

CARACTERIZACIÓN TERMODINÁMICA DE LA ENCAPSULACIÓN DE 1,3 β-GLUCANASA DE *Trichoderma spp.* EN LIPOSOMAS DE LECITINA DE SOYA

Alejandra Pérez, Antonio Juárez, Alejandra Sánchez, José L. Martínez, Anna Iliina
Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, Ing. José Cárdenas Valdés, SN, CP 25000; Tel: (844) 4155392. e-mail: anna_ilina@hotmail.com

Palabras clave: liposomas, 1,3 β-Glucanasa, coeficiente de reparto.

Introducción. Considerando la tendencia mundial en la producción de alimentos libres de compuestos tóxicos, se destaca la importancia de la aplicación de las enzimas en agricultura para sustituir los fungicidas químicos, así la enzima 1,3- β-glucanasa (laminarinasa, EC 3.2.1.6.), la cual hidroliza la pared de hongos fitopatógenos, puede ser utilizada en control de las enfermedades micóticas de las plantas. Sin embargo, su aplicación es limitada por la influencia de los factores extrínsecos del campo como la temperatura, actividad proteolítica, radiación UV, etc., sobre la estabilidad de enzima. Por lo que la encapsulación en liposomas puede ser una solución para proteger la enzima, aumentar su estabilidad y lograr una liberación prolongada.

El objetivo del presente trabajo fue definir las condiciones de ensayo más adecuadas para la encapsulación de la enzima glucanasa en liposomas de lecitina de soya, basándose en las propiedades termodinámicas del proceso.

Metodología. Para la obtención de los liposomas, se empleó lecitina de soya comercial previamente purificada. La obtención de la capa lipídica se llevó a cabo en un matraz de fondo redondo de 2 L mediante la evaporación de 1 ml de la solución metanólica de lecitina (1). Posteriormente al matraz se adicionó la solución enzimática a diferentes concentraciones (5, 10, 15 y 20 µg/mL) en buffer de acetatos (1 M, pH 5.5). Después de agitación intensa por 30 min, la suspensión se pasó a un tubo de ensayo para dejarla a madurar durante 24 h a diferentes temperaturas (4, 25, 30, 35 y 40°C). Pasado este tiempo la suspensión se centrifugó por 1 h a 3000 rpm, se separaron y se pesaron las 2 fases. Se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford a la solución enzimática sin encapsular y a la fase acuosa obtenida en sobrenadante. Los parámetros termodinámicos se calcularon de acuerdo al Lozano y Avila (2). Los coeficientes de reparto entre fase acuosa y orgánica se calcularon mediante la ecuación: $K = W_{aq}(C_0C_f)/(C_fW_{org})$, donde W_{aq} y W_{org} es el peso de la fase acuosa y orgánica, C_0 y C_f la concentración de proteína en fase acuosa inicial y final; $\Delta G_{w \rightarrow o} = -RT \ln K$, el ΔH se calculó a partir de la tangente de la recta en coordenadas de Van't Hoff y cambio de ΔS a partir de ΔG y ΔH a temperatura de 25°C (2).

Resultados y discusión. Los resultados obtenidos se presentan en el cuadro 1. Los valores negativos de ΔG indican que el proceso es espontáneo y termodinámicamente favorable. Es un proceso

endotérmico ya que ΔH es positivo (ver las pendientes negativas en la Fig. 1) que se acompaña con una disminución en el grado de desorden ($\Delta S > 0$). El proceso se estimula con el aumento de temperatura y depende de la concentración de enzima en el sistema.

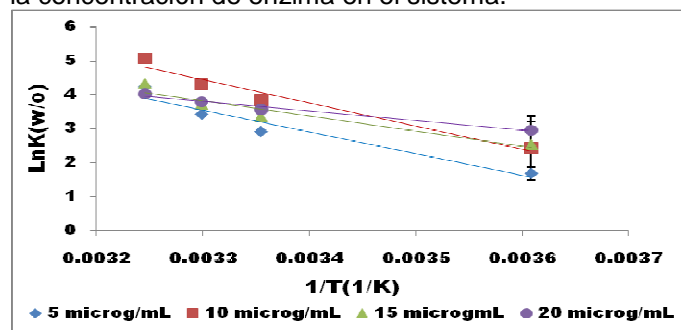


Fig. 1. Coeficientes de reparto en sistema agua/liposomas de lecitina de soya en presencia de diferentes concentraciones de laminarinasa presentadas en coordenadas de Van't Hoff.

Cuadro 1. Parámetros termodinámicos para el proceso de microencapsulación de la enzima laminarinasa

[Enzima] µg/mL	Temperatura (°K)	$K_{w \rightarrow o}$	ΔG , kJ/mol a 25°C	ΔH , kJ mol ⁻¹ a 25°C	ΔS , J mol ⁻¹ K ⁻¹ a 25°C
5	277.15	5.29	-45.19	51.77	325.22
	298.15	18.23			
	303.15	30.42			
	308.15	68.18			
	313.15	--			
10	277.15	11.19	-115.63	49.62	554.26
	298.15	46.65			
	303.15	--			
	308.15	74.3			
	313.15	159.32			
15	277.15	12.43	-69.86	37.39	359.53
	298.15	28.18			
	303.15	40.54			
	308.15	75.84			
	313.15	--			
20	277.15	19.12	-87.10	21.61	364.29
	298.15	35.14			
	303.15	44.50			
	308.15	--			
	313.15	55.87			

Conclusiones. Se demostró que la microencapsulación de la enzima 1,3 β-glucanasa en liposomas de fosfatidilcolina de soya es un proceso endotérmico termodinámicamente favorecido con la concentración de enzima de 0.01 mg/mL y aumento de la temperatura.

Agradecimiento. Al Proyecto SEP-CONACyT 57118.

Bibliografía.

- Medina, M., Cerezo, A., Sanchez, M. (1989) Estudio de la congelación como método de conservación de liposomas. *Pharmaklinic*. 3(3): 121-125.
- Avila, C., Fleming, M. (2003) Thermodynamics of Partitioning of Benzocaine in Some Organic Solvent/Buffer and Liposome Systems. *Chem. Pharm. Bull.* 51: 237-240.