

# Control de la Reacción de Polimerización del Glutaraldehído: Estrategia para la Obtención de Cristales Catalíticos Entrecruzados.

Alvaro J. Resines Sierra, Rafael Vázquez Duhalt, Eduardo Horjales Reboredo; Instituto de Biotecnología, UNAM, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos, 62210, México; Fax: +52 (777) 317 2388; aresines@ibt.unam.mx.

*Palabras clave: Biocatálisis, Cristales Catalíticos, Entrecruzamiento.*

**Introducción.** Los biocatalizadores en general y las enzimas en particular se han establecido ya como una alternativa viable para la catálisis industrial. Sin embargo, la estabilidad de estas proteínas sigue siendo uno de los principales inconvenientes para escalar la mayoría de los bioprocesos. El entrecruzamiento de cristales catalíticos es un proceso por el cual se forman puentes covalentes entre los grupos funcionales de las proteínas que forman el cristal. De esta forma se estabiliza la matriz cristalina y se incrementa la estabilidad estructural de las enzimas (1).

El glutaraldehído [OHC(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CHO] es probablemente el compuesto más ampliamente utilizado para el entrecruzamiento de proteínas. Este reactivo bifuncional puede formar en solución, polímeros de diferentes pesos moleculares y son estos polímeros los que reaccionan con los grupos amino expuestos de las proteínas para producir el entrecruzamiento (2).

El objetivo de este trabajo es la obtención de cristales catalíticos entrecruzados de dos hemoproteínas diferentes: la cloroperoxidasa y el citocromo C. Los diferentes rangos de estabilidad de estas enzimas (pH ácido y pH alcalino – neutro respectivamente) nos permitirán probar diferentes estrategias de entrecruzamiento. Estas involucran la síntesis de oligómeros de glutaraldehído en presencia de un agente limitador del peso molecular, la caracterización de los mismos y el posterior entrecruzamiento de los cristales catalíticos por medio de una segunda reacción de polimerización de estos compuestos. Esta estrategia se propone como un método eficiente y controlado para el entrecruzamiento de cristales proteicos que puede ser aplicada a una amplia gama de proteínas diferentes.

**Metodología.** Síntesis de Oligómeros: Se agregó glutaraldehído (Sigma, 50% Acuoso, Grado I) a una solución amortiguadora (Fosfato de Sodio, Research Organics, 50mM) del pH adecuado y con el contenido adecuado del agente limitador del peso molecular correspondiente. La mezcla reactiva se mantuvo a una temperatura de 2°C bajo agitación magnética. Las muestras se colectaron a diferentes tiempos, se acidularon y se utilizaron inmediatamente.

Caracterización de las Muestras: Se analizó la viscosidad, la composición química y la distribución de pesos moleculares de los oligómeros de glutaraldehído utilizando un Reómetro Controves Rheowat, un espectrómetro de masas de trampa de iones Finnigan LCQDUO y otras técnicas analíticas relevantes.

Entrecruzamiento de Cristales Catalíticos: Cristales de las Enzimas preparados previamente se lavaron con una

solución que contenía los elementos necesarios para su estabilidad y la cantidad adecuada del agente limitador del peso molecular correspondiente. Se agregó glutaraldehído a esta suspensión y se dejó reaccionar a 2°C y con agitación mecánica.

**Resultados y discusión.** Los estudios reométricos presentan un decremento en la viscosidad de las muestras de hasta un orden de magnitud, proporcional a la concentración de agente controlador del peso molecular. Esto demuestra que estos agentes reaccionan con los extremos crecientes de las cadenas de glutaraldehído, impidiendo así el avance de la reacción de polimerización. Los resultados de los análisis con el espectrómetro de masas muestran una alta abundancia relativa en picos de bajo peso molecular (<700Da), estos corresponden a oligómeros compuestos por 2 a 4 monómeros de glutaraldehído. Los cristales proteicos que se entrecruzaron controlando el peso molecular de los oligómeros de glutaraldehído mostraron un incremento de hasta dos ordenes de magnitud en la actividad residual de los cristales entrecruzados en comparación de los elaborados con la técnica tradicional.

**Conclusiones.** De los resultados de este trabajo se puede concluir que el entrecruzamiento de cristales catalíticos utilizando los productos de una reacción de polimerización controlada es una mejor estrategia que el uso de polimerizaciones de alto peso molecular o el uso de agentes entrecruzantes que no polimerizan. En particular se observó que el control del peso molecular puede mejorar hasta en 10 veces la actividad de los cristales catalíticos entrecruzados y reducir el tiempo de entrecruzamiento al permitir el uso de mayores concentraciones de reactivos. Esta estrategia de entrecruzamiento también permite llevar a cabo la síntesis de los oligómeros en condiciones de polimerización óptimas para después realizar el entrecruzamiento en las condiciones en las que se encuentra el cristal catalítico.

**Agradecimiento.** Queremos agradecer la valiosa cooperación de M.C. Ma. Soledad Córdova-Aguilar en la realización de las mediciones reométricas y del Dr. Cesar Ferreira Batista en la obtención de los espectros de masas.

## Bibliografía.

- 1.- Margolin, A.L., Navia, M.A., (2001), Protein Crystals as Novel Catalytic Materials, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40: 2204- 2222.
- 2.- Walt, D. R., Agayn, V. I., (1994), The Chemistry of Enzyme and Protein Immobilization With Glutaraldehyde, *Trends in Anal. Chem.*, 13 (10): 425-430.

