y trabajar en fase directa, para establecer los posibles productos de la oxidación del violeta de metilo, y determinar si la oxidación con RPP conduce a productos menos tóxicos.

Realizar un estudio más detallado sobre la reacción de este tipo de moléculas con CLEAs de peroxidasa, y establecer la capacidad que estos tienen en la remoción de colorantes tóxicos, como son los de tipo azoico.

8. REFERENCIAS

- ADAM, W., LAZARUS, M., SAHA-MOLER, C., WEICHHOLD, O., SCHERIER, P. (1999). "Biotransformation with peroxidases", *Adv. Biochem. Eng* 63, 74-108.
- ADAMS, M. PERLER, F. KELLY, R. (1998). "Extremozymes: expanding the limits of biocatalysis, review". *Biotechnology*. 70, 662-667.
- AITKEN, M. . (1993). "Waste treatment applications of enzymes opportunities and obstacles. *The chemical engineering journal*. 52, B49-B58.
- AKASAKA, R. TADAHIKO, M. (1995). HIROBE, M. "Hidroxilación de benceno por horseradish peroxidase and immobilized horseradish peroxidase in an organic solvent". *Bioorganic and medicinal chemistry letters*. 5, 1891-1864.
- BERENZIN, K. UGAROVA, N. (1995). "Microenvironment of enzymes as one of factors defining enzymatic stability of soluble and immobilized peroxidase". *Dock, Acad. Sci.* 223, 1256-1259.
- BUCKE, C. (1998). "Biochemistry of bioremediation by fungi". *J. Chem. technol. Biotechnology*. 71, 356-367.
- CANDEIAS, L. FOLKES, L. WARDMAN, P. (1997). "Factors controlling the substrate specificity of peroxidases. Thermodynamics of the reaction of horseradish peroxidase compound with phenols and indol-3-acetic acids. *Biochemistry*". 23, 7081-7085.
- CASTILLO, J. ARIZA, J. (2000). "Extracción y purificación de las peroxidases de las hojas de palma de aceite (*elais guineensis*) y palma real (*roystonea regia*)". Trabajo de grado. Universidad Industrial de Santander.

CAREY, F. (2000). Química orgánica, Mc Graw Hill.

CASTILLO, J.J. (2001). “Separación y caracterización de las isoenzimas de la peroxidasa de la palma real (*Roystonea regia*)”. Trabajo de grado, Universidad Industrial de Santander.

DOERGE, D. DIVIL, R. CHURCHWELL, M. (1997). “Identification of the coloured guaiacol oxidation product produced by peroxidases”. *Anal. Biochemistry*. 250, 10-17.

HINNER, N. HERNANDES, J. ARNAO, B. GARCIA, F. ACOSTA, M. (1996). “Comparative study of the purity enzyme activity and inactivation by hydrogen peroxide of commercially available horseradish peroxidase isoenzymes”. *Biotechnol and Bioeng.* 50, 650-665.

<http://www.colorantes.co/industriales>, fecha de acceso 1 abril de 2005.

LINQIU, C. LANGEN, A. SHELDON, R. (2005). “Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free?”, *The Netherlands CLEA Technologies*, 135, 393.

LOBARZEWSKI, J. GREPPIN, H. PENEL, C. GASPAR, (1991). “The biochemical molecular and physiological aspects of plant peroxidases”, *Lublin and Geneva*. 42, 3-13.

LOWRY, O. H. ROSEBROUGH, N. J. FARR, A. L. & RANDALL, R. J. (1951). “Protein measurement with the folin phenol reagent”. *Journal of Biological Chemistry*. 193, 265-275

MILAND, E. SMYTH, M. FAGAIN, C. (1996). “Phenol removal by modified peroxidases”, *J. Chem, Tech Biotechnol.* 67, 227-236.

MOHAN, S. PRASAD, K. RAO, C. SARMA, F. (2005). "Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase (HRP) catalyzed process", *Chemosphere*. 58, 1097-1105.

OBINGER, C. BURMER, U. EBERMAR, R. PENEL, C. GREPPIN, H. (1996). "Plant peroxidases", *Biochemistry and physiology*. 51, 540-549.

O'BREIM, P. HERSCHALG, D. (1999). "Catalytic promiscuity and evolution of new enzymatic activities". *Chem and biol.* 4, R91-R105.

RODRIGUEZ LOPEZ, J. GILABERT, M. TUDELA, J. THORNELY, R. GARCIA-CANOVAS, F. (2000). "Reactivity of horseradish peroxidase compound toward substrates: kinetic evidence for a two-step mechanism", *Biochemistry*. 39, 13201-13209.

RYABOV, A. GORAL, V. STEDAY. (1996). STATE KINETICS MICELLAR EFFECTS AND THE MECHANISM OF PEROXIDASE CATALYZED OXIDATION OF ALKYL FERROCENES BY HYDROGEN PEROXIDE. *Chemistry and biology*. 39, 80-87.

RYU, K. DORDICK, J. (1992). "How do organics solvents affect peroxidase structure and function? *Biochemistry*". 66, 2588-2598.

SAKHAROV, I. BAUTISTA, A. SAKHAROVA, I. ROJAS, A. PLATJUSCHAKINA, O. (1999). "Peroxidasas de plantas tropicales". *Revista Colombiana de Química*. 28, 1.

SHELDON, R. VAN RANTWIJK, F. SCHOEVAART, R. "Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs)". *Biotechnology and bioengineering* (2004) 87, 6.

SOLANO, E. (2003). “Biotransformación de guayacol en reacciones de oxidación catalizadas por peroxidasa de palma real”. Tesis de grado, Universidad Industrial de Santander.

STACHYRA, T. GUILLOCHON, D. PULVIN, S. THOMAS, D. (1996). “Hemoglobin horseradish peroxidases, and heme-bovine serum albumin as biocatalyst for the oxidation of dibenzothiophene”. *Applied biochemistry and biotechnology*. 59, 231-244.

TORRES, E. BUSTOS-JAIMES, I. LE BORGNE, S. (2003). “Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants”. *Applied catalysis: environmental*. 46, 1-15.

VALDERRAMA. R, VASQUEZ-DUHALT. R. (2002). “Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes. *Chemistry and biology*”. 9, 555-565. review.

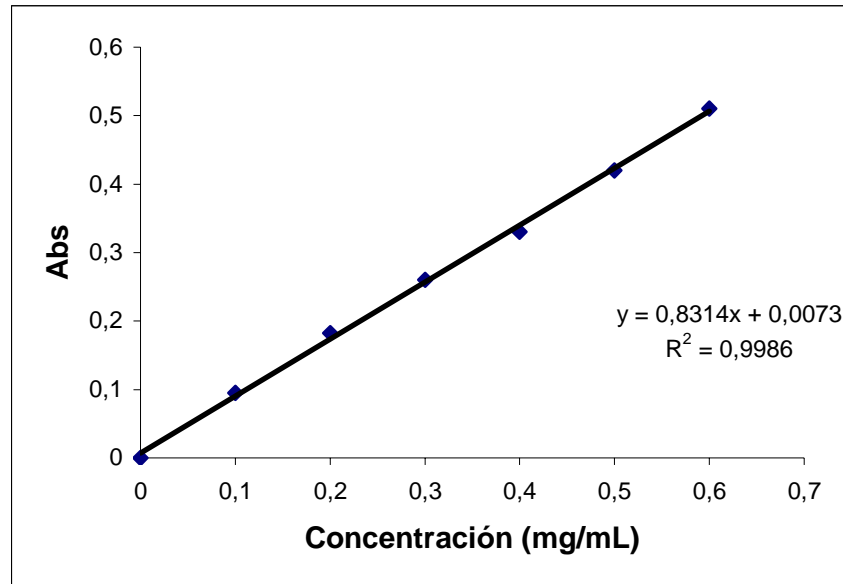
VESGA, K. (2000). “Estudio de la especificidad sustrática de las peroxidases de las hojas de palma real (*roystonea regia*) y palma de aceite (*elais guineensis*)”, trabajo de grado. Universidad Industrial de Santander.

WIRSTAM, M. BLOMBERG, M. SIEGBAHN, P. (1999). “Reaction mechanism of compound and formation in heme peroxidases a density functional theory study”. *J. Am. Chem. Soc.* 43, 10178-10185.

ZILLE, A. RAMALHO, P. TZANOV, T. MILLWARD, R. AIRES, V. CARDOSO, M. RAMALHO, M. GUBITZ, G. CAVACO-PAULO, A. (2004). “Predicting dye biodegradation from redox potentials”. *Biotechnol. Prog.* 20, 1588-1592.

ANEXO 1

Figura 30: Curva de calibración para determinar la concentración de proteínas por el método de Bradford.



Para conocer la concentración proteica se realizó el siguiente cómputo:

$$\text{Abs} = m * [C] + b$$

Abs: Es la absorbancia de la solución proteica.

[C]: Es La concentración del extracto enzimático en (mg/L).

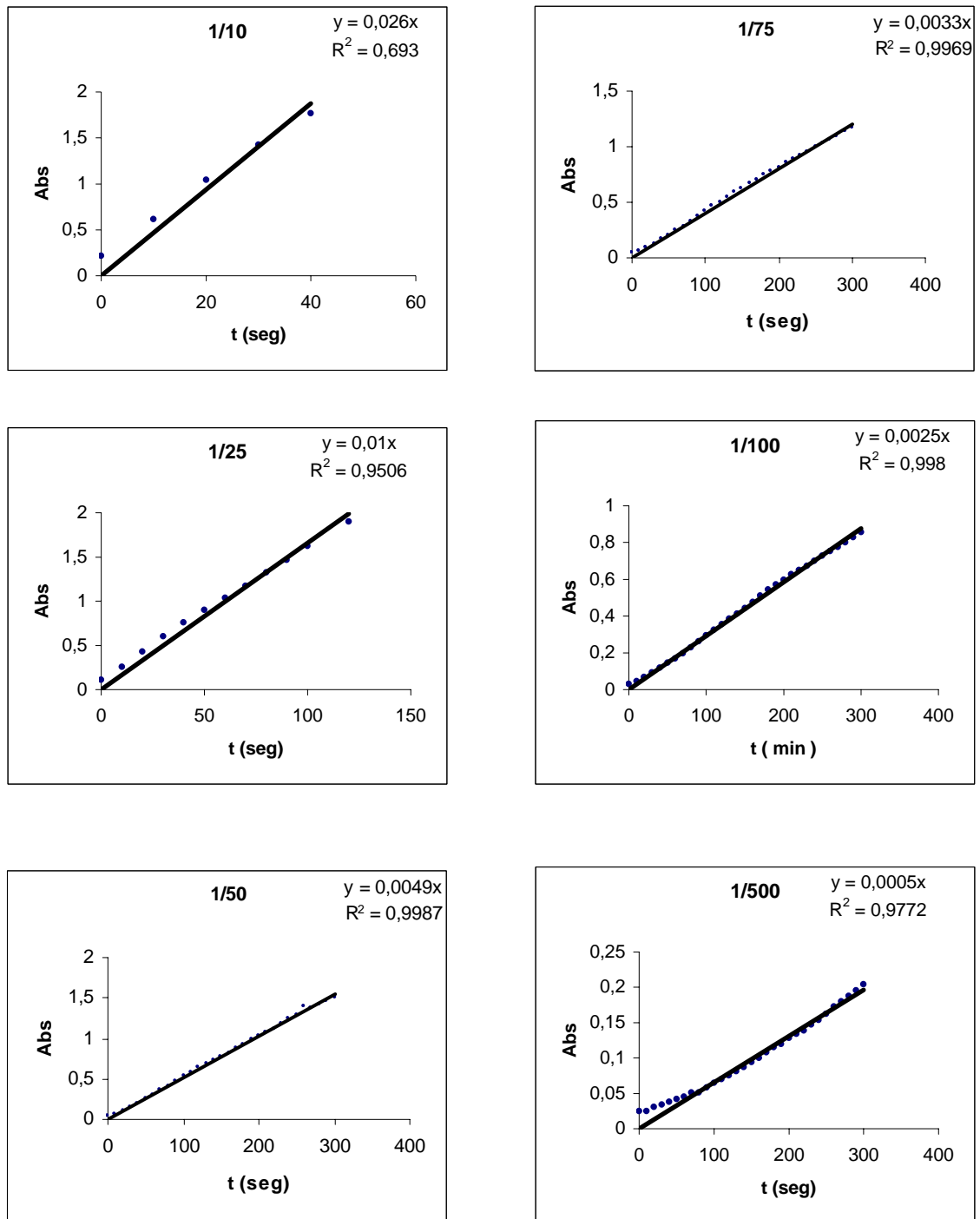
b: Es el corte con el eje y

$$[C] = (\text{Abs} - b) / m$$

[C]= 0.141mg/mL de extracto proteico.

ANEXO 2

Figura 31: Determinación de la actividad volumétrica de la RPP en diferentes disoluciones del extracto enzimático.



Para calcular la actividad volumétrica se utilizó la ley de Lambert-Beer como se muestra a continuación.

$$A = \epsilon \cdot b \cdot C$$

A: Absorbancia

ϵ : Coeficiente de extinción molar del producto de oxidación del guayacol, tetraguayacol, $5200\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

b: Longitud de la celda, 1 cm.

C: Concentración del tetraguayacol en el medio de reacción.

$$A = \epsilon \cdot b \cdot C$$

$$(dA/dt) = \epsilon \cdot b \cdot (dC/dt).$$

$$(dC/dt) = (dA/dt) / \epsilon \cdot b.$$

(dA/dt) , es la pendiente de la gráfica Abs vs t de reacción, la cual se calculó de las gráficas que se hicieron para las diferentes diluciones del extracto enzimático. Gráfica 1.

(dC/dt) , es el cambio en la concentración del tetraguayacol con respecto al tiempo.

La actividad volumétrica se calculó como el promedio de todas las actividades para cada uno de los ensayos, y se expresa en U/mL donde 1 U es igual $1\mu\text{mol}/\text{min}$ de tetraguayacol producido en el sistema de reacción por volumen de enzima agregado.

La actividad específica se calculó como el promedio del cociente entre cada una de las actividades volumétricas y el contenido proteico del extracto.

ANEXO 3

Las constantes de desactivación térmica e inactivación por peróxido, se determinaron siguiendo un modelo cinético de primer orden.

$$E = E_0 + e^{-k_i \cdot t}$$

$$a = E/E_0$$

$$a = e^{-k_i \cdot t}$$

Donde:

a: Es la actividad volumétrica medida en U/mL de extracto enzimático.

k: Constante de desactivación

t: tiempo de incubación para cada temperatura.

Para hacer posible el cálculo de la constante se procedió a realizar la linealización de la curva.

$$\ln(a) = -k_i \cdot t$$

Donde la pendiente de esta curva nos permite calcular las constantes de desactivación térmica y por inactivación suicida. En unidades de t^{-1} .