

# Universidad Autónoma de Baja California

Facultad de Ingeniería Arquitectura y Diseño



Ingeniería en Nanotecnología

---

Bionanopartículas con actividad citocromo P450 inmunológicamente inertes para su uso en la transformación de compuestos orgánicos

---

Tesis

Para cubrir parcialmente los requisitos para obtener el título de Ingeniero en Nanotecnología

Presenta:

Víctor Manuel Márquez Frasco

Ensenada, Baja California, México.

Mayo 2018

# Universidad Autónoma de Baja California

Facultad de Ingeniería Arquitectura y Diseño

Bionanopartículas con actividad citocromo P450 inmunológicamente inertes para su uso en la transformación de compuestos orgánicos

Tesis

Para cubrir parcialmente los requisitos para obtener el título de Ingeniero en Nanotecnología

Tesis defendida por

Víctor Manuel Márquez Frasco

Y aprobado por el comité



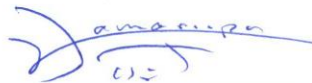
Dra. Katrin Quester  
Directora de tesis



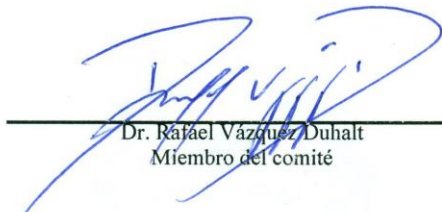
M.I. Guillermo Amaya Parra  
Codirector de tesis



Dr. Ulises Jesús Tamayo Pérez  
Miembro del comité



Dr. José de Jesús Zamarripa Topete  
Miembro del comité



Dr. Rafael Vázquez Duhalt  
Miembro del comité

## Resumen

El citocromo P450 (CYP P450), es una enzima con un pigmento que absorbe la luz a una longitud de onda de 450 nm. [10] Esta enzima tiene papeles muy importantes para el metabolismo, ya que ayudan a degradar o sintetizar esteroides, vitaminas, carcinógenos, drogas, medicamentos, etc. [16] De esta manera, es la responsable de la mayor parte de la transformación de los medicamentos en los seres humanos, además de la descomposición de contaminantes xenobióticos, la cual actúa por reacciones de monooxigenación. [17] En el presente trabajo, se diseñó una bionanopartícula inmunológicamente inerte con actividad citocromo con la mutante WMV para transformar compuestos orgánicos.

Debido a que esta coenzima se encuentra en todas las células, nos brinda una mayor aplicación en la transformación de compuestos xenobióticos, los cuales son tóxicos para los humanos y / o el medio ambiente. Dado el uso que se le puede dar, se trabajó con la purificación, pegilación y transformación del guayacol además de 2, 6-dimetoxifenol.

Adicionalmente, se determinaron las constantes catalíticas ( $K_m$  y  $K_{cat}$ ) para establecer el comportamiento que tiene el  $CYP_{WMV}$  en la transformación de estos compuestos orgánicos, mediante  $H_2O_2$  y NADPH como donador de electrones, arrojándonos resultados muy interesantes que resaltan el potencial que tiene el  $CYP_{WMV}$  para la transformación de compuestos xenobióticos.

## Abstract

The cytochrome P450 (CYP P450) is an enzyme with a pigment that absorbs light at a wavelength of 450 nm. <sup>[10]</sup> This enzyme plays very important roles in our metabolism, since they help us to degrade or synthesize steroids, vitamins, carcinogens, drugs, etc, <sup>[16]</sup> being responsible for mostly all of the transformation of drugs in humans, in addition to the decomposition of xenobiotic contaminants, by performing monooxygenation reactions. <sup>[17]</sup> In the present work, an immunologically inert bionanoparticle with cytochrome activity was designed using the CYP<sub>WMV</sub> mutant to transform organic compounds.

Because this enzyme is found in practically all organisms, it provides a wide application spectrum in the transformation of xenobiotic compounds, which are toxic to humans and / or the environment. Therefore, we worked with the purification, pegylation and transformation of guaiacol in addition to 2, 6- dimethoxyphenol.

Additionally, the catalytic constants ( $K_m$  and  $K_{cat}$ ) were determined to establish the behavior of CYP<sub>WMV</sub> in the transformation of these organic compounds, using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NADPH as electron donors, presenting very interesting results that highlight the potential of the CYP<sub>WMV</sub> in the transformation of xenobiotic compounds.

## Dedicatoria

*A mi padre Víctor Márquez Nava y a mi madre Rosalva Frasco Cardoso.*

*Mis pilares fundamentales de mi vida, quienes han sido mis guías, mi motivación, por su apoyo infinito e incondicional a lo largo de toda mi vida, por creer en mí, por darme ejemplos dignos de superación como de responsabilidad, porque gracias a ustedes hoy puedo ver alcanzada mi meta.*

*Les doy las gracias por todo lo que incondicionalmente me han brindado, ya que todo lo que tengo es por ustedes.*

*Es tan maravilloso haber tenido la dicha de que ustedes me dieran la vida, y espero la vida me dé la dicha de estar juntos por siempre.*

*A mis hermanos quienes son mi fuerza para seguir adelante.*

*Los amo.*

# Agradecimientos

*A mi asesora de tesis la Dra. Katrin Quester, por brindarme su amistad, tiempo, dedicación, apoyo y toda su paciencia a lo largo de este proyecto, para que yo desarrollara las herramientas necesarias para crecer profesionalmente.*

*Al M.I. Guillermo Amaya parra, quien siempre me motivó a dar lo máximo de mí.*

*Al Dr. Rafael Vázquez Duhalt, por brindarme su apoyo y asesoramiento para el desarrollo de este proyecto.*

*A la Dra. Karla Alejo y a la M.C. Paulina Tafuya, por brindarme su apoyo en la parte experimental de este proyecto.*

*A la M.C. Ana Linda Misquez Mercado, por la facilitación en el uso del material ocupado para el ensayo de CO.*

*A CONACYT por el apoyo económico brindado.*

*Al Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN - UNAM) por darme la oportunidad de trabajar en sus instalaciones.*

*Finalmente, a la UABC por otorgarme la oportunidad de superarme y desarrollarme profesionalmente, por forjar mi espíritu emprendedor hacia la ciencia.*

# Contenido

Resumen.....	2
Abstract.....	4
Dedicatoria.....	5
Agradecimientos .....	6
Lista de figuras.....	9
Lista de tablas .....	11
Lista de ecuaciones. ....	11
<b>Capítulo 1. Introducción.....</b>	<b>12</b>
<b>1.1 Antecedentes.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1.1 CYP P450.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1.2 CYP<sub>WMV</sub> (R47W/A82M/F87V).....</b>	<b>20</b>
<b>1.1.3 Kanamicina.....</b>	<b>21</b>
<b>1.1.4 Polietilenglicol (PEG).....</b>	<b>22</b>
<b>1.1.5 Sustratos.....</b>	<b>23</b>
<b>1.2 Hipótesis.....</b>	<b>25</b>
<b>1.3 Objetivo general.....</b>	<b>25</b>
<b>1.3.1 Objetivos particulares.....</b>	<b>25</b>
<b>Capítulo 2. Metodología.....</b>	<b>26</b>
<b>2.1 Células competentes.....</b>	<b>26</b>
<b>2.2 Transformación (choque térmico).....</b>	<b>26</b>
<b>2.3 Purificación del CYP<sub>WMV</sub>.....</b>	<b>27</b>
<b>2.4 Concentración del CYP.....</b>	<b>29</b>
<b>2.5 Pegilación del CYP<sub>WMV</sub>.....</b>	<b>30</b>
<b>2.6 Determinación de grupos amino libres por el método TNBS.....</b>	<b>31</b>
<b>2.7 Cinética del CYP<sub>WMV</sub>.....</b>	<b>31</b>
<b>2.8 Zetasizer.....</b>	<b>32</b>

2.9 Análisis estadístico.....	32
Capítulo 3. Resultados y discusión .....	33
3.1 Transformación.....	33
3.2 Expresión y purificación del CYP <sub>WMV</sub> en <i>E. coli</i> .....	34
3.3 Determinación de la concentración del CYP <sub>WMV</sub> purificado.....	35
3.4 Pegilación del CYP <sub>WMV</sub> y determinación de grupos amino libres (TNBS).....	37
3.5 Cinética del CYP <sub>WMV</sub> y CYP <sub>WMV</sub> -PEG.....	38
3.6 Potencial zeta y tamaño. ....	40
Capítulo 4. Conclusiones.....	46
Referencias.....	47

# Lista de figuras

- Figura 1.** Estructura cristalina del CYP P450<sub>BM3</sub> con mutante F87A/T268A de *Bacillus megaterium*, expresado en *Escherichia coli*, por el método de X-RAY DIFFRACTION, autores Le Trong, I., Katayama, J.H. y colaboradores en <http://www.rcsb.org/structure/3DGI>
- Figura 2.** Reacción monooxigenasa, donde (RH) representa al sustrato, (ROH) al producto de la monooxigenación y NADPH como donador de electrones.
- Figura 3.** Ciclo catalítico que incluye el Peroxide shunt pathway del CYP P450<sub>BM3</sub>. Obtenido por Munro, A. W., Girvan, H. M., & McLean, K. J. (2007). (2007). Variations on a (t) heme-novel mechanisms, redox partners and catalytic functions in the cytochrome P450 superfamily.
- Figura 4.** Localización del CYP oxidoreductasa y ciclo catalítico del CYP en el RE. Obtenido de Hernández, A. (2014). Farmacología general una guía de estudio.
- Figura 5.** Diagrama del mecanismo de hidroxilación por el complejo enzimático del CYP P450. Obtenido por Abel Hernández Chávez: Farmacología general una guía de estudio.
- Figura 6.** Modelo estructural teórico del P450<sub>BM3</sub> alineado al dominio FMN (verde y morado, respectivamente PDB-ID 1BVY), junto con un subdominio FAD de la reductasa NADPH del CYP P450 de una levadura (azul, PDB-ID 3FJO). Imagen obtenida de Ritter 2016.
- Figura 7.** Construcción del vector que expresa la variante CYP<sub>WMV</sub>. Figura obtenida Tafoya Romo, P. (2017). Diseño de nanopartículas virales con actividad citocromo P450 con NADPH como fuente de electrones. Tesis de maestría, CICESE.
- Figura 8.** Estructura del mecanismo de reacción del CPR. Imagen obtenida de Plant NADPH-cytochrome P450 oxidoreductases. NADPH Cytochrome P450 Reductase. <http://www.p450.kvl.dk/p450rel.shtml>
- Figura 9.** Estructura química del guayacol. Imagen obtenida de <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/g10903?lang=es&region=MX>

**Figura 10.** Estructura química del 2,6-Dimetoxifenol. Imagen obtenida de <https://www.acs.org/content/acs/en/molecule-of-the-week/archive/s/syringol.html>

**Figura 11.** Sistema empleado para la obtención de monóxido de carbono en la cuantificación del CYP<sub>WMV</sub>, siguiendo la metodología de Omura y Sato 1964. En a) se puede observar el depósito donde se encuentra el ácido sulfúrico con el doble de volumen que el ácido fórmico que se encuentra en b) y c) muestra con CYP<sub>WMV</sub>.

**Figura 12.** SDS-PAGE al 12% el cual muestra la selección de colonias de E. coli (BL21(D3)) con el plásmido pRSFDuet-1-BM3-WMV por medio de su sobreexpresión.

**Figura 13.** SDS-PAGE al 12% donde se muestra la sobreexpresión del CYP<sub>WMV</sub> (120 kD) a diferentes tiempos de inducción con IPTG.

**Figura 14.** Purificación del CYP con la banda característica a 120 kD (peso teórico del CYP<sub>WMV</sub>). a) 12% SDS-PAGE con diferentes fracciones obtenidas mediante cromatografía aniónica. b) Fracción colectada al 30% del buffer de elución con el color rojo, típico para los citocromos debido a la presencia del grupo hemo.

**Figura 15.** Grafica obtenida mediante el ensayo de CO. La cual muestra un barrido de 420 a 500 nm, donde se puede observar con facilidad el pico característico del CYP en 450 nm.

**Figura 16.** Estructura tridimensional del CYP<sub>WMV</sub>. En a) se muestra la estructura superficial del CYP<sub>WMV</sub> en color rojo y en azul se muestran los aminos libres. En b) se puede observar la estructura del CYP<sub>WMV</sub> pegilado con los monómeros del PEG unidos a cada amina libre que se encuentra en la superficie. Representado de color azul, encontrados en la superficie. Imagen generada con el programa Pymol®.

**Figura 17.** Potencial zeta. Se observan las gráficas, que fueron obtenidas mediante el equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical). a) muestra al CYP WMV, el cual obtuvo -28.03 mV y el b) CYPWMV -PEG con -24.7 mV.

**Figura 18.** Se muestra el histograma de los tamaños del CYP<sub>WMV</sub> y CYP<sub>WMV</sub> -PEG, teniendo una diferencia significativa del tamaño de 2.8% para el 5%.

**Figura 19.** Determinación del tamaño. Se observan las gráficas del tamaño, que fueron obtenidas mediante el equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical). a) CYP WMV, con una medida de  $9.55 \pm 0.60$  nm y el b) CYPWMV-PEG  $11.12 \pm 0.30$ .

## Lista de tablas

- Tabla 1.** La recolección de las fracciones, se tomó por cada incremento de porcentaje del buffer de elución, el cual dura 5 min. Por lo tanto, se recolectaron 15 mL por cada fracción obtenida.
- Tabla 2.** Protocolo de limpieza para la columna Bio-Scale™ Mini Nuvia™ IMAC Cartridges.
- Tabla 3.** Constantes de especificidad del CYP<sub>WMV</sub> y CYP<sub>WMV</sub>-PEG. Usando como sustrato DMP y guayacol, usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como donador de electrones.
- Tabla 4.** Parámetros de la estabilidad de la dispersión. Datos obtenidos de Hunter, R. J. (2013). Zeta potential in colloid science: principles and applications. Pág. 59-219.
- Tabla 5.** Potencial zeta CYP<sub>WMV</sub> y CYP<sub>WMV</sub>-PEG, obtenidos por el equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical).
- Tabla 6.** Tamaños determinados del CYP<sub>WMV</sub> y CYP<sub>WMV</sub>-PEG, por el por el equipo Zetasizer Nano ZS.

## Lista de ecuaciones.

- Ecuación 1.** Fórmula para determinar la concentración por el método de Soret. Obtenido de Schenkman, J. B., & Jansson, I. (2006).
- Ecuación 2.** Fórmula para determinar la concentración de CYP<sub>WMV</sub> activo. Obtenido de Schenkman, J. B., & Jansson, I. (2006).
- Ecuación 3.** Cálculo para determinar el T-test con varianzas distintas. a) Ecuación prueba t para única muestra. b) Ecuación que estima el sesgo de la varianza de las dos muestras. Obtenido por Zabell, S. L. (2008).
- Ecuación 4.** Cálculo de la concentración total de CYP<sub>WMV</sub> activo por la técnica de unión al monóxido de carbono.
- Ecuación 5.** Cálculo de la determinación de la concentración por la prueba de Soret.
- Ecuación 6.** Cálculo de la Determinación de la cantidad de PEG usado para la pegilación del CYP<sub>WMV</sub>.

## *Capítulo 1. Introducción*

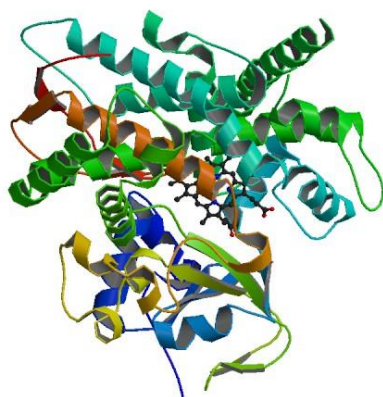
La nanotecnología es el arte de construir y dar forma a la materia a escalas de entre 1 y 100 nm, debido a ello se podría traer consigo beneficios extraordinarios a diversas sociedades. <sup>[1]</sup> La nanotecnología se relaciona estrechamente con los avances de la nanociencia. <sup>[2]</sup> Por lo tanto, la nanociencia crea el conocimiento y la nanotecnología busca donde ser aplicable.

Debido al crecimiento que ha tenido la nanotecnología, se han procesado un gran número de oportunidades para su aplicación que incluye campos como la medioambiental, exploración espacial, tecnologías de la comunicación e informática, sector energético, textil, construcción, arquitectura, agricultura, ganadería, electrónica, cosmética, industria militar, automovilística, seguridad personal, seguridad vial, salud pública, deportes, entre otras. <sup>[3][4][5]</sup> Así mismo existen diversas áreas de estudio de la nanotecnología, una de ellas es la bionanotecnología, la cual es la unión de la biotecnología y la nanotecnología, que se enfoca en el uso de estructuras biológicas a escala nano como las enzimas para un desarrollo tecnológico que solucione diversos problemas. Esta rama de la bionanotecnología incluye los estudios del nanodiagnóstico, la liberación controlada de fármacos y la medicina regenerativa. <sup>[6][7]</sup>

En la última década se ha asistido a un rápido avance en la bionanotecnología, donde se utilizan diversas estructuras biológicas como las enzimas para solucionar diferentes problemas ambientales o de salud. Existen múltiples tipos de enzimas que tienen estas cualidades, un ejemplo son los miembros de la familia de los citocromos P450 (CYP P450).

Los CYPs se hallaron por primera vez en la década de los años 50, donde comenzaron a estudiar algunos pigmentos que se encontraban presentes en los microsomas hepáticos de diferentes especies de animales, plantas y protistas, a los que se les denominó como citocromos (Figura 1). <sup>[8]</sup>

Los CYPs forman una familia de hemoproteínas presentes en numerosas especies, desde bacterias a mamíferos, el cual se tiene un registro desde el año 2012 de más de 14 000 secuencias de genes que codifican para el CYP en diferentes organismos. [9]



**Figura 1.** Estructura cristalina del CYP P450<sub>BM3</sub> con mutante F87A/T268A de *Bacillus megaterium*, expresado en *Escherichia coli*, por el método de X-RAY DIFFRACTION, autores Le Trong, I., Katayama, J.H. y colaboradores en <http://www.rcsb.org/structure/3DGI>

El nombre de citocromo P450 se origina del hecho que estas son proteínas celulares (cito) coloreadas (cromo), que al ser reducido por NADPH (Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato), se une al CO el cual muestra un inherente pico de absorbancia en el espectro UV a 450 nm (pico Soret), justo donde el hierro del grupo hemo es reducido formando complejos con el monóxido de carbono, por ende, esta proteína fue llamada P450 (P por pigmento y 450 por su pico de absorbancia). [10] [11]

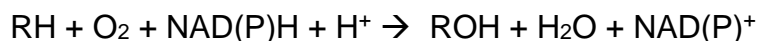
Los CYP P450 conocidos hasta ahora se agrupan en familias y subfamilias en función de la similitud en la secuencia del ADN que los codifica. Una de las peculiaridades más elocuentes de los CYP P450 es que tienen la idoneidad de metabolizar los xenobióticos, permitiéndolo metabolizar un gran número de sustratos.

Los xenobióticos, que significan “extraño a la vida”, son también conocidos como sustratos exógenos. Entre los compuestos xenobióticos se incluyen fármacos terapéuticos, productos químicos, aditivos de alimentos, subproductos industriales, etc. que se convierten en contaminantes ambientales. [12] [13]

Estos compuestos contaminantes se llegan a acumular con el tiempo en el interior de las células, el cual genera un mal funcionamiento celular. Una vez que el complejo enzimático del CYP P450 entra en contacto con los xenobióticos, el CYP modifica la estructura del sustrato, para obtener compuestos más polares. Esto da como resultado a un compuesto con actividad farmacológica reducida que puede ser fácilmente excretado en la orina o en las heces fecales; a esto se le conoce como biotransformación. [14] [15]

La familia de los CYP P450, realizan hidroxilaciones de grupos alifáticos, aromáticos, desaminaciones, hidrólisis o de catalizar reducciones, [16] [17] [18] [19] tienen una gran variedad de sustratos, pero especialmente los compuestos lipofílicos, donde se incluyen los plaguicidas, vitaminas solubles en grasa, como también los profármacos para convertirlos en su compuesto activo.

Por lo tanto, se trata de reacciones de monooxigenación donde un sustrato se une al grupo prostético de la enzima, surgiendo una interacción con el átomo del hierro central, provocando la transferencia de un átomo de oxígeno al sustrato y una molécula de agua recién formada, como se muestra en la Figura 2. [20]



**Figura 2.** Reacción monooxigenasa, donde (RH) representa al sustrato, (ROH) al producto de la monooxigenación y NADPH como donador de electrones.

Además, se ha revelado que algunos CYPs son capaces de trabajar en ausencia de NADPH, como las peroxigenasas que usan hidroxiperóxidos, perácidos o peróxido lo que lo hace más interesante para futuras aplicaciones, ya que al no depender de NADPH estos sistemas podrán ser utilizados en diferentes escenarios como por ejemplo en la remediación ambiental. Esta vía, llamada “*peroxide shunt pathway*” (Figura 3), tiene como primer paso la unión del sustrato (R·H), el cual desplaza una molécula de agua, por lo que se cambia el estado del espín del grupo hemo de bajo a alto. Este cambio favorece a la transferencia de electrones de la pareja redox al átomo



Una de las tantas variedades que hay del CYP P450 es la WMV (R47W/A82M/F87V) proveniente del CYP P450<sub>BM3</sub> de *Bacillus megaterium*. Esta mutante del P450 se ha reportado como un citocromo que tiene una gran capacidad de transformar diversos sustratos, debido a que la estructura del CYP<sub>WMV</sub> tiene un comportamiento metabólico más eficiente, de este modo le permite ser utilizado para degradar moléculas como plaguicidas u otros contaminantes. [25] [26] [27]

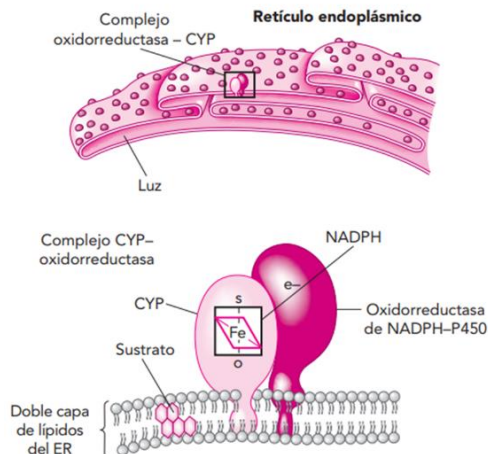
Debido al incremento en el uso excesivo de xenobióticos, la calidad de vida de las personas que interactúan directamente con estos compuestos químicos se ha mirado afectada a corto y largo plazo en su salud, ya que algunos de estos productos químicos son cancerígenos, neurotóxicos o teratógenos. [28]

Dicho lo anterior, se propone diseñar una bionanopartícula inmunológicamente inerte con actividad CYP P450, capaz de transformar xenobióticos orgánicos, de tal manera que nos ayude con la atenuación de estos productos químicos, que causan daños irreversibles al cuerpo y al medio ambiente.

## ***1.1 Antecedentes***

### ***1.1.1 CYP P450.***

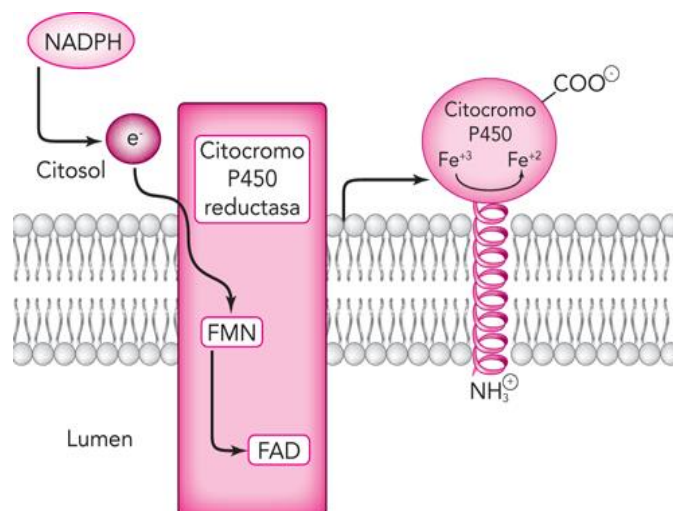
En mamíferos, los CYPs están presentes en diversos órganos como riñón, pulmón, piel, intestino, corteza adrenal, testículos, placenta y particularmente en el hígado, localizándose en las mitocondrias y en el retículo endoplásmico, como se muestra en la Figura 4. En procariotas, los CYPs no tienen una unión específica, pero se solubilizan más fácilmente. [29]



**Figura 4.** Localización del CYP oxidoreductasa y ciclo catalítico del CYP en el RE. Obtenido de Hernández, A. (2014). Farmacología general una guía de estudio.

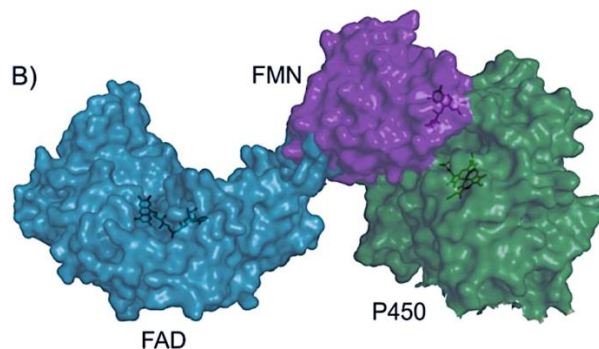
Los CYPs P450 se catalogan en cuatro familias en función de cómo los electrones acceden desde el NADPH hasta el centro catalítico de la enzima. La familia 1 emplea una reductasa que contiene FAD (Flavín adenín dinucleótido) y una ferredoxina, mientras la familia 2 usa una cadena de transferencia de electrones más corta y solo requiere una reductasa del CYP que contiene FAD/FMN (Flavín mononucleótido) para la transferencia de electrones, como se muestra en la Figura 5. La familia 3 son autosuficientes ya que no requieren un donador de electrones y la familia 4 recibe electrones directamente del NADPH. [30]

El NADPH es un cofactor que como el ATP es un transportador activo de electrones. Esta molécula es muy eficiente para donar su ion hidruro a otras moléculas, por lo que provoca una preferente actuación en coenzimas que catalizan reacciones anabólicas, de tal forma que proporciona los electrones de alta energía que se necesitan para sintetizar moléculas biológicas ricas en energía. [31]



**Figura 5.** Diagrama del mecanismo de hidroxilación por el complejo enzimático del CYP P450. Obtenido de Hernández A. (2014). Farmacología general una guía de estudio.

El CYP P450<sub>BM3</sub> de *Bacillus megaterium*, también conocido como CYP 102A1, es utilizado como biocatalizador para la producción de metabolitos, cataliza la oxidación de ácidos grasos, además, es pauta para el estudio de la estructura y funcionamiento del CYP P450, ya que está diseñado para ser un catalizador de peroxigenasa autosuficiente, construido por una proteína de fusión natural entre el dominio CYP y un cofactor donante de electrones. [32] Esta enzima causa gran interés en el campo de la biotecnología, ya que integra un sistema completo de monooxigenasa, donde los dominios de hidroxilasa, reductasa y de transferencia de electrones FMN y FAD se encuentran unidos en una sola cadena polipeptídica, de manera que es convertido en el complejo enzimático del CYP P450, considerado como flavocitocromo, como se muestra en la Figura 6.



**Figura 6.** Modelo estructural teórico del P450<sub>BM3</sub> alineado al dominio FMN (verde y morado, respectivamente, PDB-ID 1BVY), junto con un subdominio FAD de la reductasa NADPH del CYP P450 de una levadura (azul, PDB-ID 3FJO). Imagen obtenida de Ritter 2016 <sup>[17]</sup>.

La conexión entre FMN y FAD actúa como gozne, así provoca que el P450 cambie su conformación recíprocamente de abierta a cerrada, lo que permite una buena transferencia de electrones. <sup>[33] [34] [35] [36]</sup> Por esta razón es uno de los CYPs más rápidos que existen, origina una gran popularidad para su aplicación en diversos campos, como muestra el trabajo realizado por Vidal-Limón y colaboradores, quienes trabajaron con el CYP<sub>BM3</sub> 21B3, el cual cataliza eficientemente las reacciones de hidroxilación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como aceptor de electrones. <sup>[32]</sup>

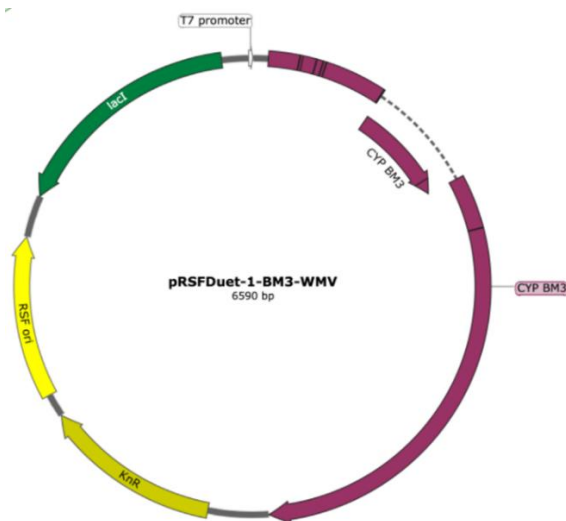
Debido a su estructura, el CYP<sub>BM3</sub> 21B3 ha sido utilizado como catalizador biológico en diversas reacciones de oxidación de compuestos tóxicos xenobióticos; por ende, se ha tenido un gran interés en utilizar los CYP P450 para degradar moléculas xenobióticas como plaguicidas o para la activación de profármacos, ya que este tipo de CYP son ~ 20 veces más activa que su enzima parental en presencia de 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y usando ácido 12-p-nitrofenoxicarboxílico (12-pNCA). <sup>[12] [32]</sup>

Por ello mismo, utilizar un CYP P450<sub>BM3</sub> como herramienta para la transformación de xenobióticos orgánicos nos será muy útil para remediar problemas ambientales y toxicológicos que existen en la actualidad. <sup>[37] [35]</sup>

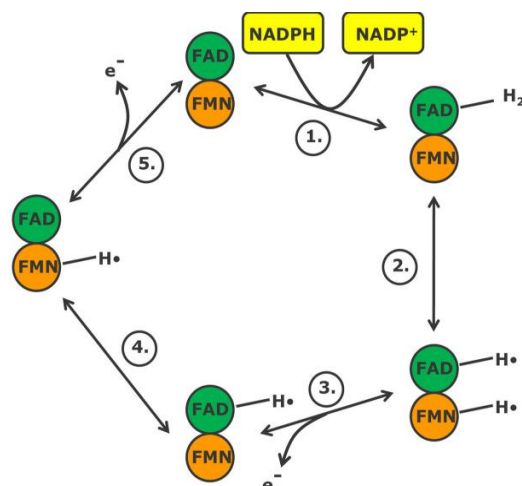
### 1.1.2. $CYP_{WMV}$ (R47W/A82M/F87V)

El  $CYP_{WMV}$  es una versión del  $CYP_{BM3}$  21B3, con las mutaciones R47W/A82M/F87V. La secuencia que codifica para la mutante del  $CYP_{WMV}$  fue expresada en *E. coli* BL21(DE3) con el vector pRSFDuet-1-BM3-WMV (Figura 7), el cual tiene resistencia a kanamicina, con un promotor T7, que codifica para el  $CYP_{BM3}$  completo de *Bacillus megaterium*. [38] El  $CYP_{WMV}$  tiene la característica de ser un flavocitocromo, ya que cuenta con un grupo hemo, además del dominio reductasa FMN/FAD, de esta manera depende así solo de sus cofactores NADPH y oxígeno, el cual compone el núcleo de la actividad reductasa NADPH (CPR).

La CPR es una proteína multidominio que dona dos electrones del NADPH al grupo hemo en una reacción acoplada de dos pasos, el NADPH se une al dominio de unión y los electrones se transportan a través del FAD y FMN al grupo hemo, como se muestra en la Figura 8. Todo el sistema del dominio oxidasa y los subdominios FMN/FAD tienen un peso aproximado de 119 kD. [17]



**Figura 7.** Construcción del vector que expresa la variante  $CYP_{WMV}$ . Figura obtenida Tafoya Romo, P. (2017). Diseño de nanopartículas virales con actividad citocromo P450 con NADPH como fuente de electrones. Tesis de maestría, CICESE.



**Figura 8.** Estructura del mecanismo de reacción del CPR. Imagen obtenida de Plant NADPH-cytochrome P450 oxidoreductases. NADPH Cytochrome P450 Reductase. <http://www.p450.kvl.dk/p450rel.shtml>

Unos ejemplos del CYP P450 en la transformación de xenobióticos incluyen el trabajo desarrollado por Alejo-González y colaboradores, quienes utilizaron una mutante del CYP<sub>BM3</sub> pegilado como biocatalizador en la degradación de plaguicidas y el trabajo de Sánchez- Sánchez y colaboradores, quienes trabajaron con la mutante “21B3” en la transformación de plaguicidas organoclorados y organofosforados. [13] [18]

Aun así, esta funcionalidad no tiene precedentes, por lo tanto, no sería insensato afirmar que toda molécula que entrara en contacto con el organismo podría ser metabolizada, en mayor o menor medida, por el CYP P450.

### 1.1.3 Kanamicina

En la construcción de organismos genéticamente modificados, se requiere de una serie de elementos, con el fin de poder expresar el gen deseado. Entre esos elementos se incluyen los genes de resistencia a antibióticos, mismos que son usados como marcadores genéticos. [39]

La kanamicina es un antibiótico aminoglucósido e hidrosoluble que muestra un amplio espectro bactericida, activo sobre bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, *Mycobacterium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*,

*Salmonella, Serratia, Staphylococcus, Citrobacter y Edwardsiella*, por lo que se usa en una amplia gama de infecciones, debido a su toxicidad. [40] [41]

Teniendo un mecanismo de acción como todos los antibióticos aminoglucósidos, la kanamicina se une a la subunidad S30 del ribosoma bacteriano, el cual provoca errores en la traducción, obteniendo la terminación temprana de la síntesis proteica, formando proteínas con una configuración errónea, de esta manera provoca la muerte de la bacteria. [42]

El gen de resistencia a la kanamicina es insertado con la finalidad de eliminar los organismos que no contienen resistencia al antibiótico y así obtener solo los organismos de interés.

#### *1.1.4 Polietilenglicol (PEG)*

Para poder aplicar el CYP<sub>WMV</sub> al cuerpo humano, es necesario hacerlo inmunológicamente inerte. La palabra en latino *immunis*, que significa “exento”, es el origen de la palabra inmunidad, que se refiere al estado de protección contra anomalías infecciosas, el cual genera respuestas como la producción de anticuerpos para la eliminación de objetos perniciosos. [43] [44] Por ende, se hará un recubrimiento con polietilenglicol (PEG), el cual es un biopolímero usado ampliamente en la industria y en la medicina como agente tensoactivo, en los alimentos, en cosmética, en farmacéutica, en la biomedicina, como agente dispersante, como disolventes, en ungüentos, en bases de supositorios como excipientes en tabletas y como laxantes. [45]

El PEG se consta de polímeros del óxido de etileno y agua, los cuales se pueden diseñar con diferentes pesos moleculares. [46] Este polímero se usa ampliamente como un modificador covalente de macromoléculas y partículas biológicas, así como un vehículo para fármacos de bajo peso molecular. [47] La estructura fundamental del PEG está compuesta por  $H-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$ , lo que lo hace una molécula inmunogénica. Además, el PEG ha sido aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) [48,49] y se ha comprobado que no induce una respuesta inmune

y aumenta la solubilidad tal como la bioactividad de las proteínas, <sup>[50]</sup> como se encuentra reportado por Quester y colaboradores, quienes utilizaron un citocromo pegilado como nanovehículo para mejorar el tratamiento de quimioterapia. <sup>[12]</sup>

### *1.1.5 Sustratos*

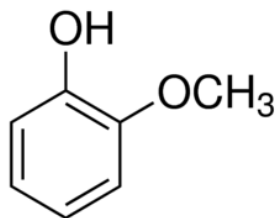
Se decidió elegir el guayacol y 2, 6-dimetoxifenol (2, 6-DMP) como sustrato, ya que estos dos fenoles son los principales constituyentes de la fracción fenólica del humo de madera, además de dar sabor y olor ahumado a los productos cárnicos. Además, los productos que se originan a través de la transformación enzimática de estas dos moléculas, se puede medir mediante espectrometría UV/VIS. <sup>[51] [52] [53]</sup>

Debido a la composición de estas moléculas, se usaron como sustratos modelo para evaluar la transformación de compuestos orgánicos por medio del CYP<sub>WMV</sub> y CYP<sub>WMV</sub>-PEG.

El guayacol es un compuesto ligeramente amarillo o incoloro, es un fenol, cuya fórmula química es C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(OH)(OCH<sub>3</sub>) (Figura 9). Este compuesto es de origen natural proveniente de la creosota de la madera, además, es biosintetizado por una variedad de organismos. <sup>[54] [55]</sup> Se usa principalmente como potenciador de varios saborizantes, como el eugenol y la vanilina. Por otra parte, es usado en la medicina como expectorante y auxiliar en el tratamiento de la laringitis bronquitis y faringitis. <sup>[56]</sup>  
<sup>[57]</sup>

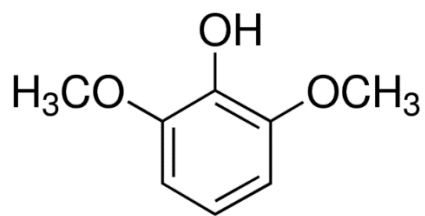
Conjuntamente se ha reportado que la intoxicación por guayacol puede producir alteraciones neurológicas, hemodinámicas, respiratorias, metabólicas, renales, digestivas y hematologías. <sup>[58]</sup>

La transformación del guayacol se puede leer por el cambio de la absorbancia en 470 nm y da como producto al tetraguayacol. <sup>[55]</sup>



**Figura 9.** Estructura química del guayacol. Imagen obtenida de <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/g10903?lang=es&region=MX>

Junto con el guayacol, el 2, 6-DMP ((CH<sub>3</sub>O)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>OH) (Figura 10), también conocido como syringol, es un compuesto aromático orgánico del tipo pirogalol con dos grupos metoxi, con un color marrón claro, debido a su sensibilidad hacia el oxígeno. Es utilizado comúnmente en la industria alimenticia como aromatizante artificial, ya que con el DMP se obtienen los olores del ahumado, por lo que es nocivo para la salud, puesto que es un componente que surge a través del humo de la madera. <sup>[59]</sup> La transformación del 2, 6-DMP arroja como producto al 3,3',5,5'-tetrametoxi-1,1'bifenil-4,4'-diol (TMBP), el cual se detecta a 468 nm. <sup>[60]</sup> <sup>[61]</sup>



**Figura 10.** Estructura química del 2,6-Dimetoxifenol. Imagen obtenida de <https://www.acs.org/content/acs/en/molecule-of-the-week/archive/s/syringol.html>

## ***1.2 Hipótesis***

La bionanopartícula CYP<sub>WMV</sub>-PEG mantendrá una eficiente bioactividad y será inmunológicamente inerte.

## ***1.3 Objetivo general.***

Sintetizar y caracterizar una bionanopartícula CYP<sub>WMV</sub>-PEG inmunológicamente inerte con actividad catalítica.

### ***1.3.1 Objetivos particulares.***

1. Expresar y purificar CYP<sub>WMV</sub> en *E. coli*.
2. Pegilar CYP<sub>WMV</sub>.
3. Determinar la cinética de CYP<sub>WMV</sub> y de CYP<sub>WMV</sub>-PEG usando los sustratos guayacol y 2, 6-DMP, con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y NADPH como donador de electrones.

## ***Capítulo 2. Metodología***

Para expresar y purificar CYP<sub>WMV</sub> en *E. coli*, se prepararon células competentes, las cuales se transformaron con el plásmido pRSFDuet-1-BM3-WMV, que codifica para el CYP<sub>WMV</sub>.

### ***2.1 Células competentes***

*E. coli* (BL21(D3)) se inoculó en 20 mL del medio 2xYT (peptona 0.8%, extracto de levadura 1%, NaCl 0.8% (w/v)) y se dejó crecer hasta una absorbancia de 0.3 a 0.6 a 600 nm. Luego se centrifugó el cultivo por 15 min a 3500 rpm y 4°C. El pellet se resuspendió en 1/20 volúmenes del medio 2xYT-CC (2xYT más NaCl 0.07%, PEG 4000 0.05%, glicerol 1%, MgSO<sub>4</sub> 0.0012%, MgCl<sub>2</sub> 0.001%, DMSO 0.5% (w/v)) y se guardaron alícuotas de 100 µL a -80°C.

### ***2.2 Transformación (choque térmico)***

50 µL de células competentes se mezclaron con 50 µL de KCM (100mM KCl, 30mM CaCl<sub>2</sub>, 50mM MgCl<sub>2</sub>) más 2 µL del plásmido pRSFDuet-1-BM3-WMV y se dejó por 30 min en hielo. Al término de este tiempo, se procedió a realizar un cambio de temperatura a 42°C por exactamente 2 minutos. La reacción se pasó nuevamente al hielo por aproximadamente 2 min, luego se le añadieron 800 uL de medio LB (bacto triptona 0.10%, extracto de levadura 0.05%, NaCl 0.16M) y la mezcla se incubó de 1 a 2 hrs a 37°C y 180 rpm. Posteriormente se centrifugó por 1 min a 1300 rpm, se retiró el sobrenadante y se plaqueó lo restante en cajas Petri con medio LB<sub>Kan</sub>, además se incubó durante la noche a 37°C. Pasado el tiempo, se seleccionó una cepa pura la cual se almacenó en alícuotas con 10% glicerol a -80°C, con la cuales se siguió trabajando.

### *2.3 Purificación del CYP<sub>WMV</sub>*

Para purificar el CYP<sub>WMV</sub>, se prepararon 50 mL de medio TB (Bacto Triptona 0.12%, Bacto extracto de levadura 0.24% (w/v), Glicerol 0.05%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.17M, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.72M) con 100 µL de metales traza (MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.011%, FeCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.3%, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.002%, ZnCl 0.0065%, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.01%, CaCl<sub>2</sub> 0.0038%, CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.0126%, H<sub>2</sub>Bo<sub>3</sub> 0.002 % en 10% HCl), tiamina 0.5mM y kanamicina (30 µg/mL), se inocularon con 500 µL del precultivo de CYP<sub>WMV</sub>, y se dejaron crecer a 25°C y 100 rpm. Después de 9 hrs, el cultivo se indujo con 0.5mM IPTG y 1mM ácido delta-aminolevulínico ( $\delta$ -ALA) por 42 hrs bajo las mismas condiciones. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 3500 rpm por 30 min y 4°C, se retiró el sobrenadante y se conservó el pellet a -80°C hasta su uso.

Las células guardadas anteriormente a -80°C, se rompieron en buffer KPi 0.1M (13.9 % K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.73% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) con inhibidor de proteasas (Sigmafast, sin EDTA), usando un sonicador Ultrasonic VC 505 / VC 750<sup>®</sup> (Sonics & Materials, INC.). La muestra se sonicó 8 veces por 1 min (9.9 segundos ON, 9.9 segundos OFF) con la macropunta al 35% de amplitud. Luego, la suspensión se centrifugó por 10 min a 15000 rpm y 4°C, posteriormente se filtró el sobrenadante por 0.22 µm. Ese extracto crudo se concentró mediante ultrafiltración usando un Amicon<sup>®</sup> con un filtro de 30 kD.

El CYP<sub>WMV</sub> se purificó con una bomba peristáltica (Bio-Scale<sup>™</sup> Econo<sup>™</sup> Gradient Pump #7319001) con la columna de intercambio aniónica (Bio-Scale<sup>™</sup> Mini Nuvia<sup>™</sup> IMAC Cartridges) usando el buffer de inicio (50mM acetato de sodio, pH 7.5) y el buffer de elución (50mM acetato de sodio, 1M cloruro de sodio, pH 7.5).

La purificación del CYP<sub>WMV</sub> comenzó con la activación de la columna de intercambio aniónica (Bio-Scale<sup>™</sup> Mini Nuvia<sup>™</sup> IMAC Cartridges), el cual, se le hizo pasar 20 mL de buffer de elución a un flujo de 3 mL/min, continuamente se repitió este paso con el buffer de inicio. Una vez realizado este paso, se le añadieron 3 mL del extracto crudo a la columna, seguidamente 9 mL de buffer de inicio. En la Tabla 1, se

muestra el protocolo que se siguió para la obtención y recolección de las diferentes fracciones del CYP<sub>WMV</sub> puro, además en la Tabla 2 se muestra el protocolo de limpieza de la columna.

Al finalizar la purificación, se realizó un gel SDS-PAGE al 12% para comprobar la presencia de CYP<sub>WMV</sub> puro.

Posteriormente se tomó la fracción más pura y se realizó una diálisis con una membrana de 14 kD por 8 hrs a 4°C, para ello se usó el buffer KPi 100mM pH 7.4 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20.07mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 79.93mM). Consecuentemente, se concentró mediante ultrafiltración con un Amicon® con un filtro de 30 kD y se guardó a -80°C con 10% de glicerol.

**Tabla 1.** La recolección de las fracciones, se tomó por cada incremento de porcentaje del buffer de elución, el cual dura 5 min. Por lo tanto, se recolectaron 15 mL por cada fracción obtenida.

<i>Tiempo (min)</i>	<i>buffer de elución</i>	<i>buffer de inicio</i>
5	10 %	90 %
5	20 %	80 %
5	30 %	70 %
5	40 %	60 %
5	50 %	50 %
5	60 %	40 %
5	70 %	30 %
5	80 %	20 %
5	90 %	10 %
5	100 %	0 %
9	0 %	100 %

**Tabla 2.** Protocolo de limpieza para la columna Bio-Scale™ Mini Nuvia™ IMAC Cartridges

<i>Tiempo (min)</i>	<i>Limpieza de columna</i>
15	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> filtrado
15	Etanol 20%

## 2.4 Concentración del CYP

Obtenido el CYP<sub>WMV</sub> puro, se determinó la concentración de la enzima usando el método de Soret, como se muestra en la Ecuación 1. [62]

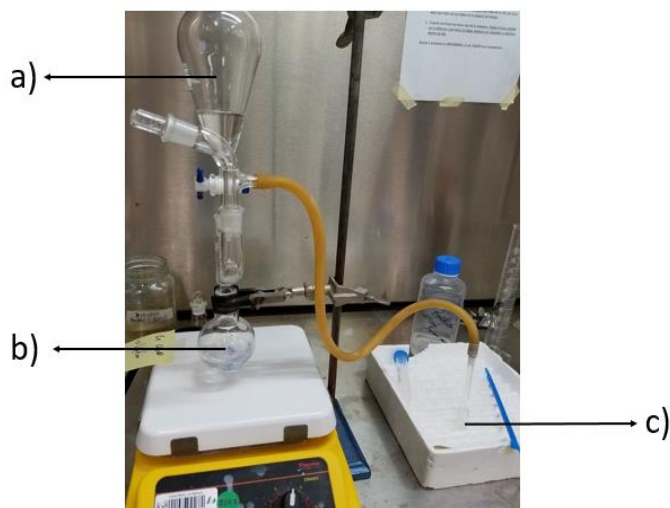
$$[CYP\ WMV] = \frac{(\Delta abs\ 425\ nm - \Delta abs\ 490\ nm)}{\epsilon_o\ del\ CYP\ (95000\ M^{-1}cm^{-1})} * dilución$$

**Ecuación 1.** Fórmula para determinar la concentración por el método de Soret. Obtenido de Schenkman, J. B., & Jansson, I. (2006).

Para determinar la concentración del CYP<sub>WMV</sub> activo, se aplicó el método de unión al monóxido de carbono (CO). [16] Se produjo monóxido de carbono adicionando ácido fórmico y ácido sulfúrico 2:1 como se muestra en la Figura 11. El CO producido se burbujeó dentro de la muestra por 2 min y posteriormente se le añadió 1 mg de hidrosulfito de sodio. [49] Ulteriormente, se analizó hasta encontrar el máximo de absorbancia a 450 nm en el equipo UV-Vis (PerkinElmer precisely Lambda 25 UV-VIS Spectrometer®) y se calculó la concentración de CYP activo mediante la Ecuación 2. [63]

$$[CYP_{WMV}] = \frac{(\Delta_{abs\ 450\ nm} - \Delta_{abs\ 490\ nm})}{\epsilon_o\ del\ CYP\ (91000\ M^{-1}cm^{-1})} * dilución$$

**Ecuación 2.** Fórmula para determinar la concentración de CYP<sub>WMV</sub> activo. Obtenido de Schenkman, J. B., & Jansson, I. (2006).



**Figura 11.** Sistema empleado para la obtención de monóxido de carbono en la cuantificación del CYP<sub>WMV</sub>, siguiendo la metodología de Omura y Sato 1964. En a) se puede observar el depósito donde se encuentra el ácido sulfúrico con el doble de volumen que el ácido fórmico que se encuentra en b) y c) muestra con CYP<sub>WMV</sub>.

## 2.5 Pegilación del CYP<sub>WMV</sub>

Debido a que no existe estructura cristalina de la mutante usada, se utilizó la estructura cristalográfica del CYP<sub>BM3</sub> F87A/T268A, el cual es una oxidoreductasa proveniente de *Bacillus megaterium* expresado en *E. coli*. Esta estructura se obtuvo mediante la base de datos Protein Data Bank® (3DGI, [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)).

A través del programa PyMOL® (Schrödinger, Cambridge, MA), se cuantificaron los residuos de aminos libres del CYP<sub>BM3</sub> 3DGI, para determinar la cantidad teórica de aminos libres del CYP<sub>WMV</sub>.

El CYP<sub>WMV</sub> se funcionalizó con metoxi PEG succinimidilcarboximetiléster 5000 (mPEG-SCM). El número de moléculas mPEG-SCM se puso en doble de concentración que los residuos aminos de la superficie del CYP<sub>BM3</sub> 3DGI para que el polímero se adhiriera a los más residuos posibles. Esta reacción se dejó en rotación por 2 hrs a temperatura ambiente, después se retiró el excedente del mPEG-SCM mediante diálisis en un buffer MES 50mM, pH 8.

### *2.6 Determinación de grupos amino libres por el método TNBS.*

Para determinar el porcentaje de pegilación del CYP<sub>WMV</sub>, se aplicó la prueba TNBS (ácido trinitrobencensulfónico) <sup>[64]</sup>, la cual consiste en un procedimiento calorimétrico de ninhidrina, que se usa para determinar el cambio en la cantidad de aminos libres en las proteínas, el cual genera una disminución en su absorbancia, proporcional a su concentración. Se usaron  $1.7 \times 10^{-2}$  nmoles del CYP<sub>WMV</sub> y del CYP<sub>WMV</sub>-PEG, a las cuales se le añadieron 250  $\mu$ L de NaCO<sub>3</sub> al 4% pH 8.5 y 250  $\mu$ L de TNBS al 0.1%. Esta mixtura se dejó en un termobloque a 40°C y en oscuridad durante 2 hrs. Finalmente, se adicionaron 125  $\mu$ L de HCl 1N y 250  $\mu$ L de SDS al 10% y se homogeneizó. Posteriormente, se analizaron las diferencias de absorbancia a 335 nm usando un equipo UV-Vis (PerkinElmer precisely Lambda 25 UV-VIS Spectrometer®).

### *2.7 Cinética del CYP<sub>WMV</sub>*

Se identificó la actividad específica enzimática,  $K_m$  y  $K_{cat}$ , del CYP<sub>WMV</sub> y CYP<sub>WMV</sub>-PEG en buffer KPi usando 3mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 0.006mM NADPH como donador de electrones y diferentes concentraciones de guayacol y 2, 6-DMP. Se observó el producto de la transformación enzimática a 470 nm para el guayacol y 468 nm para el 2, 6-DMP, usando un equipo UV-Vis (PerkinElmer precisely Lambda 25 UV-VIS Spectrometer®). Las constantes catalíticas se calcularon mediante el programa CurveExper®t (Professional de Hyams Development) de forma que se usa el modelo

de Michaelis-Menten. Se compararon los resultados obtenidos para el CYP<sub>WMV</sub> y el CYP<sub>WMV</sub>-PEG.

## 2.8 Zetasizer

Se analizó el potencial zeta y el tamaño del CYP<sub>WMV</sub> y CYP<sub>WMV</sub>-PEG mediante el equipo Zetasizer® (Malvern Panalytical), por medio de la técnica de dispersión de la luz dinámica (DLS). Este equipo es un analizador de dos ángulos de alto desempeño, que mide el potencial zeta a través del cálculo de la movilidad electroforética y con su modo de flujo le permite ser utilizado como detector de tamaño de proteínas o nanopartículas. [65] Para su análisis se hizo una dilución de 1:50 de cada muestra.

## 2.9 Análisis estadístico.

Una vez obtenido todos los resultados, se procedió a realizar el T-test, por medio del programa Microsoft Excel® (Microsoft Office). El T-test es un método estadístico que se diseñó para examinar las diferencias entre dos muestras independientes que tengan distribución normal, con varianzas iguales o desiguales (Ecuación 3). [62]

a)

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{s\bar{X}_1 - \bar{X}_2}$$

b)

$$s\bar{X}_1 - \bar{X}_2 = \sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}$$

**Ecuación 3.** Cálculo para determinar el T-test con varianzas distintas. a) Ecuación prueba t para única muestra.

b) Ecuación que estima el sesgo de la varianza de las dos muestras. Obtenido por Zabell, S. L. (2008) [66]

Donde  $\bar{X}$  es la media de la muestra,  $s$  es la desviación estándar y  $n$  es el tamaño, siendo  $s^2$  la varianza para dos muestras  $n =$  número de participantes.

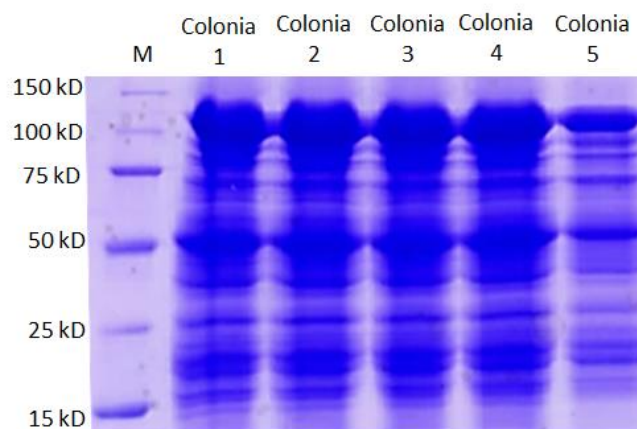
## Capítulo 3. Resultados y discusión

En la presente sección se dan a conocer los resultados obtenidos tras la producción de una bionanopartícula  $CYP_{WMV}$ -PEG inmunológicamente inerte, como también la evaluación de la cinética  $CYP_{WMV}$  y de  $CYP_{WMV}$ -PEG con los sustratos guayacol y 2, 6-DMP, con  $H_2O_2$  y NADPH como donador de electrones.

### 3.1 Transformación

A las 8 hrs de haberse incubado en cajas Petri a  $37^\circ C$ , las células competentes que fueron transformadas con el plásmido pRSFDuet-1-BM3-WMV presentaron un gran incremento celular, indicando la exitosa introducción del plásmido pRSFDuet-1-BM3-WMV. Se seleccionó una cepa pura la cual se almacenó en alícuotas con 10% de glicerol a  $-80^\circ C$ .

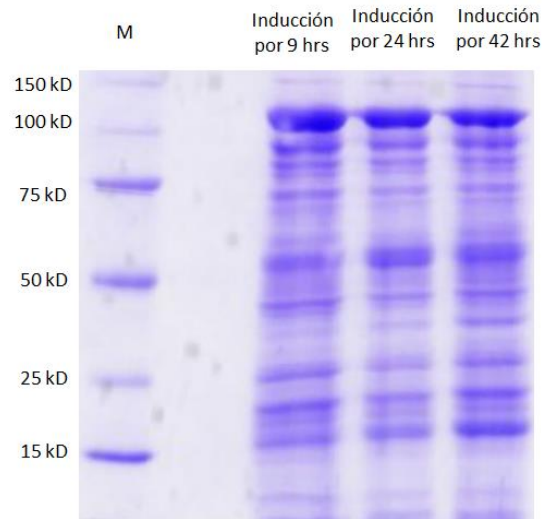
Como se muestra en la Figura 12, se obtuvo una buena sobreexpresión de  $CYP_{WMV}$  en diversas colonias de *E. coli*. Se tomó, la colonia 1 ya que esta colonia fue la que creció de manera más aislada que las otras colonias.



**Figura 12.** SDS-PAGE al 12% el cual muestra la selección de colonias de *E. coli* (BL21(D3)) con el plásmido pRSFDuet-1-BM3-WMV por medio de su sobreexpresión.

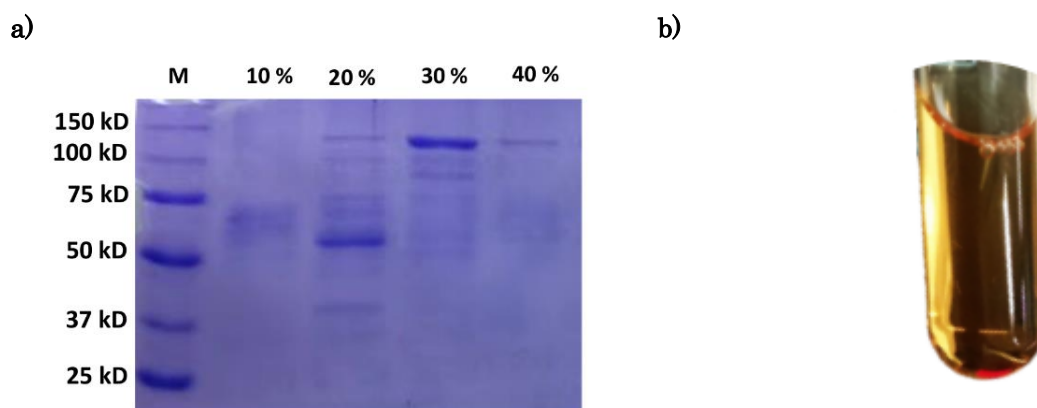
### 3.2 Expresión y purificación del CYP<sub>WMV</sub> en *E. coli*

Con la cepa seleccionada de *E. coli* (BL21(D3)) se tomó un pre-cultivo para inocular 3 matraces Erlenmeyer con medio TB, para realizar una prueba de expresión del CYP<sub>WMV</sub>, dónde todos se indujeron con IPTG a las 9 hrs. Los cultivos se dejaron en incubación por 9, 24 y 42 hrs respectivamente, con la finalidad de encontrar el tiempo justo donde se obtendrá la mayor cantidad de CYP<sub>WMV</sub> producido, después de haber sido inducido. En la Figura 13 se muestra un gel de poliacrilamida al 12%, en el primer carril, de izquierda a derecha, se muestra el marcador de peso molecular, en el segundo se muestra la inducción por 9 hrs, seguido de la inducción por 24 hrs y posteriormente por 42 hrs. Se observa que las bandas más fuertes son correspondientes al CYP<sub>WMV</sub>, ya que se encuentran cerca del marcador de 120 kD el cual es el peso teórico del CYP<sub>WMV</sub>. La inducción durante 9 hrs es la más exitosa, ya que se obtiene una mayor cantidad de CYP en menos tiempo.



**Figura 13.** SDS-PAGE al 12% donde se muestra la sobreexpresión del CYP<sub>WMV</sub> (120 kD) con diferentes tiempos de inducción mediante IPTG.

Con la purificación por medio de la cromatografía de intercambio aniónica se mostró que al 30 % del buffer de elución, se presenta el mayor porcentaje del CYP<sub>WMV</sub> puro (Figura 14a), además de confirmar la banda del tamaño esperado de 120 kDa, las fracciones colectadas mostraron el color rojizo típico, debido a la presencia del grupo hemo (Figura 14b).



**Figura 14.** Purificación del CYP con la banda característica a 120 kD (peso teórico del CYP<sub>WMV</sub>). a) 12% SDS-PAGE con diferentes fracciones obtenidas mediante cromatografía aniónica. b) Fracción colectada al 30% del buffer de elución con el color rojo, típico para los citocromos debido a la presencia del grupo hemo.

### 3.3 Determinación de la concentración del CYP<sub>WMV</sub> purificado

La concentración del CYP<sub>WMV</sub> por la técnica de unión al monóxido de carbono (Ecuación 4) fue de 6.1174  $\mu$ M de citocromo activo (Figura 15) y mediante la prueba de Soret se obtuvo 8.3845  $\mu$ M (Ecuación 5).

Debido a que la prueba de unión al monóxido de carbono arroja la concentración total del CYP activo y la prueba de Soret da la concentración total del CYP activo e inactivo, esta prueba siempre arrojará una concentración más grande que la prueba de unión al monóxido de carbono.

Muestra 1 = 5.3186 uM → 5.3186 nmol/mL → 15.9558 nmol/3mL

Muestra 2 = 4.3186 uM → 4.3186 nmol/mL → 12.9558 nmol/3mL

Muestra 3 = 8.7142 uM → 8.7142 nmol/mL → 26.1426 nmol/3mL

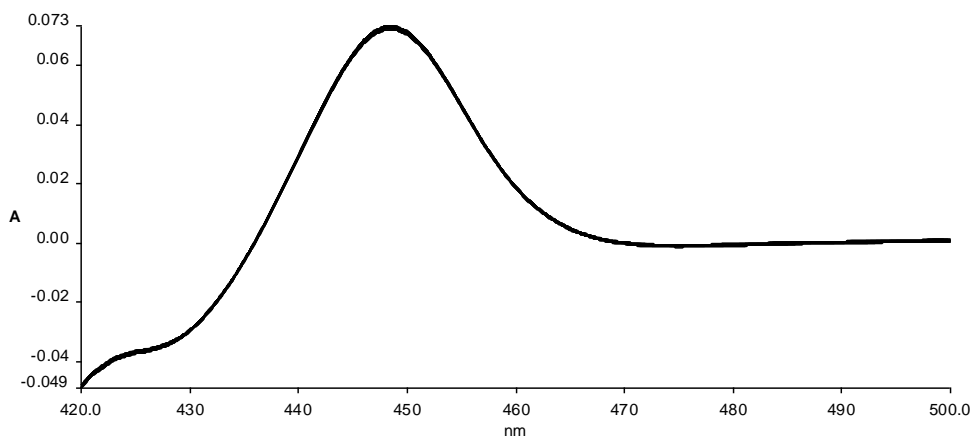
Conjunto total = 55.0569 nmol/9mL

Muestra total = 6.1174 nmol/mL → 6.1174 uM

**Ecuación 4.** Cálculo de la concentración total de CYP<sub>WMV</sub> activo por la técnica de unión al monóxido de carbono.

$$[CYP\ WMV] = \frac{(0.17382 - 0.094167)}{(95000\ M^{-1}cm^{-1})} * 10 = 8.3845\ \mu M$$

**Ecuación 5.** Cálculo de la determinación de la concentración por la prueba de Soret.



**Figura 15.** Gráfica obtenida mediante el ensayo de CO. La cual muestra un barrido de 420 a 500 nm, donde se puede observar con facilidad el pico característico del CYP en 450 nm.

### 3.4 Pegilación del CYP<sub>WMV</sub> y determinación de grupos amino libres (TNBS)

Se cuantificaron 41 residuos de aminos libres en la superficie de la enzima con el programa PyMOL®, marcados en azul en la Figura 16.

Con los 41 aminos libres encontrados, se usó 0.3058 mg de PEG 5000 para la pegilación (Ecuación 6). Al tener CYP<sub>WMV</sub>-PEG, se realizó el ensayo de TNBS, en el que se obtuvo que el 17% de los aminos están ocupadas por PEG.

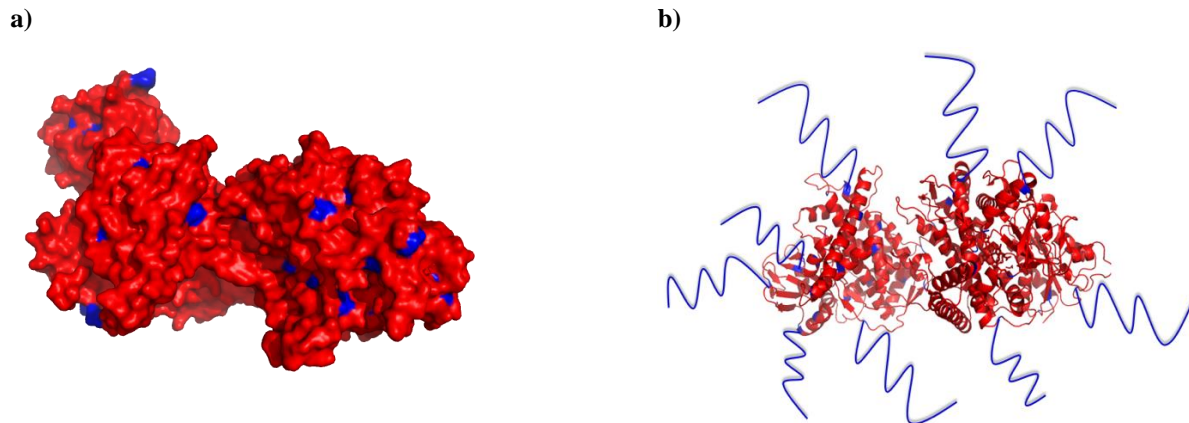
$$(6.1174 \frac{\text{nmol}}{\text{mL}} \text{ de CYPWMV}) \times (5 \text{ mL de CYP WMV tomados}) = 30.5871 \frac{\text{nmol}}{5\text{mL}}$$

$$\left(30.5871 \frac{\text{nmol}}{5\text{mL}}\right) \times (2) = 61.1743 \frac{\text{nmol}}{5\text{mL}} \text{ de PEG necesarios para tener la doble concentración de PEG.}$$

$$\frac{(61.1743 \text{ nmol})(5000 \text{ g})}{1 \times 10^9 \text{ nmol}} = 3.0587 \times 10^{-4} \text{ g} \rightarrow 0.3058 \text{ mg de PEG 5000}$$

**Ecuación 6.** Cálculo de la Determinación de la cantidad de PEG usado para la pegilación del CYP<sub>WMV</sub>.

Al agregarle el PEG a esta bionanopartícula baja su inmunogenicidad, como lo demuestra Quester y colaboradores quienes utilizaron un citocromo pegilado como nanovehículo para mejorar el tratamiento de quimioterapia o Alejo -González, quien utilizó una mutante del CYP<sub>BM3</sub> pegilado como biocatalizador en la intoxicación por plaguicidas. [12] [13]



**Figura 16.** Estructura tridimensional del CYP<sub>WMV</sub>. En a) se muestra la estructura superficial del CYP<sub>WMV</sub> en color rojo y en azul se muestran los aminos libres. En b) se puede observar la estructura del CYP<sub>WMV</sub> pegilado con los monómeros del PEG unidos a cada amina libre que se encuentra en la superficie. Representado de color azul. Imagen generada con el programa Pymol®.

### 3.5 Cinética del CYP<sub>WMV</sub> y CYP<sub>WMV</sub>-PEG

Para evaluar la actividad del CYP<sub>WMV</sub> y el CYP<sub>WMV</sub>-PEG con respecto a la transformación de compuestos orgánicos, se realizó una curva de saturación para ello se usó el guayacol y 2, 6-DMP como sustrato, en presencia de 3 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 0.006mM de NADPH.

Las constantes catalíticas,  $K_m$  y  $k_{cat}$  para el CYP<sub>WMV</sub> y CYP<sub>WMV</sub>-PEG se calcularon con el programa CurveExpert® Professional de Hyams Development usando el modelo de Michaelis-Menten y la cinética se realizó mediante espectrofotometría a 470 nm para el guayacol y 468 nm para el 2-6 DMP los resultados se muestran en la Tabla 3. [67] [68]

**Tabla 3.** Constantes de especificidad del CYP<sub>WMV</sub> y CYP<sub>WMV</sub>-PEG usando como sustrato guayacol y DMP y usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como donador de electrones.

<b>Guayacol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>K<sub>m</sub> (<math>\mu</math>M)</b>	<b>K<sub>cat</sub> (min<sup>-1</sup>)</b>	<b>Coefficiente de correlación</b>	<b>Error estándar</b>
• CYP <sub>WMV</sub>	76.65	9.6	0.99	0.97
• CYP <sub>WMV</sub> -PEG	39.09	6.55	0.98	0.35
<b>2, 6-DMP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>				
• CYP <sub>WMV</sub>	12.82	17.84	0.97	1.36
• CYP <sub>WMV</sub> -PEG	7.28	14.47	0.99	0.35

Los resultados muestran que, en la transformación tanto del guayacol como del 2, 6-DMP, el CYP<sub>WMV</sub>-PEG presentó un mejor desempeño en la constante de disociación K<sub>m</sub> en comparación con el CYP<sub>WMV</sub>, reflejando así una mayor interacción entre la enzima y el sustrato. Sin embargo, el CYP<sub>WMV</sub> y el CYP<sub>WMV</sub>-PEG obtuvieron una mayor eficiencia enzimática en la transformación del 2, 6-DMP que en la transformación del guayacol.

La unión del PEG al CYP<sub>WMV</sub> alteró la interacción entre la enzima y el sustrato, ya que, posiblemente, esta perturbación que se le hizo al CYP<sub>WMV</sub> atribuyó a que la enzima incrementara su flexibilidad, lo que le permitió que tuviera una mayor fijación del sustrato al sitio activo de la enzima, lo que también se ha mostrado por Alejandro González y colaboradores, quienes realizaron una comparación de la actividad catalítica del CYP<sub>BM3</sub>F87A pegilado y no-pegilado. [13] [69]

En la prueba de cinética con NADPH como donador de electrones, el CYP<sub>WMV</sub> y CYP<sub>WMV</sub>-PEG no presentaron una buena reacción enzimática, por ello se decidió pausar la experimentación con NADPH.

### 3.6 Potencial zeta y tamaño.

El potencial zeta es un parámetro físico que caracteriza la carga electrostática de las partículas. Su medida da la magnitud de la repulsión o atracción entre las partículas en el medio acuoso en el que se encuentran proporciona una idea detallada de los mecanismos de dispersión. <sup>[70]</sup> <sup>[71]</sup> En la Tabla 4 se muestran los diferentes parámetros que describen la estabilidad de la partícula en el medio de dispersión. <sup>[72]</sup>

**Tabla 4.** Parámetros de la estabilidad de la dispersión. Datos obtenidos de Hunter, R. J. (2013). Zeta potential in colloid science: principles and applications. Pág. 59-219.

<i>Potencial zeta</i>	<i>Comportamiento de estabilidad</i>
$\pm 0$ a $\pm 5$	Conglomeración rápida
$\pm 5$ a $\pm 30$	Estabilidad baja
$\pm 30$ a $\pm 40$	Estabilidad moderada
$\pm 40$ a $\pm 61$	Estabilidad excelente

En la Figura 17 se muestra la distribución del potencial zeta de ambas muestras, y en la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos al medir el potencial zeta del CYP<sub>WMV</sub> y del CYP<sub>WMV</sub>-PEG, los cuales arrojan que las muestras analizadas son de estabilidad baja a moderada, ya que el potencial zeta es de  $-28.03 \pm 3.29$  y  $-24.70 \pm 0.78$  mV.

La baja estabilidad pudo haber sido afectada por el uso del buffer KPi 0.1M pH 7.4 en el que se encuentran suspendida dicha enzima, ya que otros autores como Quester y colaboradores utilizan el buffer MES 0.05M pH 8 como buffer de suspensión para el CYP-PEG. <sup>[12]</sup>

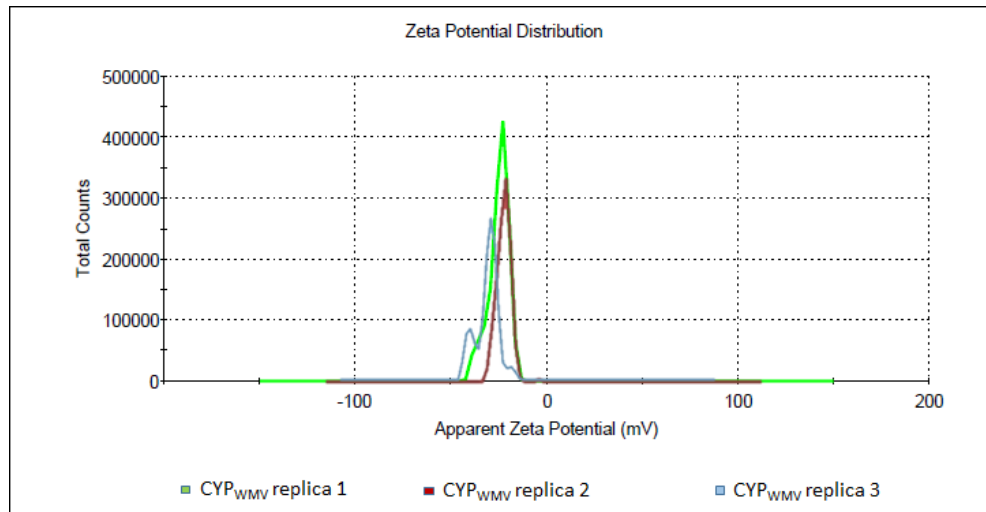
La diferencia entre los buffers de suspensión del CYP-PEG radica no solo en su composición, si no también se puede ver afectada por la diferencia de pH de los buffers.

Dado que al  $CYP_{WMV}$  se le adiciono el PEG, esto provocó una diferencia en la estabilidad de esta bionanopartícula. Pero al estar los dos en un mismo rango de estabilidad, se puede decir que al añadirle el PEG no afecta a su estabilidad ni su actividad.

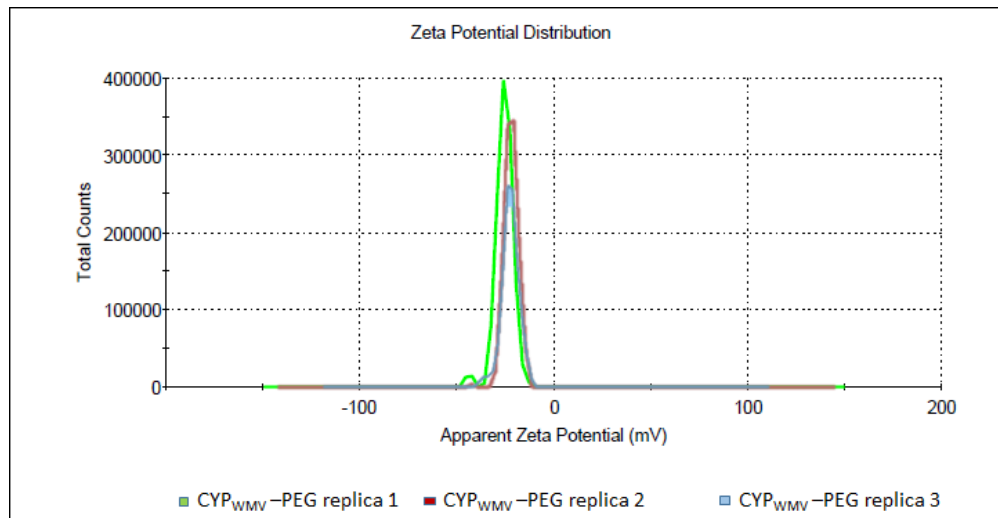
**Tabla 5.** Potencial zeta  $CYP_{WMV}$  y  $CYP_{WMV}$ -PEG, obtenidos por el equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical)

	<b>Potencial Zeta (mV)</b>	<b>Desviación Estándar</b>	<b>Error</b>
$CYP_{WMV}$	-28.03	3.29	1.64
$CYP_{WMV}$ -PEG	-24.7	0.78	0.39

a)



b)



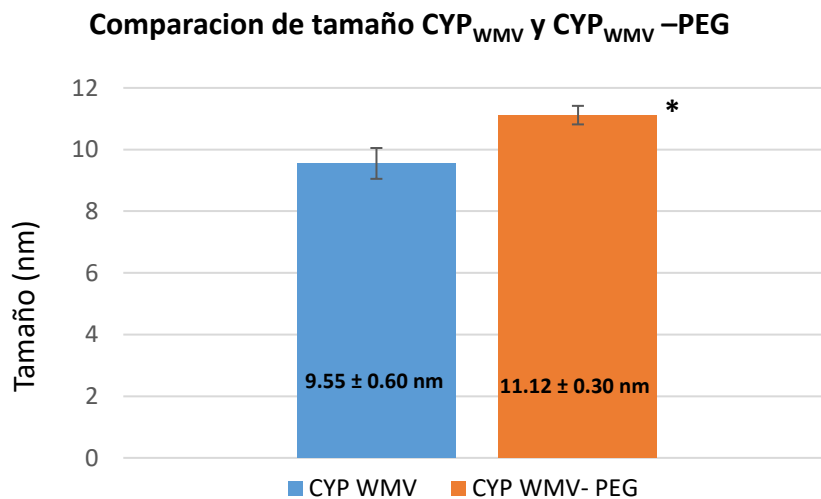
**Figura 17.** Potencial zeta. Se observan las gráficas, que fueron obtenidas mediante el equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical). a) muestra al CYP<sub>WMV</sub>, el cual obtuvo -28.03 mV y el b) CYP<sub>WMV</sub>-PEG con -24.7 mV.

Con el mismo equipo se determinó el tamaño del CYP<sub>WMV</sub> y del CYP<sub>WMV</sub>-PEG (Tabla 6), para ello se usó la dispersión de la luz dinámica. En la Figura 18 se muestra un histograma que representa los tamaños de ambas muestras y la Figura 19 muestra la distribución de tamaño de ambas muestras. Debido a que el PEG permite alterar el radio hidrodinámico de las moléculas a las que se le une, se obtuvo que el CYP<sub>WMV</sub>

-PEG alcanzó una medida de  $11.11 \pm 0.29$  nm, la que representa un aumento de tamaño significativo en comparación con los  $9.55 \pm 0.6$  nm del CYP<sub>WMV</sub>.

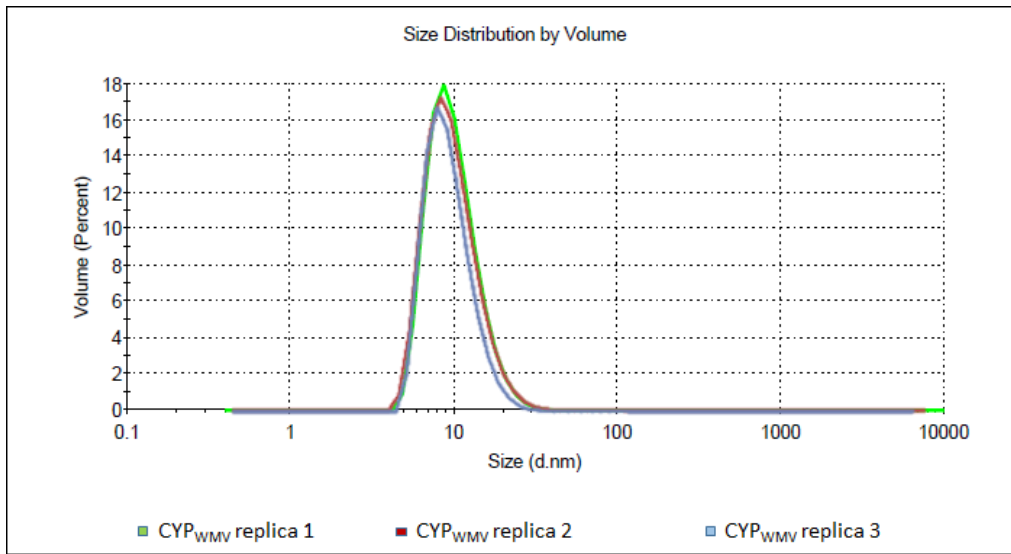
**Tabla 6.** Tamaños determinados del CYP<sub>WMV</sub> y CYP<sub>WMV</sub>-PEG, por el por el equipo Zetasizer Nano ZS.

	<b>Tamaño (nm)</b>	<b>Desviación Estándar</b>	<b>Error</b>	<b>Varianza</b>	<b>Diferencia significativa del tamaño (0.05)</b>
CYP <sub>WMV</sub>	9.55	0.6	0.3	0.36	0.028
CYP <sub>WMV</sub> -PEG	11.11	0.29	0.14	0.088	

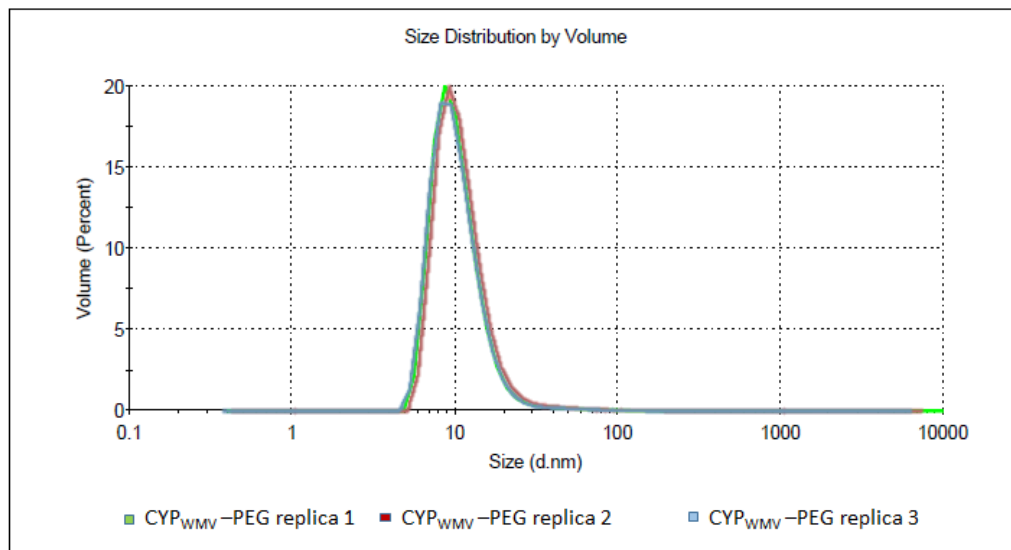


**Figura 18.** Se muestra el histograma de los tamaños del CYP<sub>WMV</sub> y CYP<sub>WMV</sub>-PEG, teniendo una diferencia significativa del tamaño de 2.8% para el 5%.

a)



b)



**Figura 19.** Determinación del tamaño. Se observan las gráficas del tamaño, que fueron obtenidas mediante el equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical). a) CYP<sub>WMV</sub>, con una medida de  $9.55 \pm 0.60$  nm y el b) CYP<sub>WMV</sub>-PEG  $11.12 \pm 0.30$ .

Con los resultados recabados se puede decir que el CYP<sub>WMV</sub> presenta una actividad catalítica muy buena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como donador de electrones, además, se encontró que el CYP<sub>WMV</sub> no pierde su actividad al ser pegilado, lo que le brinda un potencial muy grande para su uso en la transformación de compuestos xenobióticos dando origen a nuevas investigaciones.

## *Capítulo 4. Conclusiones*

- Mediante la purificación del CYP<sub>WMV</sub> que se estableció se obtiene 734.088 mg de CYP<sub>WMV</sub> activo por cada litro de cultivo.
- En la Pegilación solo se logró ocupar el 17.12%. Aun así, genera un buen escenario tanto en su actividad como en su aplicación, ya que al añadirle PEG al CYP<sub>WMV</sub> baja considerablemente su inmunogenicidad.
- Los dos sustratos orgánicos utilizados se transformaron exitosamente y no mostraron una inhibición de la actividad de CYP<sub>WMV</sub>-PEG en comparación a CYP<sub>WMV</sub> usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como donador de electrones.
- Tanto el CYP<sub>WMV</sub> –PEG como el CYP<sub>WMV</sub> presentaron tamaños proporcionales a sus medidas teóricas.
- Debido a los resultados obtenidos, la mutante WMV podría tener un gran potencial en la transformación de compuestos tóxicos (por ejemplo, pesticidas o subproductos industriales que se convierten en contaminantes ambientales).

## *Referencias*

- [1] Goodsell, D. S. (2004). *Bionanotechnology: lessons from nature*. John Wiley & Sons. ISO 690 Pg. 1, 2.
- [2] Robles Vázquez O., & Hernández E. (2009). Nanotecnología: comunicando un concepto nuevo. *Razón y Palabra*, pg. 1-2.
- [3] Marcelo, J. Alerta científica sobre los riesgos para la salud y el medio ambiente de la nanotecnología. Servicio especial [actualizado 2004, citado 8 Ago 2008].
- [4] Vega Baudrit, J. (2007). *Laboratorio de Nanotecnología (LANOTEC)*. Costa Rica: Instituto Tecnológico.
- [5] Mejias Sánchez, Y., Cabrera Cruz, N., Toledo Fernández, A. M., & Duany Machado, O. J. (2009). La nanotecnología y sus posibilidades de aplicación en el campo científico-tecnológico. *Revista Cubana de Salud Pública*, 35(3), 0-0.
- [6] Cerón Quispe, W. (2010). *Bionanotecnología*. *Revista de Información, Tecnología y Sociedad*, pg. 1.
- [7] Mejias Sánchez, Y., Cabrera Cruz, N., Toledo Fernández, A. M., & Duany Machado, O. J. (2009). La nanotecnología y sus posibilidades de aplicación en el campo científico-tecnológico. *Revista Cubana de Salud Pública*, 35(3), 0-0.
- [8] Fernández, A. G., de Sande García, M. A., Fernández, A. M. M., Ramos, S. B., & Galán, M. J. G. (2011). Aspectos fundamentales del Citocromo P450. FUNDACIÓN TEJERINA.
- [9] Hrycay, E. G., and Bandiera, S. M. 2015. Monooxygenase, Peroxidase and Peroxygenase Properties and Reaction Mechanisms of Cytochrome P450 Enzymes. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 851 (2). Elsevier Inc.: 1–61. doi:10.1007/978-3-319-16009-2\_1.
- [10] Grupo anestesiario (2009). La importancia del Citocromo P450. <http://anestesiario.org/2009/la-importancia-del-citocromo-p450/>
- [11] IUPAC. Cytochrome P450. (2003) Glossary of terms used in toxicokinetics. <http://anestesiario.org/2009/la-importancia-del-citocromo-p450/>

- [12] Quester, K., Juarez-Moreno, K., Secundino, I., Roseinstein, Y., Alejo, K. P., Huerta-Saquero, A., & Vazquez-Duhalt, R. (2017). Cytochrome P450 bioconjugate as a nanovehicle for improved chemotherapy treatment. *Macromolecular bioscience*.
- [13] Alejo González Karla P. (2017). Diseño de nanopartículas con actividad citocromo P450 inmunológicamente inertes. Tesis Doctoral. CICESE
- [14] Devlin, T. M. (2004). *Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas*. Reverté. pg. 476.
- [15] Rodríguez, E. M. D. R. C., Purata, A., & Cruz, P. H. (2010). Citocromo P450 biomarcador de exposición terapéutico-toxicológico-carcinogénico. *REB*, 29(2), 39-52.
- [16] Guengerich, F. P., Martin, M. V., Sohl, C. D., & Cheng, Q. (2009). Measurement of cytochrome P450 and NADPH–cytochrome P450 reductase. *Nature protocols*, 4(9), 1245-1251. Pg. 1.
- [17] Ritter, C. (2016). *Towards Bioorthogonal Enzymatic Uncaging Reactions*. Tesis doctoral.
- [18] Sanchez-Sanchez, L., Roman, R., and Vazquez-Duhalt, R. 2012. Pesticide Transformation by a Variant of CYPBM3 with Improved Peroxygenase Activity. *Pesticide Biochemistry and Physiology*
- [19] Guengerich, F. P. 1993. Cytochrome P450 Enzymes. *American Scientist*, 81(5), 440–447. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/29775011>
- [20] Donato, M. T. (2004). ¿Qué es el citocromo P-450 y cómo funciona? *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*.
- [21] Joo, H., Lin, Z., & Arnold, F. H. (1999). Laboratory evolution of peroxide-mediated cytochrome P450 hydroxylation. *Nature*, 399(6737), 670.
- [22] Hrycay, E. G., & Bandiera, S. M. (2015). Monooxygenase, peroxidase and peroxygenase properties and reaction mechanisms of cytochrome P450 enzymes. In *Monooxygenase, Peroxidase and Peroxygenase Properties and Mechanisms of Cytochrome P450* (pp. 1-61). Springer, Cham.

- [23] Matsunaga, I., Ueda, A., Fujiwara, N., Sumimoto, T., & Ichihara, K. (1999). Characterization of the ybdT gene product of *Bacillus subtilis*: Novel fatty acid  $\beta$ -hydroxylating cytochrome P450. *Lipids*, 34(8), 841-846.
- [24] Cirino, P. C., and Arnold, F. H. 2002. Regioselectivity and Activity of Cytochrome P450 BM-3 and Mutant F87A in Reactions Driven by Hydrogen Peroxide. *Advanced Synthesis and Catalysis* 344 (9): 932–37.
- [25] Ritter, C., Nett, N., Acevedo-Rocha, C. G., Lonsdale, R., Kräling, K., Dempwolff, F., & Meggers, E. (2015). Bioorthogonal enzymatic activation of caged compounds. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(45), 13440-13443.
- [26] Ritter, C., Nett, N., Acevedo-Rocha, C. G., Lonsdale, R., Kräling, K., Dempwolff, F., & Meggers, E. (2015). Bioorthogonale enzymatische Aktivierung maskierter Verbindungen. *Angewandte Chemie*, 127(45), 13640-13644.
- [27] Kumar, V., Yadav, C. S., Singh, S., Goel, S., Ahmed, R. S., Gupta, S., & Banerjee, B. D. (2010). CYP 1A1 polymorphism and organochlorine pesticides levels in the etiology of prostate cancer. *Chemosphere*, 81(4), 464-468.
- [28] Organización Mundial de la Salud (2016). ¿Residuos de plaguicidas en los alimentos?. <http://www.who.int/features/qa/87/es/>
- [29] Fernández, A. G., de Sande García, M. A., Fernández, A. M. M., Ramos, S. B., & Galán, M. J. G. (2011). Aspectos fundamentales del Citocromo P450. FUNDACIÓN TEJERINA.
- [30] Guengerich, F. P., Martin, M. V., Sohl, C. D., & Cheng, Q. (2009). Measurement of cytochrome P450 and NADPH–cytochrome P450 reductase. *Nature protocols*, 4(9), 1245-1251.
- [31] Alberts, B., & Bray, D. (2006). *Introducción a la biología celular*. Ed. Médica Panamericana.
- [32] Vidal-Limón, A., Águila, S., Ayala, M., Batista, C. V., & Vazquez-Duhalt, R. (2013). Peroxidase activity stabilization of cytochrome P450BM3 by rational

analysis of intramolecular electron transfer. *Journal of inorganic biochemistry*, 122, 18-26.

- [33] Narhi, L. O., & Fulco, A. J. (1986). Characterization of a catalytically self-sufficient 119,000-dalton cytochrome P-450 monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*. *Journal of Biological Chemistry*, 261(16), 7160-7169.
- [34] Brahmaiah, P., Sathish, T., Hymavathi, M., Reddy, K. S., & Prakasham, R. S. (2010). Sequencing of partial cypD gene for screening of Bifunctional Cytochrome P450 Monooxygenases from *Bacillus cereus* group. *Current Trends in Biotechnology & Pharmacy*, 4(3).
- [35] Yun, C. H., Kim, K. H., Kim, D. H., Jung, H. C., & Pan, J. G. (2007). The bacterial P450 BM3: a prototype for a biocatalyst with human P450 activities. *Trends in biotechnology*, 25(7), 289-298.
- [36] Pinto, J. T., & Rivlin, R. S. (2013). 6 Riboflavin (Vitamin B2). *Handbook of Vitamins*, 191.
- [37] Tinoco Valencia Raunel y Vázquez-Duhalt Rafael (2007) Biocatálisis ambiental. *Biotecnología V14 CS3.indd* 347. [http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro\\_25\\_aniv/capitulo\\_30.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_30.pdf)
- [38] Tafoya Romero Paulina (2017). Diseño de nanopartículas virales con actividad citocromo P450 con NADPH como fuente de electrones. Tesis de maestría CICESE.
- [39] Reyes, S., Soledad, M., & Rozowski, J. (2003). Alimentos transgénicos. *Revista chilena de nutrición*, 30(1), 21-26.
- [40] Chambers, H. F. (1998). Chloramphenicol, tetracyclines, macrolides, clindamycin, and streptogramins. *Basic and Clinical Pharmacology*. Edited by Katzung BG. New York, Appleton-Lange, 746-747.
- [41] Cabello, R. R. (2007). *Microbiología y parasitología humana/Microbiology and Human Parasitology: Bases etiológicas de las*

enfermedades infecciosas y parasitarias/Etiological Basis of Infectious and Parasitic Diseases. Ed. Médica Panamericana.

- [42] Desgarenes, M. D. C. P., Rivera, L. E. C., Ramos, A. P., & Ortiz, L. G. P. (2011). Kanamicina: una alternativa terapéutica para pacientes con actinomicetomas. *Dermatol Rev Mex*, 55(3), 112-118.
- [43] González-Fernández, A., Olmedo, M. P., Fernández, T. L., Vázquez, R. S., & Freitas, B. D. Nanotecnología y sistema inmunitario.
- [44] Kindt, T. J., Goldsby, R. A., Osborne, B. A., & Kuby, J. (2007). *Inmunología de Kuby* (No. Sirsi) i9789701064542). Pag. 2
- [45] Chen, J., Spear, S. K., Huddleston, J. G., & Rogers, R. D. (2005). Polyethylene glycol and solutions of polyethylene glycol as green reaction media. *Green Chemistry*, 7(2), 64-82
- [46] Zalipsky, S. (1995). Chemistry of polyethylene glycol conjugates with biologically active molecules. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 16(2-3), 157-182.
- [47] Ikeda, Y., & Nagasaki, Y. (2011). PEGylation technology in nanomedicine. In *Polymers in Nanomedicine* (pp. 115-140). Springer Berlin Heidelberg.
- [48] Roberts, M. J., Bentley, M. D., & Harris, J. M. (2012). Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Advanced drug delivery reviews*, 64, 116-127.
- [49] Omura, T., & Sato, R. (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes I. Evidence for its hemoprotein nature. *Journal of Biological Chemistry*, 239(7), 2370-2378.
- [50] Chen, J., Spear, S. K., Huddleston, J. G., & Rogers, R. D. (2005). Polyethylene glycol and solutions of polyethylene glycol as green reaction media. *Green Chemistry*, 7(2), 64-82.
- [51] Kjällstrand, J., & Petersson, G. (2001). Phenolic antioxidants in wood smoke. *Science of the Total Environment*, 277(1-3), 69-75.

- [52] Knowles, M. E., Gilbert, J., & McWeeny, D. J. (1975). Phenols in smoked, cured meats: Nitrosation of phenols in liquid smokes and in smoked bacon. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26(3), 267-276.
- [53] Issenberg, P., & Lustre, A. O. (1970). Phenolic components of smoked meat products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 18(6), 1056-1060.
- [54] Duffey, S. S., Aldrich, J. R., & Blum, M. S. (1977). Biosynthesis of phenol and guaiacol by the hemipteran *Leptoglossus phyllopus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 56(2), 101-102.
- [55] Autor desconocido (2018) Western Washington University. ENZYME ACTIVITY. Readings: Review pp. 51-58, and 128-139 in your text (POHS, 5th ed.). [http://fire.biol.wwu.edu/cmoyer/zztemp\\_fire/biol201\\_F99/labs/3enz.pdf](http://fire.biol.wwu.edu/cmoyer/zztemp_fire/biol201_F99/labs/3enz.pdf)
- [56] Esposito, L. J., Formanek, K., Kientz, G., Mauger, F., Maureaux, V., Robert, G., & Truchet, F. (1997). Vanillin. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*.
- [57] Gali, F., Gutiérrez, E. (1903) *Anales de la real academia de medicina*. Tomo XXIII. Cuadernos 2 y 3. Pág. 153.
- [58] González, María., Ibarra, Gilberto. (1998) Caso clínico. Intoxicación por guayacol. *Revista médica del hospital general de México S.S.* Vol. 61, Núm. 3. [https://books.google.com.mx/books?id=FDaaAAAAIAAJ&pg=PA163&dq=guayacol&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwi1jYjc6q\\_aAhVK4oMKHUmZAWgQ6AEIKjAB#v=onepage&q=guayacol&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=FDaaAAAAIAAJ&pg=PA163&dq=guayacol&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwi1jYjc6q_aAhVK4oMKHUmZAWgQ6AEIKjAB#v=onepage&q=guayacol&f=false)
- [59] Mrak, EM, Chichester, CO y Schweigert (1984). *Advances in Food Research*, Volumen 29. Londres: Academic Press, Inc. pp. 129-130. ISBN 9780080567488 .
- [60] Edens, W. A., Goins, T. Q., Dooley, D., & Henson, J. M. (1999). Purification and characterization of a secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7), 3071-3074.

- [61] Wan, Y., Du, Y., & Miyakoshi, T. (2008). Enzymatic catalysis of 2, 6-dimethoxyphenol by laccases and products characterization in organic solutions. *Science in China Series B: Chemistry*, 51(7), 669-676.
- [62] Student. (1908). The probable error of a mean. *Biometrika*, 1-25
- [63] Schenkman, J. B., & Jansson, I. (2006). Spectral analyses of cytochromes P450. In *Cytochrome P450 Protocols* (pp. 11-18). Humana Press, Totowa, NJ.
- [64] Habeeb, A. S. A. (1966). Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. *Analytical biochemistry*, 14(3), 328-336.
- [65] Malvern Panalytical - Zetasizer Nano ZS (2018) <https://www.malvernpanalytical.com/es/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zs>
- [66] Zabell, S. L. (2008). On Student's 1908 Article "The Probable Error of a Mean". *Journal of the American Statistical Association*, 103(481), 1-7.
- [67] Schwaneberg, U., Schmidt-Dannert, C., Schmitt, J., and Schmid, R. D. 1999. A Continuous Spectrophotometric Assay for P450 BM-3, a Fatty Acid Hydroxylating Enzyme, and Its Mutant F87A. *Analytical Biochemistry*.
- [68] Doerge, D. R., Divi, R. L., & Churchwell, M. I. (1997). Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. *Analytical biochemistry*, 250(1), 10-17.
- [69] Vazquez-Duhalt, R.I, Fedorak, P. M., and Westlake Donald, W. S. 1992. Role of Enzyme Hydrophobicity in Biocatalysis in Organic Solvents. *Enzyme and Microbial Technology* 14 (10): 837–41. doi:10.1016/0141-0229(92)90101-S.
- [70] Aguilar, M. I. (2002). Tratamiento físico-químico de aguas residuales: coagulación-floculación. EDITUM.
- [71] Yoval, L. S., Palacios, L. M., Soberanis, M. P., & Guzmán, L. O. S. (2000). Potencial zeta como una herramienta para determinar la aglomeración de las

partículas en la reducción del volumen del lodo a disponer. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.

- [72] Hunter, R. J. (2013). *Zeta potential in colloid science: principles and applications* (Vol. 2). Academic press.