



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN

*“Biotransformación de ácido valproico por
citocromo P-450, CIP2B4 y CIP2C9
inmovilizadas sobre MCM-41.”*

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN FARMACOLOGÍA:

P R E S E N T A :

MARTHA CECILIA ROSALES HERNANDEZ



MÉXICO, D. F.

ENERO DEL 2004



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 12:00 horas del día 14 del mes de enero del 2004 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de La E.S.M. para examinar la tesis de grado titulada:

“Biotransformación de ácido valproico por citocromo P-450, CIP2B4 y CIP2C9 Inmovilizadas sobre MCM-41”

Presentada por el (la) alumno (a):

ROSALES HERNÁNDEZ MARTHA CECILIA

Con registro:

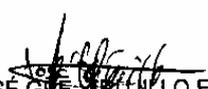
A0	2	0	1	6	7
----	---	---	---	---	---

aspirante al grado de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD, FARMACOLOGÍA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA


DR. JOSÉ GPE. TRUJILLO FERRARA
Presidente del Jurado


DRA. ELVIA MERA JIMÉNEZ
Secretario del Jurado


DRA. LUZ GARCÍA SERRANO
Directora de tesis (primer vocal)

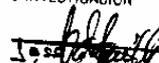

DR. CESAR FLORES SANDOVAL
segundo vocal

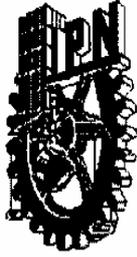

M. en C. JOSÉ IVÁN VÁZQUEZ ALCANTARA
Tercer vocal




M. en C. MIGUEL A. ORDORICA VARGAS
Vocal suplente

ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
I.P.N.
EL PRESIDENTE DEL COLEGIO
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN


DR. JOSÉ GPE. TRUJILLO FERRARA



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADO**

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día **25** del mes **Noviembre** del año 2003, el (la) que suscribe **MARTHA CECILIA ROSALES HERNÁNDEZ**, alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN FARMACOLOGÍA** con número de registro **A-020167** adscrito a la **ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA** manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de **DRA. LUZ GARCÍA SERRANO** y **DR. JOSÉ GPE. TRUJILLO FERRARA**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección marcrh2002@yahoo.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

MARTHA CECILIA ROSALES HERNÁNDEZ

AGRADECIMIENTOS:

A todos los profesores de la maestría en farmacología por haberme compartido sus conocimientos y brindado su apoyo.

Al Dr. Trujillo por darme la oportunidad de trabajar con él y proporcionarme su confianza para la realización de esta tesis.

A la Dra. Luz porque siempre me ha brindado su confianza y sobre todo porque ha creído en mí.

A todos los sinodales el M.C. Iván, Dra. Elvía, Dr. César y el M.C. Miguel ángel, quienes han colaborado en esta tesis.

A los integrantes del laboratorio de Cromatografía del IMP (Ing. Badillo, Marilú, Víctor, Paty, Carlitos, Raúl, Lucy, Armando) quienes además de colaborar en los análisis, me dieron la oportunidad de aprender y sentirme parte de su laboratorio.

A todos los que integran el Laboratorio de Bioquímica (Mario, Arturo, Jazmín, Benjamín, Mary Carmen, Raquel, Judith, Julián, Oscar y Dr. Juan Manuel) por haberme permitido formar parte de su grupo de investigación y saber que juntos hacemos un gran equipo. Al Sr. José Luis por su apoyo y amistad.

DEDICATORIAS:

A mis padres por todo el amor que me han dado, porque siempre he contado con su apoyo y confianza, gracias por enseñarme que las cosas se consiguen trabajando.

A mis hermanas Charo, Fabiola y Samantha porque han sido un pilar muy fuerte en mi vida personal y profesional, con todo mi cariño.

A toda mi familia por estar siempre conmigo, en especial a mi abuelita Graciela, a mis tíos Francisco, José y Margarita porque más que mi familia han sido mis grandes amigos.

A mis tíos Sara y Fernando por su aprecio y por disfrutar conmigo cada meta cumplida.

A José Correa por su apoyo y sobre todo por el enorme cariño que hemos compartido.

A Gisela por estar conmigo en los buenos y malos momentos y porque siempre nos una gran amistad.

A Jessica por la confianza, paciencia y cariño que compartimos, gracias por todo tu apoyo.

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Bioquímica de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional y en el laboratorio 211 del Instituto Mexicano del Petróleo bajo la asesoría de la D. en C. Luz García Serrano (IMP) y el D. en C. José Trujillo Ferrara (ESM).

CONTENIDO GENERAL

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICAS	III
ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	IX
ABSTRACT	X

INDICE.

1. INTRODUCCIÓN.	
1.1. Citocromo P-450.	1
1.1.1. Isoformas.	2
1.1.2. Sitio activo y ciclo catalítico.	3
1.1.3. Reacciones catalizadas.	6
1.2. Biotransformación del ácido valproico.	8
1.3. Inmovilización.	9
1.4. Materiales mesoporosos del tipo MCM-41.	11
1.4.1. Caracterización.	12
1.4.1.1. Difracción de rayos-X	12
1.4.1.2. Microscopía electrónica de transmisión	14
1.4.1.3. Análisis de texturas	15
1.4.1.4. Espectroscopia de infrarrojo	19
1.4.2. Uso de MCM 41 como soporte de enzimas.	20
1.5. Inmovilización de citocromo P-450	22
2. JUSTIFICACIÓN.	24
3. HIPÓTESIS	25
4. OBJETIVOS.	25
4.1. Objetivos específicos.	25
5. DISEÑO METODOLÓGICO	26
5.1. Inducción y obtención del citocromo P-450.	26

5.2. Síntesis del material mesoporoso del tipo MCM-41.	27
5.2.1. Caracterización del material MCM-41.	28
5.3. Inmovilización de las isoformas CIP2B4 y CIP2C9.	28
5.3.1. Determinación del contenido de proteína unida a MCM-41.	29
5.4. Evaluación de la actividad enzimática.	30
5.4.1. Biotransformación del ácido valproico.	30
5.4.2. Identificación de metabolitos.	31
6. RESULTADOS.	32
6.1. Cuantificación de proteínas totales y citocromo P-450.	32
6.2. Caracterización de MCM-41 con diferentes relaciones Si/Al.	35
6.3. Cantidad de enzima inmovilizada en MCM-41.	39
6.4. Caracterización del sistema CIP2B4-MCM-41.	43
6.5. Evaluación de la actividad.	46
6.5.1. Actividad del sistema CIP2C9-MCM-41.	49
6.5.2. Actividad del sistema CIP2B4-MCM-41.	52
6.5.3. Actividad de los microsomas.	54
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	56
8. CONCLUSIONES.	62
9. PROPUESTAS.	63
10. BIBLIOGRAFÍA.	64

INDÍCE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICAS

Figura 1.	Sitio activo del citocromo P-450.	4
Figura 2.	Ciclo catalítico de las enzimas del complejo multienzimático citocromo P-450.	5
Figura 3.	Mecanismo de transferencia de electrones de la citocromo P-450 reductasa o del citocromo b_5 al citocromo P-450.	6
Figura 4.	Reacciones de monooxigenación catalizadas por el citocromo P-450.	7
Figura 5.	Reacciones de oxidación catalizadas por el citocromo P-450.	7
Figura 6.	Reacciones de reducción catalizadas por el citocromo P-450.	8
Figura 7.	Mecanismo de formación de los metabolitos del ácido valproico.	9
Figura 8.	Representación del arreglo hexagonal de la MCM-41.	11
Figura 9.	Clasificación de las isothermas de adsorción de acuerdo a la IUPAC.	16
Figura 10.	Clasificación de las formas de histéresis	18
Figura 11.	Inmovilización enzimática en los poros de MCM-41.	21
Figura 12.	Pico característico del citocromo P-450, reducido y tratado con CO, en microsomas de hígado de rata.	35
Figura 13.	Patrón de difracción de rayos-X, de MCM-41 con y sin aluminio.	36
Figura 14.	Microscopía electrónica de transmisión de M-4.	37
Figura 15.	Patrón de difracción de rayos X de M-4, M-12, y M-4 con proceso de inmovilización.	43
Figura 16.	Isoterma de adsorción de N_2 de M-4 y M-12.	44
Figura 17.	Microscopía electrónica de transmisión de M-12 y CIP2B4 liofilizada.	45
Figura 18.	Cromatogramas de GC/FID del ácido ciclohexancarboxílico (estándar).	46

Figura 19.	Cromatograma de GC/FID del N,O,-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA).	47
Figura 20.	Cromatograma de GC/FID del ácido valproico.	47
Figura 21.	Cromatograma de GC/FID de una muestra con todos los componentes.	48
Figura 22.	Espectro de masas del ácido valproico silanizado.	48
Figura 23.	Espectro de masas del ácido 2- <i>n</i> -propil Δ^4 petenoico (Δ^4 -VPA).	50
Figura 24.	Espectro de masas del ácido 3-hidroxi-2-propil- Δ^4 -pentenoico (3-OH- Δ^4 -VPA).	51
Figura 25.	Fragmentos del ácido 3-hidroxi-2-propil- Δ^4 -pentenoico (3-OH- Δ^4 -VPA).	52
Figura 26.	Cromatograma de gases de las muestras de CIP2C9 y CIP2B4.	53
Figura 27.	Espectro de masas del ácido 4-hidroxi-2-propil pentanoico, un metabolito del ácido valproico	55
Figura 28.	Transporte de electrones a partir del NADPH al citocromo P-450 por MCM-41.	61

TABLAS

Tabla I.	Materiales mesoporosos del tipo MCM-41 sintetizados sin y con diferente relación Si/Al.	27
Tabla II.	Muestras de CIP2C9 y CIP2B4 inmovilizadas en MCM-41.	29
Tabla III.	Codificación de las muestras en base en los componentes empleados en la reacción.	31
Tabla IV.	Efectos de la administración de fenobarbital sobre el contenido de proteína microsomal y citocromo P-450.	32
Tabla V.	Características texturales de MCM-41 con diferente relación Si/Al.	38

Tabla VI.	Cantidad de enzima inmovilizada sobre MCM-41 con diferente relación Si/Al.	39
Tabla VII.	Porcentaje de CIP2C9 y CIP2B4 inmovilizadas en MCM-41.	42
Tabla VIII.	Porcentaje de aminoácidos con carga a pH 7.4 en CIP2B4 y CIP2C9.	42
Tabla IX.	Análisis texturales de las muestras M-4 y M-12.	44
Tabla X.	Actividad de CIP2C9 inmovilizada en MCM-41.	49
Tabla XI.	Actividad de CIP2B4 inmovilizada en MCM-41.	52
Tabla XII.	Actividad de citocromo P-450 de microsomas de hígado de rata.	54

GRÁFICAS.

Gráfica 1.	Espectro UV-Visible del citocromo P-450 de hígado de rata reducido con ditionita de sodio y CO.	1
Gráfica 2.	Patrón de difracción de rayos-X de MCM-50, MCM-48 y MCM-41.	13
Gráfica 3.	Isoterma de adsorción de la MCM-41 con poros de 4 nm a 77 K con N ₂ .	18
Gráfica 4.	Contenido de proteínas totales en microsomas de hígado de ratas tratadas con fenobarbital.	33
Gráfica 5.	Contenido de citocromo P-450 en microsomas de hígado de ratas tratadas con fenobarbital.	34
Gráfica 6.	Espectro de IR con piridina	38
Gráfica 7.	Contenido de CIP2C9 en MCM-41 con diferentes relaciones Si/Al.	40
Gráfica 8.	Contenido de CIP2B4 en MCM-41 con diferentes relaciones Si/Al.	41

ABREVIATURAS

CIP-450	Citocromo P-450
MCM-41	Mobil Composition of matter
CO	Monóxido de carbono
nm	Nanómetros
UV-Visible	Ultravioleta visible
RNA	Ácido desoxirribonucleico
UDP	Uridindifosfato
FMN	Flavinmononucleótido
FAD	Flavinadenindinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenindinucleótido fosfato reducido
Fe	Fierro
O₂	Oxígeno
NADP⁺	Nicotinamida adenindinucleótido fosfato oxidado
H₂O₂	Peroxido de hidrógeno
VPA	Ácido valproico
DRX	Difracción de rayos-X
MET	Microscopía electrónica de transmisión
θ	Ángulo de difracción
N₂	Nitrógeno
Ar	Argón
<i>p</i>	Presión de referencia
<i>p_o</i>	Presión del adsorbato
Si	Silicio
Al	Aluminio
Si/Al	Relación silicio/ aluminio
BJH	Barrett-Joyner-Halenda

KD	Kilodaltons
IR	Infrarrojo
CLAs	Colloidal liquid aphrons
GC/FID	Cromatografía de gases con detector de flama directa
GC/MS	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas
CTABr	Bromuro de cetiltrimetilamonio
BSTFA	Bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida
μA	MicroAmpers
eV	ElectroVolts
RM	Análisis de varianza bifactorial para medidas repetidas
m/z	Relación masa carga

RESUMEN

El estudio de la biotransformación de fármacos in vitro por las isoformas que constituyen el citocromo P-450 tienen gran importancia, debido a que en algunos casos dan origen a metabolitos tóxicos, o a metabolitos más activos. Para evaluar la biotransformación de xenobióticos in vitro se requiere obtener los microsomas, esto implica más tiempo y mayor costo que un sistema reusable, el cual puede obtenerse al fijar las enzimas en un soporte. Lo anterior permitiría conocer los metabolitos obtenidos reduciéndose los costos al evaluar distintos fármacos con el mismo sistema. Considerando lo anterior, en este trabajo se propuso valorar la transformación del ácido valproico por CIP2C9 y CIP2B4 inmovilizadas en MCM-41.

Mobil Composition of Matter (MCM-41) es un material mesoporoso, éste se sintetizó en condiciones hidrotérmicas con 4 diferentes relaciones Si/Al (0, 8, 10, 14), con el propósito de analizar si el aluminio influye en la cantidad o en la actividad de la enzima inmovilizada. Una vez sintetizado el MCM-41 se caracterizó por difracción de rayos X, análisis texturales y microscopía electrónica de transmisión, obteniéndose un diámetro de poro de 54.71\AA , un área específica de $1021.8183\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$, y un arreglo hexagonal de sus poros. La cantidad de CIP2C9 y CIP2B4 inmovilizadas fue alrededor de un 80% sin embargo, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre la cantidad de enzima inmovilizada en MCM-41 con las diferentes relaciones Si/Al.

La CIP2C9 y CIP2B4 libres, en ausencia de citocromo P-450 reductasa no mostraron actividad. En cambio CIP2C9 y CIP2B4 inmovilizadas si presentaron actividad en ausencia de citocromo P-450 reductasa, lo cual sugiere que el material MCM-41 podría participar en la transferencia de electrones del NADPH, hacia la enzima y cumplir la misma función de citocromo P-450 reductasa. CIP2B4 y CIP2C9 tuvieron mayor actividad inmovilizadas en MCM-41 con relación Si/Al=10, esto sugiere que la acidez de Bronsted puede contribuir, ya que fue el único material que la presentó.

ABSTRACT

The study of the biotransformation of drugs *in vitro* by the isoforms of cytochrome P-450 is of great importance because sometimes these produce toxic metabolites and other times metabolites that are more active. In order to evaluate the biotransformation of xenobiotics *in vitro* through cytochrome P-450 is necessary to obtain the microsomes which implies more time and a higher cost than if we have a reusable system. Such a system can be obtained by fixing the enzyme on a support. This would allow us to know the metabolites obtained and in that way to reduce the costs in evaluating the different drugs with the same system. Taking all this into account, the goal of this work is meant to evaluate the transformation of valproic acid by CYP2C9, CYP2B4 immobilized on MCM-41.

MCM-41 (Mobil Composition of Matter) is a mesoporous material whose surface can be modified by incorporating aluminum. Four different silicon/aluminum ratios (0, 8, 10, 14) were used to immobilize the enzyme all this in order to analyze their possible influence in the amount or activity of the immobilized enzyme.

MCM-41 was obtained through hydrothermal synthesis and was characterized by DRX, textural analysis and transmission electronic microscopy, which gave a pore's diameter of 54.71 Å, a specific area of 1021.8183 m²/g and hexagonal pattern of pores. The amount of immobilized CYP2C9 and CYP2B4 was about 80%, however no significant difference was observed between the amount of immobilized enzyme on MCM-41 with different Si/Al ratios.

The free CYP2C9 and CYP2B4 without CYP-450 reductase had no activity. However the immobilized CYP2C9 and CYP2B4 did have activity without cytochrome P-450 reductase. All these suggest that MCM-41 could take part in the transference of electrons of NADPH to the enzyme and in this way to carry out the same function as cytochrome P-450 reductase. CYP2B4 y CYP2C9 had a higher activity when immobilized on MCM-41 Si/Al =10 ratios, this suggests that Bronnsted's acidity may contribute because it was the one who had it.

INTRODUCCIÓN.

El citocromo P-450 (CIP-450) está constituido por una gran familia de hemo proteínas, entre las que se encuentran el CIP2B4 y el CIP2C9; éstas enzimas llevan a cabo la oxidación de una amplia variedad de compuestos^[1], a través de la siguiente reacción:



Tales enzimas también son capaces de llevar a cabo reacciones de isomerización y deshidrogenación entre otras^[2]. Para valorar la biotransformación de diversos fármacos como: el ácido valproico^[3-4], warfarina^[5] y fenitoína^[6], se han realizado estudios de biotransformación *in vitro* con microsomas libres, con el fin de identificar los metabolitos que se generan. Se encontró que el ácido valproico (antiepiléptico) al ser metabolizado por el citocromo P-450^[4] da origen al ácido 4-hidroxi 2-*n*-propil-pentanoico, 5-hidroxi 2-*n*-propil-pentanoico y el ácido 2-*n*-propil-pentenoico a este último metabolito se le han atribuido los efectos teratógenos^[7].

También se han realizado estudios de biotransformación *in vitro* con microsomas inmovilizados en sefarosa^[8] y en otros sistemas^[9-10], sin embargo cuando se inmoviliza el complejo multienzimático es difícil identificar que isoformas llevan a cabo la biotransformación del fármaco. Se han hecho estudios con isoformas puras como CIP71B1^[10] de planta y CIP105D1 de *Streptomyces griseus*^[11].

En 1966 Díaz reportó el uso de materiales mesoporosos como el Mobil Composition of Matter^[12] (MCM-41) para inmovilizar a la papaína, tripsina y citocromo c^[13] entre otras enzimas, que a pesar de estar inmovilizadas mantuvieron su actividad catalítica.

Actualmente el MCM-41 no ha sido empleado como soporte para enzimas del citocromo P-450, a pesar de que tiene un diámetro de poro y área específica, que permiten la inmovilización de tales enzimas.

Además, los materiales MCM-41 han sido atractivos para la inmovilización de enzimas, debido a que se puede modificar su diámetro de poro y su superficie mediante el uso de diferentes surfactantes y la incorporación de distintos metales^[14] por lo cual puede ser usado para fijar enzimas de diferente peso molecular.

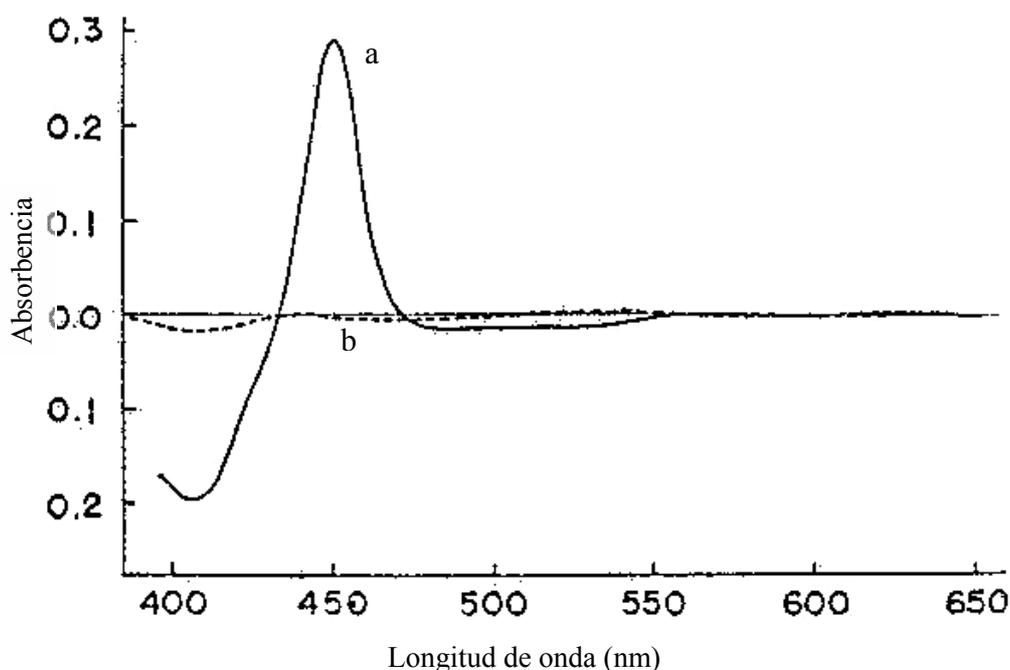
Las ventajas que se han reportado del uso de enzimas inmovilizadas son: se pueden separar del medio de reacción; se puede mejorar su estabilidad, así como, su actividad enzimática, además de que se pueden reciclar^[15].

En este trabajo se estudia la posible obtención de un sistema que nos permita evaluar *in vitro*, la capacidad catalítica de isoformas del citocromo P-450 como el CIP2C9 y CIP2B4 inmovilizadas sobre MCM-41 usando xenobióticos antes de administrarlos a un sistema biológico y poder predecir los metabolitos que se formarían en el animal íntegro. Además se sintetizó MCM-41 con diferente relación Si/Al con el propósito de modificar su superficie y analizar así, si el cambio en la superficie influye en la cantidad de enzima inmovilizada y en la actividad catalítica. Para evaluar la actividad catalítica se empleo el ácido valproico como sustrato, tanto para el CIP2C9 como para CIP2B4 inmovilizadas y en su forma libre.

1.1. CITOCROMO P-450.

Las primeras evidencias sobre las enzimas del citocromo P-450 fueron descubiertas en 1955 por Axelrod y Brodie^[16-17], quienes las aislaron y caracterizaron a partir del retículo endoplásmico liso de hígado de rata y demostraron que son capaces de oxidar diversos compuestos.

En 1957 mientras Martín Klingenberg^[18] estudiaba la reacción de reducción catalizada por citocromo b₅ en microsomas de hígado de rata, encontró otro pigmento capaz de enlazar monóxido de carbono (CO) y dar un pico en 450 nm (Gráfica 1), al cual en 1960, Omura y Sato^[19,20] le dieron el nombre de citocromo P-450.



Gráfica 1. Espectro UV-Visible del complejo formado por citocromo P-450 de hígado de rata reducido con ditionita de sodio y CO curva a y curva b sin CO.

1.1.1. ISOFORMAS DEL CITOCROMO P-450.

En 1966 los estudios realizados por Imai y Sato^[21] evidenciaron la presencia de más de una forma de citocromo P-450, al comparar las propiedades espectrales y funcionales del citocromo P-450 extraído de ratas testigo vs ratas tratadas con 3-metilclorantreno.

En 1968 por estudios espectrofotométricos se identificaron 7 isoformas del citocromo P-450 (CIP-450) de microsomas de hígado, entre las que se encuentran: CIP-450 (reducida)^[18], CIP-420 (desnaturalizada)^[20], la forma CIP-390 (con sustrato)^[22-26]; por lo que se concluyó que se trataba de un complejo multienzimático.

Entre 1970 y 1980 fueron aisladas varias isoformas^[27-30], en quienes se determinó la especificidad a su sustrato, las secuencias de sus aminoácidos y los genes que codifican estas proteínas.

La nomenclatura que se ha empleado para designar a las diferentes isoformas del citocromo P-450 consiste en usar las letras (CI) para indicar que pertenece al sistema de citocromos, la P para referir al pico característico para estas enzimas en el espectro visible a 450 nm, el primer número a la familia a la cual pertenece, la siguiente letra a la subfamilia y el último número a la forma individual de citocromo^[31], ejemplos de estas son la CIP2C9 y CIP2B4.

La subfamilia CIP2C esta integrada por 28 isoformas, 4 de ellas han sido encontradas en el humano CIP2C8, CIP2C9, CIP2C18 y CIP2C19. CIP2C9 es una de las subfamilias del citocromo P-450 que se encuentra principalmente en mamíferos^[32] existen reportes de enzimas CIP2C en perro, mono, ratón, y caballo^[33], esta isoforma biotransforma a la warfarina^[5], fenitoína^[6], ácido tienílico^[34] y ácido valproico^[3].

Se ha encontrado que en cultivos de hepatocitos humanos CIP2C8 se induce, cuando las células son tratadas con fenobarbital o rifampicina ya que hay un aumento en el ARNm, y no cuando se tratan con 3-metilclorantreno. Cuando se pretrataron ratas con fenobarbital, se incremento de 2 a 3 veces la cantidad de mRNA de CIP2C6^[35].

La subfamilia CIP2B esta asociada generalmente con la inducción por fenobarbital en roedores, en la rata la inducción con fenobarbital incrementa el ARNm que codifica para CIP2B1 y CIP2B2^[36-38]. Se debe tener presente que el fenobarbital también provoca el incremento de enzimas como la UDP- glucoroniltransferasa^[39], glutatión S-transferasa^[40] y aldehído deshidrogenasa^[41] entre otras.

Diversos miembros de la subfamilia CIP2B metabolizan una gran cantidad de xenobióticos, permitiendo en algunos casos la activación de protoxinas o procancerígenos^[42]. Entre los xenobioticos que dan origen a especies tóxicas se encuentran: el bromobenceno^[43], cocaína^[44-45], paratión^[46] y el ácido valproico^[2].

Hasta 1995 se habían identificado cerca de 220 isoenzimas del citocromo P-450, entre las que destacan por su participación en el metabolismo de xenobióticos la CIP1A, CIP2A, CIP2B, CIP2C, CIP2D, CIP2E y CIP3A^[31].

1.1.2. SITIO ACTIVO Y CICLO CATALÍTICO DEL CITOCROMO P-450.

Durante muchos años se tuvo gran interés en conocer la estructura del citocromo P-450, particularmente su sitio activo^[47-49], los estudios realizados con tal propósito, evidenciaron que el sitio activo está constituido principalmente por un grupo hemo (protoporfina IX y fierro), en donde el fierro forma dos enlaces, uno de ellos con un residuo de cisteína y otro con una molécula de agua (Figura 1).

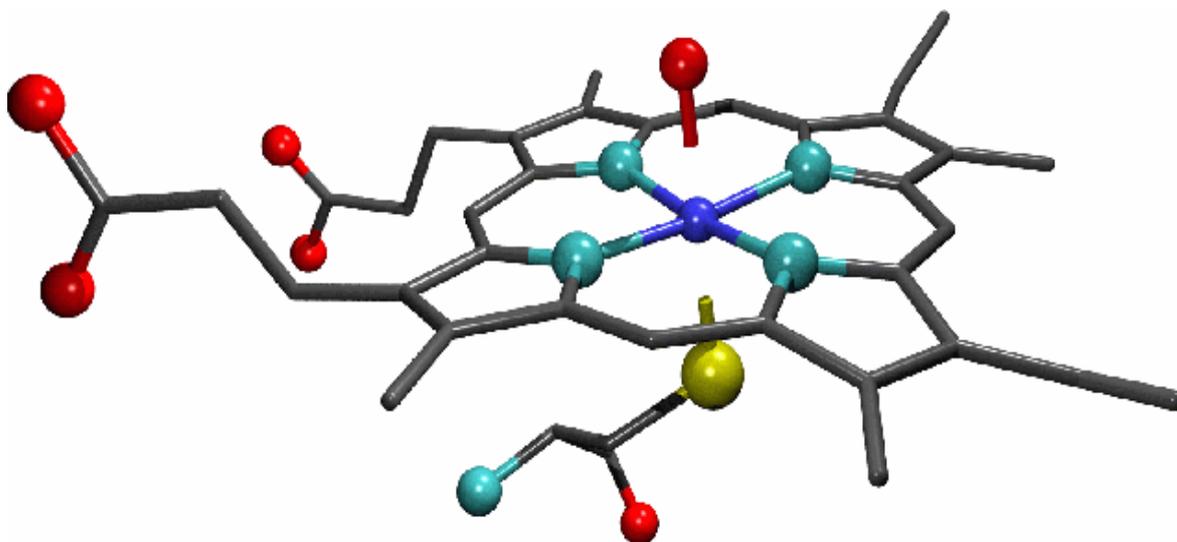


Figura 1. Sitio activo del citocromo P-450; hierro (azul), oxígeno (rojo) y azufre (amarillo)^[47-48].

Como se muestra en la figura 2, el ciclo catalítico de las enzimas del citocromo P-450 se inicia mediante la unión del sustrato al hierro del grupo hemo, provocando el desplazamiento de la molécula de agua y el cambio en el spin del hierro de un estado de bajo spin a uno de alto spin. Con ello el hierro pasa de un estado hexacoordinado a uno pentacoordinado^[48-50](1). El enlace del sustrato facilita la reducción del hierro del grupo prostético hemo al estado ferroso y origina un cambio conformacional de la enzima (2).

En la tercera etapa del ciclo catalítico, una vez que se ha reducido el hierro se enlaza oxígeno molecular dando origen a un complejo di-oxígeno ferroso $[\text{Fe}^{+3} - \text{O}_2^-]$ muy inestable^[51] (3), que sufre una rápida conversión a un compuesto estable, mediante la transferencia de un electrón (e^-). La segunda reducción origina el complejo $[\text{Fe}^{+3} - \text{O}_2^{-2}]$, el cual (5) reacciona con dos protones, rompiendo el enlace O-O generando agua y el complejo $[\text{Fe} - \text{O}]^{+3}$ ^[52].

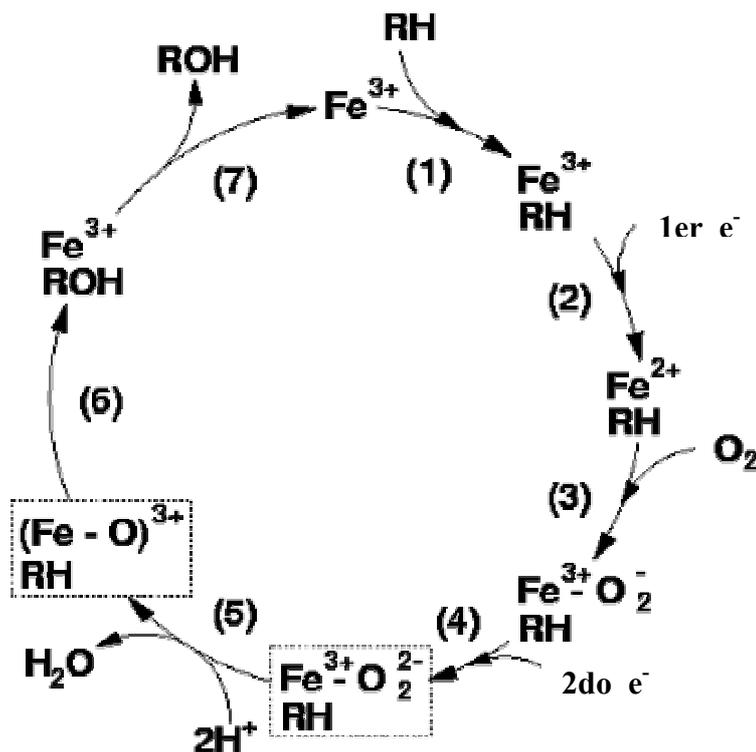


Figura 2. Ciclo catalítico de las enzimas del complejo multienzimático citocromo P-450^[53,54].

En la última etapa (6) el átomo de oxígeno se transfiere al sustrato dando origen al producto hidroxilado (7) que finalmente se libera del sitio activo de la enzima la cual regresa a su estado inicial.

Las reacciones de reducción que ocurren en el ciclo catalítico, se llevan a cabo mediante la transferencia de un electrón a partir del NADPH por la enzima citocromo P-450 reductasa, o del citocromo b_5 estas enzimas al igual que el citocromo P-450, también forman parte de la membrana y están constituidas por flavin mononucleotido (FMN) y por flavinadenin dinucleotido (FAD) ver Figura 3.

La transferencia del electrón a partir de la citocromo P-450 reductasa o del citocromo b₅, depende del sustrato o de la especie de citocromo P-450 involucrada, ya que hay algunas isoformas en las cuales se estimula su actividad cuando la transferencia es a través de citocromo b₅ y otras que son inhibidas [39,53].

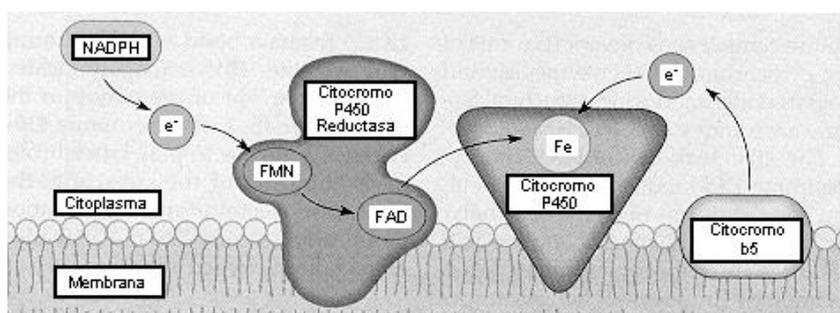


Figura 3. Mecanismo de transferencia de electrones de la citocromo P-450 reductasa o del citocromo b₅ al citocromo P-450 [54].

1.1.3. REACCIONES CATALIZADAS POR EL CITOCROMO P-450.

El sistema citocromo P-450 está involucrado en el metabolismo de varios endobióticos y xenobióticos [55-56], y posee por lo menos tres diferentes mecanismos de biotransformación [57]. El primero se conoce por su actividad como monooxigenasa, en esta reacción la enzima solo transfiere un átomo de oxígeno al sustrato. Estas reacciones incluyen: hidroxilación, epoxidación, desaminación, sulfoxidación, desulfuración y deshalogenación oxidativa (Figura 4), las cuales se llevan a cabo en presencia de NADPH y O₂.

La segunda forma de biotransformación del citocromo P-450 es la liberación de especies de oxígeno reducidas [57-59], en la cual se involucra la transferencia directa de un electrón a partir del citocromo P-450 (Figura 5) a la molécula de oxígeno con la formación de radicales anión superóxido (O₂⁻) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

La reacción general que se lleva a cabo es la siguiente:

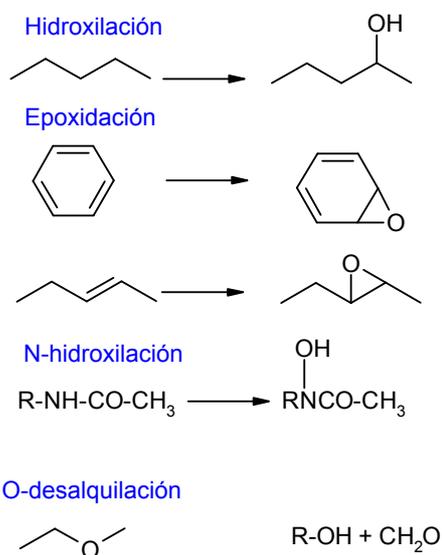
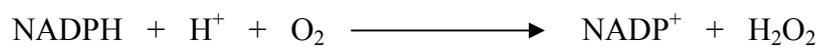


Figura 4. Reacciones de monooxigenación catalizadas por citocromo P-450.

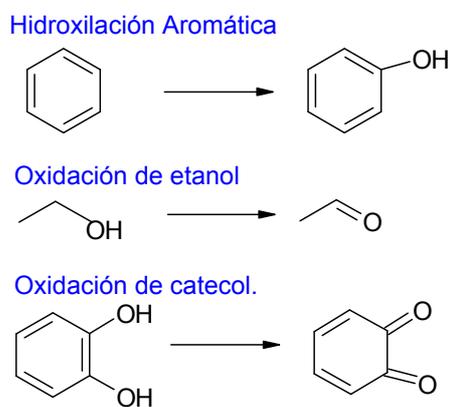
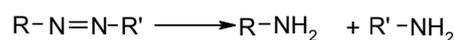


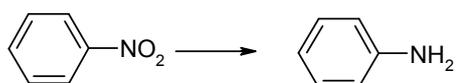
Figura 5. Reacciones de oxidación catalizadas por el citocromo P-450.

La tercera actividad del sistema citocromo P-450 se refiere a su actividad como reductasa y se lleva a cabo en condiciones anaerobias e involucra la transferencia directa de un electrón a sustratos que pueden ser reducidos tales como halogenuros de alcanos o quinonas^[60] ver figura 6.

Azo reducción



Nitro reducción



Deshalogenación reductiva

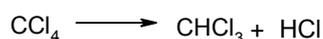


Figura 6. Reacciones de reducción catalizadas por el citocromo P-450.

1.2. BIOTRANSFORMACIÓN DE ÁCIDO VALPROICO.

Uno de los fármacos utilizados en la terapéutica antiepiléptica es el ácido 2-*n*-propil-pentanoico (ácido valproico, VPA), el cual al ser metabolizado por el citocromo P-450, particularmente por el CIP2C9 y CIP2B4 da origen a dos productos hidroxilados^[61] y a una olefina terminal^[62-63]. Se ha demostrado que en humanos las reacciones de hidroxilación y deshidrogenación se lleva a cabo principalmente por el CIP2C9 y el CIP2A6^[61].

El mecanismo por el cual el ácido valproico se biotransforma a ácido 4-hidroxi-2-*n*-propil pentanoico (4-OH-VPA), ácido 5-hidroxi-2-*n*-propil pentanoico (5-OH-VPA) o ácido 2-*n*-propil Δ^4 petenoico (Δ^4 -VPA)^[64], involucra la participación del complejo $[Fe^V=O]$ del ciclo catalítico del citocromo P-450, seguido de la formación de un radical libre en el sustrato

y del [Fe-OH] el cual puede transferir su hidroxilo al sustrato o sustraer un átomo de hidrógeno^[3-61] como se muestra en la siguiente figura:

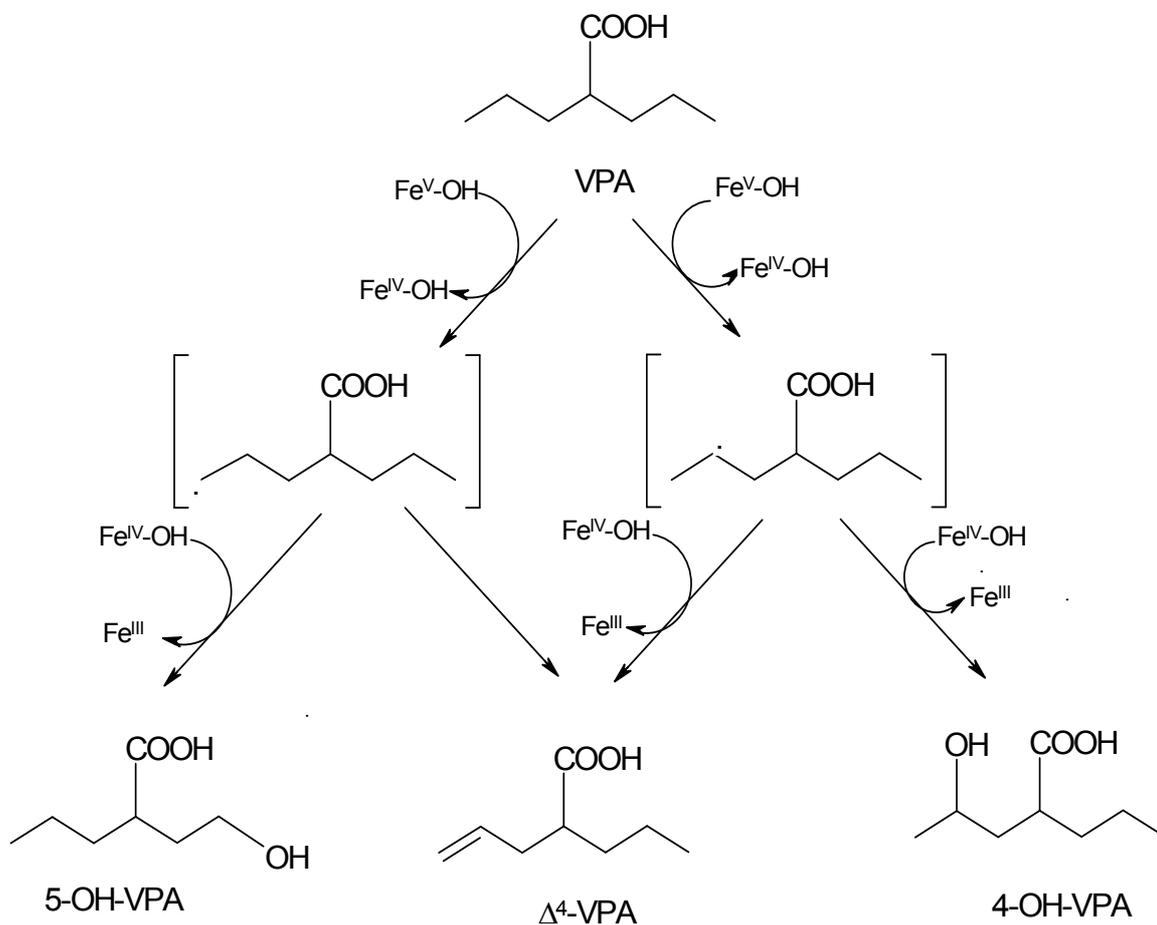


Figura 7. Mecanismo de formación de los metabolitos del ácido valproico^[3].

1.3. INMOVILIZACIÓN.

La inmovilización se ha definido como un proceso que permite fijar a la enzima en una región del espacio^[15], para dar lugar a sistemas insolubles, que mantengan su actividad catalítica y que pueden ser usados repetidamente, siendo ésta su principal ventaja.

Aunque también se tienen algunos inconvenientes con este proceso tales como: a) cambios en la conformación de la enzima con respecto a su estado nativo; b) debido a la gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte pueden existir distintas fracciones de proteína inmovilizada con diferente número de uniones al soporte; y c) se puede perder la actividad enzimática durante la inmovilización. Aunque en ocasiones se observa un incremento en la estabilidad de las enzimas después de su inmovilización, debido principalmente a una estabilización conformacional originada por la existencia de uniones multipuntuales enzima-soporte. La estructura terciaria de la enzima adquiere una mayor rigidez y se hace más resistente a la desactivación térmica o química.

La inmovilización puede llevarse a cabo por diversos métodos los cuales se han clasificado en dos categorías: retención física, entre los que se encuentra el atrapamiento e inclusión en membranas y unión química que tiene lugar cuando la enzima se enlaza a soportes mediante procesos de adsorción o formación de enlaces covalentes^[65]. La adsorción es uno de los métodos más sencillos en el cual la enzima se une al soporte sin funcionalizar mediante interacciones iónicas, fuerzas van der Waals y por puentes de hidrógeno. Los principales factores que influyen en la adsorción son: el pH del medio, la fuerza iónica y el diámetro de poro^[15].

Mediante éste método los aminoácidos de la enzima que podrían interaccionar con el soporte para la formación de enlaces son: la lisina, la cisteína, la tirosina y la histidina, y en menor medida la metionina, el triptófano, la arginina, el ácido aspártico y glutámico. Los otros aminoácidos, debido a sus grupos con carácter hidrófobo, no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica, por lo que no intervienen en la unión^[65].

Se ha utilizado una gran variedad, de materiales como soportes para la inmovilización de numerosas enzimas. Éstos materiales difieren en tamaño, densidad, porosidad y forma, aunque generalmente los hay en forma de cilindro, hojas, fibras y también en forma de

esferas. Debido a sus diferentes características los soportes se dividen en: Soportes orgánicos (como polímeros naturales y polímeros sintéticos). Soportes inorgánicos, dentro de este grupo hay una gran variedad de soportes que pueden ser naturales como la bentonita, piedra pómez, sílice etc. o materiales manufacturados^[15] (óxidos de metales y vidrio con tamaño de poro controlado, vidrio no poroso, alúmina, cerámicas, gel de sílice etc.) en este grupo se podría clasificar a las MCM-41.

1.4. MATERIAL MESOPOROSO DEL TIPO MCM-41.

De acuerdo a la definición de la IUPAC los materiales porosos se han dividido en tres clases: microporosos (< 2 nm), mesoporosos (2-50 nm) y macroporosos (>50 nm). Las zeolitas son materiales microporosos que han mostrado tener excelentes propiedades catalíticas. Sin embargo, su aplicación es limitada debido al tamaño de poro^[14], por lo cual se han sintetizado materiales con tamaños de poro más grandes entre los que se encuentra MCM-41.

Este material pertenece a la familia M41S integrada por MCM-41, MCM-48 y MCM-50. La MCM-41 fue el primer sólido mesoporoso sintetizado en 1992 por miembros de la compañía Mobil^[12]. Quienes demostraron que tiene un arreglo hexagonal ordenado como se muestra en la figura 8. Y debido a que se puede modificar el diámetro de poro y la acidez se ha puesto gran interés en la caracterización, en el mecanismo de formación y en la síntesis de nuevos materiales mesoporosos del tipo MCM-41.

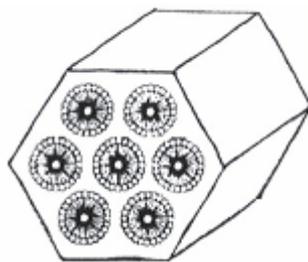


Figura 8. Representación del arreglo hexagonal de la MCM-41.

1.4.1. CARACTERIZACIÓN DE LA MCM-41.

Para la caracterización de la MCM-41 se han empleado técnicas como a) difracción de rayos-X (DRX), b) microscopía electrónica de transmisión (MET) c) análisis de texturas y espectroscopia de IR^[66].

1.4.1.1. Difracción de rayos-X (DRX).

Es la primera técnica que se aplica tras la síntesis de un material mesoporoso, pues es indicativa de la presencia o no de mesoporo. La definición de la técnica “Difracción de rayos X sobre polvo cristalino” excluiría su aplicación en materiales mesoporosos dada la naturaleza amorfa a escala atómica que estos presentan, ahora bien, la regularidad que a mayor escala ofrecen los poros hace que sea posible la obtención de difractogramas muy característicos. Estos difractogramas son fruto de la periodicidad de los poros y por tanto permiten identificar simetrías e incluso asignar índices de Miller (hkl), llegando a ser posible dilucidar estructuras formadas por sistemas de canales o cavidades de tamaño considerable, a escala de mesoporo.

El proceso de difracción puede visualizarse como una refracción debida a los planos cristalográficos (hkl) separados por una distancia d_{hkl} . El haz difractado corresponde a una reflexión para un ángulo θ particular entre el haz incidente y el plano cristalográfico para el cual se tendrá:

$$n\lambda = 2 d_{hkl} \sin \theta$$

Donde λ es la longitud de onda, n el orden del haz difractado, θ el ángulo de difracción y d_{hkl} la distribución interplanar. Esta expresión se conoce como la ley de Bragg.

Bragg al estudiar la reflexión de los rayos X^[66] sobre la cara exfoliada de halita (ClNa) comprobó que:

1) La reflexión de los rayos X tenía lugar al incidir sobre sólidos cristalinos, esto es, a un ángulo de incidencia θ correspondía otro ángulo de reflexión θ .

2) A diferencia con el fenómeno de la reflexión de la luz, los rayos X se reflejaban sólo en una mínima proporción.

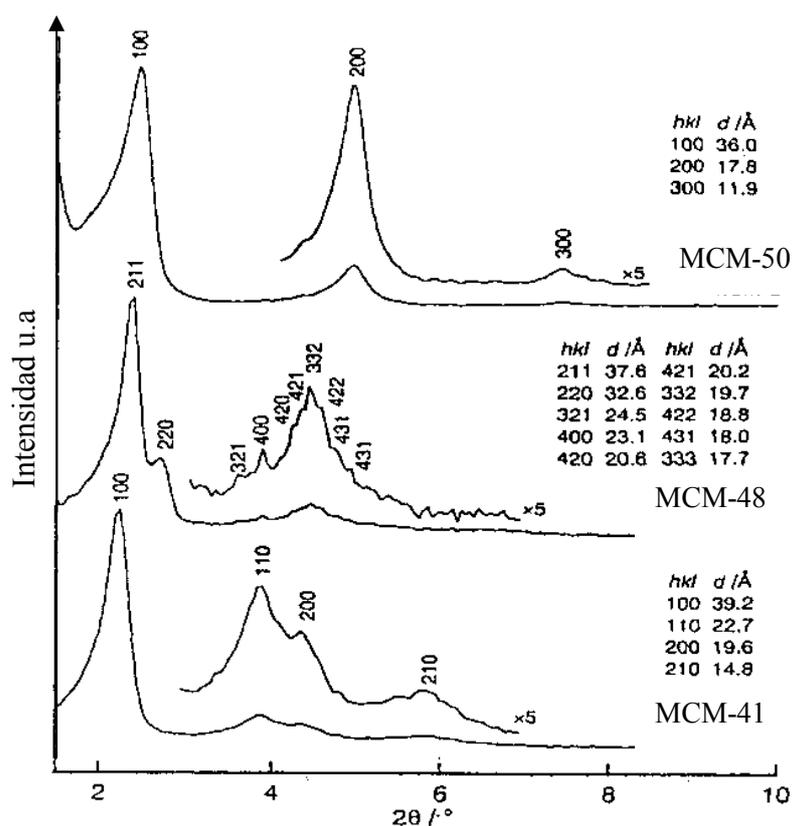
3) La reflexión tenía lugar únicamente a valores discretos de θ que dependían de:

La λ de los rayos X utilizados.

Del tipo de cristal empleado.

De la orientación cristalográfica del cristal.

El patrón de difracción de la MCM-41 muestra de tres a cinco difracciones desde 2° hasta 5° en una escala 2θ . Las difracciones se han atribuido al arreglo hexagonal de los tubos y están en los planos (100), (110), (200), (210) y (300), tal y como se muestra en la siguiente gráfica^[68].



Gráfica 2. Patrón de difracción de rayos X de MCM-50, MCM-48 y MCM-41

En la gráfica anterior se muestra la intensidad de muestras de MCM en relación con el ángulo de difracción 2θ , la intensidad de un haz de rayos X se refiere al número de fotones por unidad de superficie y por unidad de tiempo.

1.4.1.2. Microscopía electrónica de transmisión (MET).

Una de las grandes ventajas de la microscopía electrónica de transmisión es que permite obtener imágenes que contienen información del espacio real, al mismo tiempo que se recoge información del espacio recíproco en la misma región por medio de la difracción de electrones.

Esta técnica de caracterización debe su nombre a la utilización de electrones como elemento de interacción con la materia, los electrones transmitidos son los que dan origen a la imagen local del material^[69]. Debido a que el elemento interactivo que el MET utiliza, es el electrón, se puede cambiar su energía cinética y con ello la longitud de onda del electrón, con esto se puede variar la resolución del microscopio.

Otra ventaja de la microscopía electrónica es que ofrece información suficiente incluso de pequeñas regiones o cristales de escaso tamaño, permitiendo su tratamiento como si se tratara de un monocristal, puesto que la interacción entre el haz de electrones y la materia es extremadamente fuerte alrededor de 10^4 veces más que la que se produce con los rayos X.

La posibilidad de aplicar microscopía electrónica de transmisión en la caracterización de materiales porosos ordenados soluciona la identificación de la estructura mayoritaria y la resolución estructural de fases, puesto que se obtiene información a nivel molecular exclusivamente de las regiones que presentan buena estructuración por pequeñas que sean.

1.4.1.3. Análisis de Textura.

Para determinar el área específica se emplea el análisis de texturas. Este se basa en el fenómeno de adsorción desarrollado por Langmuir^[70] quien considero que la superficie del adsorbente (sólido) contiene un número fijo de lugares de adsorción y cada lugar puede adsorber una sola molécula de adsorbato (gas o vapor), sin que exista interacción con las moléculas adsorbidas.

Para determinar el área específica de los materiales mesoporosos MCM-41, se expone el área geométrica externa e interna a un gas como N₂, O₂ y Ar y mediante la isoterma de adsorción de Langmuir, se determina la cantidad de gas necesaria para cubrir con una monocapa adsorbida la superficie del sólido^[71-72].

La relación existente a una temperatura dada, entre la cantidad de gas adsorbido en el equilibrio y la presión del mismo, es lo que se conoce como isoterma de adsorción, éstas se obtiene al graficar el volumen adsorbido vs la relación entre la presión de referencia y la presión del adsorbato (p/p_o). La mayoría de las isotermas que podemos encontrar en la literatura caen dentro de cinco tipos denominados I a V o del tipo VI ver figura 9, la VI es muy rara, aunque en algunas ocasiones se presenta.

La isoterma de tipo I se identifica por una brupta subida inicial a presión relativa baja seguida por un plateau que se extiende hasta presiones relativas elevadas. Durante muchos años esta isoterma se interpretó de acuerdo a la teoría de Langmuir de adsorción de monocapa, pero actualmente se acepta que el proceso de adsorción es el llenado del volumen de los microporos mas que el recubrimiento de la superficie de las paredes del poro.

La isoterma de tipo II se obtienen con sólidos no porosos o macroporoso y representan la adsorción monocapa-multicapa no restringida del adsorativo sobre el adsorbente. Una aguda rodilla a valores bajos de presión relativa indica un calor de adsorción relativamente alto y las moléculas se adsorben en una capa de una molécula de espesor hasta que se cubre una gran porción de la superficie antes de empezarla adsorción en multicapa.

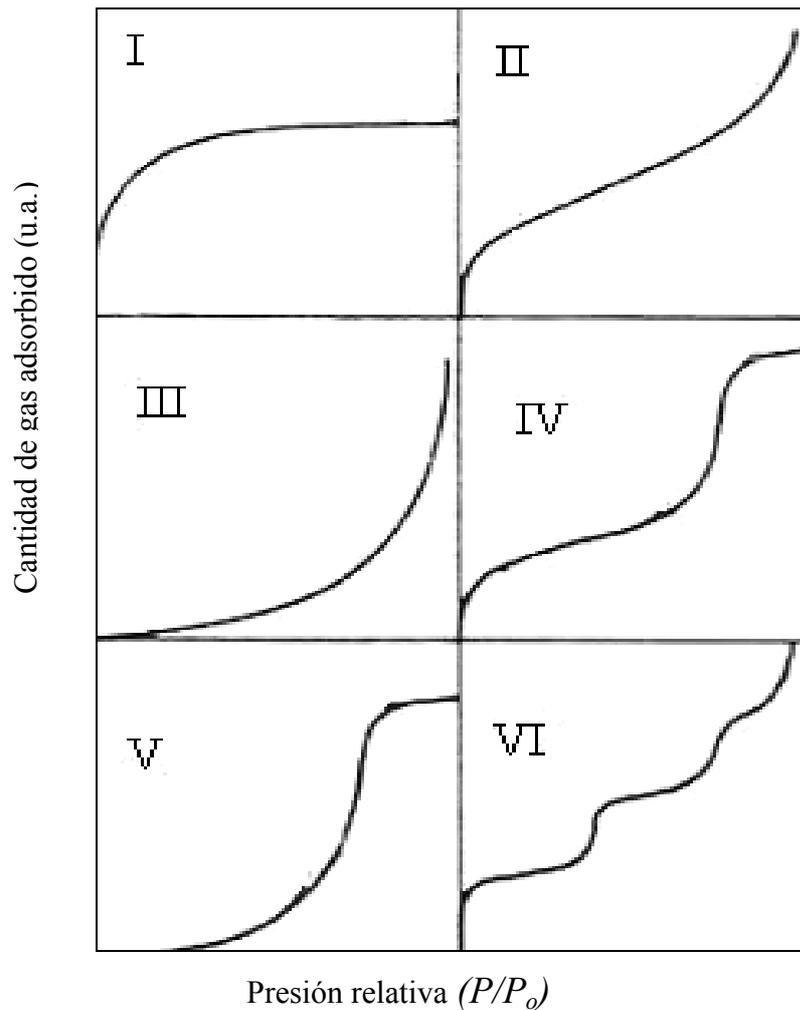


Figura 9. Clasificación de las isothermas de adsorción de acuerdo a la IUPAC.

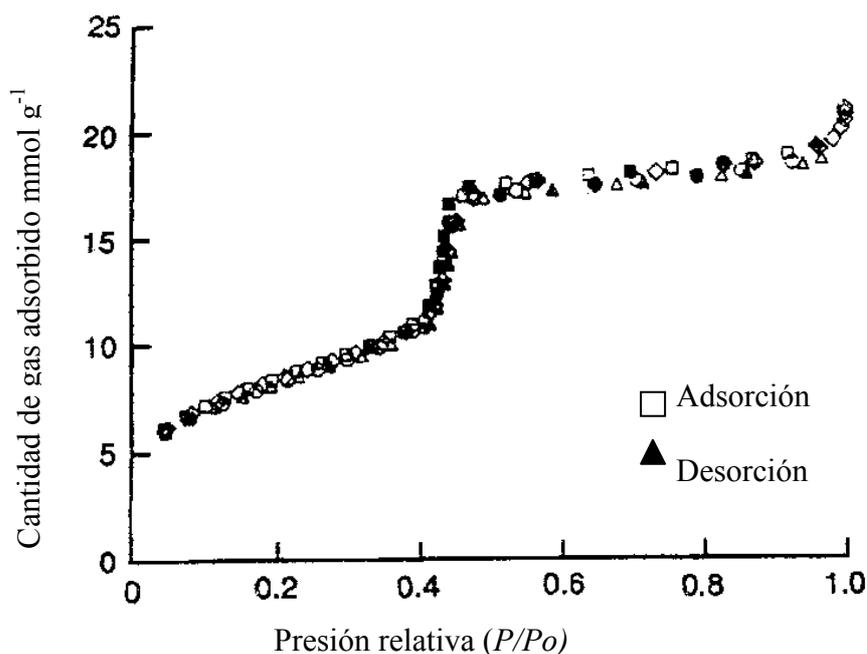
La isoterma tipo III es característica de interacciones débiles gas sólido. La debilidad de las interacciones hace que la adsorción a bajas presiones relativas sea baja, sin embargo, una vez que una molécula se haya adsorbido las fuerzas adsorbato-adsorbato promoverán la adsorción de otras moléculas. Un ejemplo de este tipo de adsorción es la interacción de agua sobre carbón.

Si los adsorbentes son mesoporosos la isoterma presenta un bucle de histéresis. Así las isotermas tipo IV y V son características de adsorbente mesoporosos, donde el bucle de histéresis esta asociado con la condensación capilar que ocurre en los mesoporos. Estos poros se llenan completamente a presiones relativas elevadas como se caracteriza por el plateau en las isotermas.

La isoterma de tipo VI representa una adsorción escalonada en multicapa del adsorbato. El primer escalón representa la formación de la primera capa adsorbida, y así sucesivamente para los demás escalones que se presentan.

De acuerdo a la clasificación de las isotermas, el material mesoporoso MCM-41 con poros alrededor de 4 nm presenta una isoterma de adsorción de tipo IV cuando se emplea como adsorbato nitrógeno.

La isoterma de adsorción de la MCM-41 muestra dos características principales, la primera una condensación capilar a una presión relativa de 0.4 y la segunda no presenta histéresis entre la adsorción y desorción^[71], como se muestra en la gráfica 3.



Gráfica 3. Isotherma de adsorción de MCM-41 con poros de 4 nm a 77 K con N_2 [71].

El desfaseamiento entre la curva de adsorción y desorción del gas es lo que se conoce como histéresis, estas se han clasificado en cuatro tipos los cuales se ilustran en la Figura 10. La adsorción a baja presión relativa en los materiales MCM-41, se debe a la adsorción monolaminar de N_2 sobre las paredes del mesoporo y no a la presencia de microporos. Sin embargo, en el caso de materiales con poros mayores de 4 nm o usando O_2 o Argón como adsorbato la isoterma sigue siendo de tipo IV pero presenta histéresis de tipo H1. La presencia y tamaño de la histéresis depende del adsorbato, del tamaño de poro y de la temperatura [71].

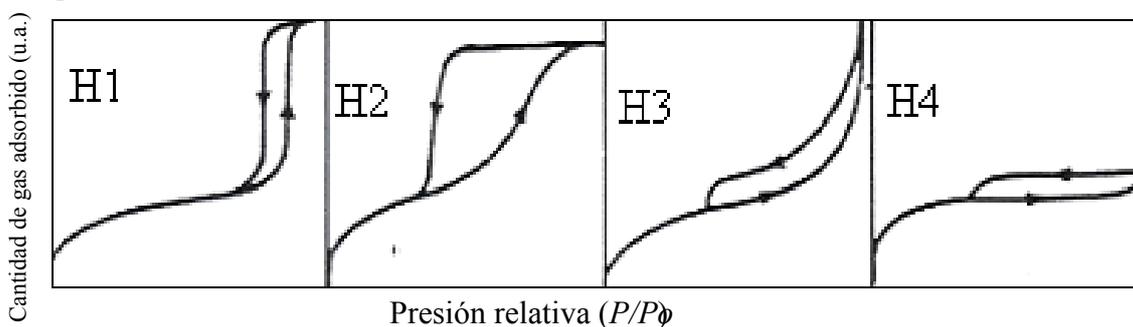
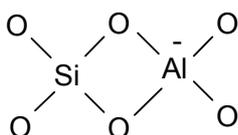


Figura 10. Clasificación de las formas de histéresis.

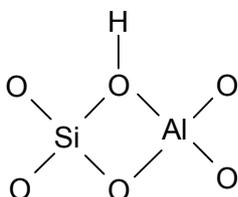
El método tradicional para analizar la distribución de diámetro de poros en el rango de mesoporos es el Barrett-Joyner-Halenda (BJH)^[73], basado en un modelo de poros cilíndricos y es esencialmente una aproximación a una ecuación integral. La distribución de diámetro de poro se obtiene de los datos de la desorción del adsorbato, ya que una vez que la isoterma de adsorción termina se puede desadsorber el gas y con esto obtener la curva de desorción^[73].

1.4.1.4. Espectroscopia de Infrarrojo (IR).

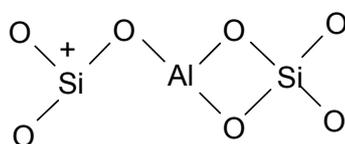
La acidez es una de las características superficiales de MCM-41. Los sitios ácidos de Bronsted en los sólidos pueden ser generados cuando un catión trivalente (aluminio) está presente en coordinación tetraédrica con el oxígeno, como se muestra a continuación:



Cuando el exceso de cargas negativas son compensadas por protones se forman los grupos silanol^[66,74]:

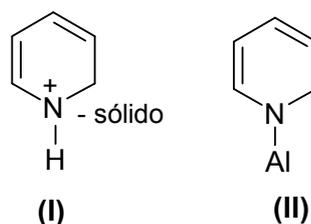


Los sitios ácidos de Lewis pueden aceptar electrones ya que el silicio tiene una carga positiva, como se esquematiza a continuación:



Para determinar la acidez se emplea la espectroscopia de infrarrojo con piridina^[75]. La piridina puede distinguir entre los sitios ácidos de Bronsted (I) y Lewis (II) en el material

ya que se originan las siguientes especies cuando reacciona con el sólido:



Estas estructuras tienen distintos modos vibracionales y son fácilmente identificados por IR. Cuando se realizan estudios de IR con piridina en muestras de MCM-41 las bandas a 3745, 3715 y 3530 identificadas por IR disminuyen y aparecen las bandas 1625, 1600, 1546, 1493, 1455, y 1449. La banda en 1600 se debe a enlaces de hidrógeno entre la piridina a grupos SiOH y la banda en 1449 indica la presencia de sitios ácidos de Lewis^[74-75].

1.4.2. USO DE MCM-41 COMO SOPORTE DE ENZIMAS.

Debido a que los materiales mesoporosos del tipo MCM-41 poseen una estructura hexagonal ordenada, su diámetro de poro puede variar entre 2-10 nm, además puede tener un área específica alrededor de 1500 m²g⁻¹ y un volumen de poro de 1.3 ml g⁻¹ aproximadamente^[12], han sido usados como soportes para pequeñas enzimas globulares^[76] tales como el citocromo c^[77](P.M. =12KD). Estas características sugieren que el MCM-41 sirve para la inmovilización de proteínas, ya que hay enzimas que tienen diámetros de poro similares a los de este material y por lo tanto podrían entrar en él y quedar ancladas^[76] como se muestra en la Figura 11. Las enzimas pueden ser inmovilizadas en los poros por simple inmersión del material mesoporoso en la suspensión de la enzima^[2].

En 1998, se reportó^[78] la ruta para sintetizar tamices moleculares mesoporosos con tamaños de poro mayores a 30 nm para MCM-41. Haciendo más atractivo el uso de estos materiales para la inmovilización de proteínas.

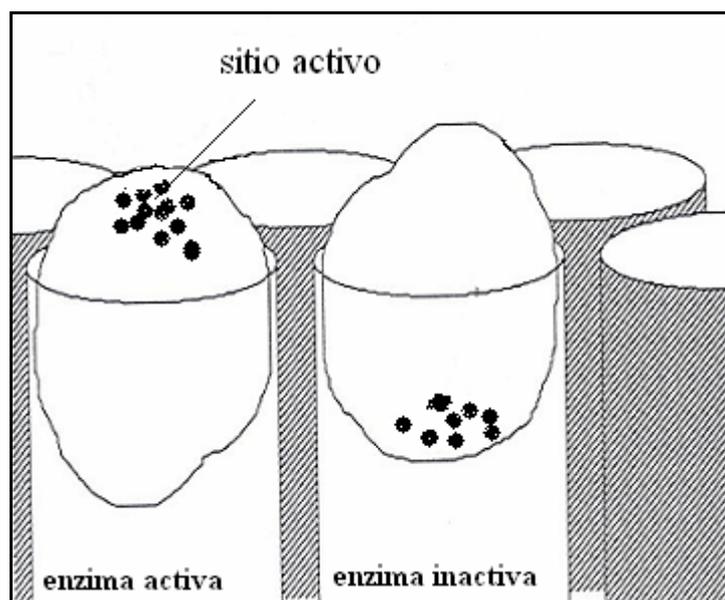


Figura 11. Inmovilización enzimática en los poros de MCM-41^[13].

Además, la MCM-41 posee grupos hidroxilo los cuales se han caracterizado por espectroscopia de infrarrojo (IR) y clasificado en tres grupos^[79-81], los que se encuentran aislados (3745cm^{-1}), en el interior (3715cm^{-1}), y formando enlaces de hidrógeno (3530cm^{-1}); entre éstos los de mayor interés son los aislados, ya que éstos se encuentran libres en la superficie y con ellos podría interaccionar la enzima. Se ha observado que en los materiales MCM-41 la incorporación de aluminio hace que la banda de absorción por IR en 3745cm^{-1} sea más intensa, lo que indica que aumentan los grupos hidroxilo en la superficie^[72,81]; es por esto que se ha tratado de incrementar la cantidad de aluminio en la estructura de éstos materiales para modificar su superficie y para que en la inmovilización de enzimas haya una mayor interacción entre el soporte y ésta. Sin embargo, la relación silicio/aluminio mínima que no destruye la red por síntesis hidrotérmica es mayor de 5.

1.5. INMOVILIZACIÓN DEL CITOCROMO P-450.

El citocromo P-450 es de gran importancia en el metabolismo de una gran variedad de compuestos tanto exógenos como endógenos. Las reacciones que ocurren durante el metabolismo se han clasificado en dos tipos: a) Fase I y b) Fase II. Las enzimas del citocromo P-450 participan en las reacciones de fase I, también llamadas de funcionalización, modificando el fármaco mediante la adición o eliminación de un grupo funcional, de esta forma los xenobióticos son transformados en metabolitos más polares que facilitan su eliminación del organismo, o pueden originarse sustancias metabolitamente activas.

Dada la gran importancia de las enzimas del citocromo P-450 en 1980 se llevo a cabo la inmovilización del citocromo P-450 (microsomos), citocromo P-450 reductasa y glucoroniltransferasa sobre Sefarosa activada^[8], para estudiar simultáneamente el metabolismo de fármacos en la fase I y II. La inmovilización se llevo a cabo agitando la enzima con la Sefarosa durante 12 h, después se realizó un lavado y se dejo nuevamente 12 h. La actividad de N y O demetilasa se incremento cerca de un 40% y 49% respectivamente. En este sistema no se tuvo actividad sin NADPH, un fosfolipido y en ausencia de la citocoromo P-450 reductasa.

En 1993 se inmovilizaron los microsomos obtenidos de hígado de ratas pretratadas con fenobarbital en membranas Romicon PM. 10^[9], en este estudio se comparó la actividad de la preparación microsomal libre e inmovilizada, reteniendose tan solo el 20 a 25 % de la actividad en la forma inmovilizada, la actividad fue evaluada mediante la conversión de 7-etoxicumarina a 7-hidroxycumarina.

De las isoformas del citocromo P-450 que han sido inmovilizadas se encuentra CIP71B1 de planta, ésta se ha inmovilizado junto con la citocromo P-450 reductasa empleando una técnica coloidal (CLAs)^[10], en donde posterior a la inmovilización la eficiencia fue mayor

del 85% y la actividad fue 10 veces mayor que la enzima libre. También se ha llevado a cabo la inmovilización de microsomas de hígado de rata por encapsulación en membranas, el resultado muestra que los sustratos pueden ser metabolizados por los microsomas libres o inmovilizados.

Otra de las isoformas de citocromo P-450 que se han inmovilizado es CIP105D1 a partir de *Streptomyces griseus* expresada en *Escherichia coli* utilizando DE52 y un sistema regenerador de NADPH^[11].

2. JUSTIFICACIÓN.

El CIP-450 biotransforma una gran diversidad de compuestos mediante reacciones de hidroxilación, deshidrogenación, isomerización, etc; lo cual lo hace atractivo para ser empleado en procesos biotecnológicos, así como para su uso en síntesis orgánica, ya que posee una regioselectividad y estereoselectividad alta. Sin embargo, su uso *in vitro* en forma libre tiene ciertas desventajas entre las que destacan: 1) el método de obtención de microsomas y purificación de isoformas toma mucho tiempo por ser un proceso laborioso, 2) se requiere de animales integros, 3) se necesita de un proceso de inducción para obtener una cantidad mayor de citocromo P-450. Todo esto puede evitarse si se logra mantener activa a cada una de las principales isoformas del citocromo P-450, inmovilizadas en un material mesoporoso, cuyo objetivo sería determinar que sustrato se transforma y que isoforma participa.

La biotransformación del ácido valproico, ha sido ampliamente estudiada a tal grado que se han identificado las isoformas del citocromo P-450 que participan en el mecanismo catalítico, así como los metabolitos que genera y sus efectos, estos estudios se realizaron con las isoformas libres y después de cada ensayo tuvieron que ser eliminadas, a pesar de esto, se tiene información valiosa para poder evaluar si las isoformas inmovilizadas mantienen su actividad.

Aunque se han inmovilizado microsomas, para evaluar la biotransformación de fármacos *in vitro* no es posible identificar las isoformas que realizan la biotransformación, además de que se han empleado como soportes resinas de intercambio iónico, las cuales tienen que ser activadas antes de su uso y el tiempo de inmovilización es largo en comparación con la inmovilización en MCM-41.

MCM-41 es conveniente para la inmovilización de enzimas o sistemas enzimáticos como el citocromo P-450, debido a que el diámetro de poro puede adecuarse, dependiendo del tamaño de la enzima, además la síntesis de MCM-41 es sencilla y de bajo costo.

3. HIPÓTESIS.

Si diversas enzimas como la papaína, el citocromo c, y la tripsina, inmovilizadas en MCM-41 han mantenido su actividad catalítica, es posible que el CIP2C9 y el CIP2B4 inmovilizados en MCM-41 biotransformen sustratos como el ácido valproico.

4. OBJETIVO GENERAL.

Determinar si el CIP2C9 y el CIP2B4 mantienen, su actividad catalítica una vez que han sido inmovilizadas sobre la MCM-41 con y sin aluminio, con respecto al citocromo P-450 presente en los microsomas.

4.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

1. Obtener los microsomas a partir de hígado de rata, pretratadas con fenobarbital a fin de inducir el citocromo P-450.
2. Sintetizar la MCM-41 con diferente relación Si/Al para modificar su superficie iónica.
3. Caracterizar la MCM-41 por difracción de rayos X, análisis de texturas, microscopía electrónica de transmisión y espectroscopia de IR con piridina.
4. Inmovilizar las isoformas CIP2C9 y CIP2B4.
5. Llevar a cabo la reacción de biotransformación del ácido valproico en los microsomas y con las isoformas puras antes y después de la inmovilización.
6. Cuantificar la cantidad de ácido valproico convertido empleando cromatografía de gases con detector de flama directa (GC/FID).
7. Identificar los metabolitos obtenidos por cromatografía de gases acoplado a masas (GC/MS).

5. DISEÑO METODOLÓGICO.

5.1. INDUCCIÓN Y OBTENCION DE CITOCORMO P-450.

Administración de fenobarbital. Se emplearon 2 grupos de 11 ratas de la cepa Wistar con un peso de 220-250 g. Al primer grupo se le administró fenobarbital a una dosis de 80 mg/kg por vía intraperitoneal durante 4 días^[82], el fenobarbital se adquirió de la casa sigma, el segundo grupo fue empleado como testigo al cual se le administró solución fisiológica.

Extracción y disección del hígado. Al quinto día de tratamiento las ratas se sacrificaron y mediante exposición de la cavidad torácico-abdominal, el hígado se perfundió *in situ*, por la vena cava inferior con 100 ml de solución fisiológica fría.

Obtención de los microsomas. Se extrajo el hígado, se mantuvo en hielo seco y se homogeneizó con 20 ml de sacarosa 0.25 M usando un homogenizador Dispergierstation T 8.10 (5 min, velocidad 4). A partir de éste homegeizado la fracción microsomal se obtuvo por una modificación del método de Manno^[82-83]. El homogeneizado se centrifugó a 10 000 g por 16 min a 4 °C utilizando una centrifuga Eppendorf 5804R. Al sobrenadante se le adicionó cloruro de calcio hasta alcanzar una concentración final de 8 mM, se agitó y se centrifugó a 20 000 g por 28 min a 4 °C. El sobrenadante se descartó y los microsomas contenidos en el precipitado se resuspendieron en 15 ml de una solución de KCl 0.15 M, se agitó y centrifugó nuevamente a 20 000 g por 28 min a 4 °C.

Finalmente, los microsomas se resuspendieron en buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.4 con 20% de glicerol y se almacenaron a -70 °C.

Determinación del contenido de proteína. Se realizó empleando el método de Lowry^[84], utilizando una curva estándar de albúmina de suero bovino.

Determinación y cuantificación del citocromo P-450. Una vez obtenidos los microsomas se determinó el contenido de citocromo P-450 a través del método de Omura y Sato^[19]. Se diluyó 1 ml de la solución de microsomas en 9 ml de buffer de fosfatos pH 7.4.

Se adicionaron 90 μg de ditionita de sodio para reducir el fierro del grupo hemo, se tomó una muestra de 3 ml la cual sirvió de testigo y el resto se burbujeó con monóxido de carbono de ultra alta pureza, se realizó un barrido a la muestra desde 200 hasta 900 nm en un espectrofotómetro Cintra 5 UV-Visible para observar el pico característico en 450 nm. Para calcular la cantidad de citocromo P-450 en la muestra se empleó un coeficiente de extinción de $91 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$.

5.2. SINTESIS DEL MATERIAL MESOPOROSO DEL TIPO MCM-41.

Por síntesis hidrotérmica se obtuvieron 3 materiales con diferente relación Si/Al y uno sin aluminio^[79-81], empleando como templete 9 g de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTABr) el cual se mezcló con 43 ml de agua destilada en una autoclave con recipiente de teflón a 65 °C. Bajo agitación durante 30 min se adicionaron 4.5 g de ácido silícico y 1.2 g de hidróxido de sodio enseguida se cerró la autoclave y se aumentó la temperatura hasta 95 °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo se adicionó el nitrato de aluminio (de acuerdo a la relación silicio/aluminio empleada) y se dejó nuevamente a 95 °C por 24 h. El material obtenido se lavó con agua desionizada y se calcinó a 650 °C por 24 h.

Las relaciones Si/Al empleadas fueron de 0, 8, 10, 14. Las muestras fueron codificadas como se muestra en la Tabla I.

Tabla I. Materiales mesoporosos del tipo MCM-41 sintetizados sin y con diferente relación Si/Al.

Muestra	Relación silicio/aluminio (Si/Al)	Composición en porcentaje molar
M-1	0	0.35Si : 0 Al : 0.63CTABr : 0.77NaOH : 98 H ₂ O
M-2	8	0.35Si : 0.043Al : 0.63CTABr : 0.77NaOH : 98 H ₂ O
M-3	10	0.35Si : 0.034Al : 0.63CTABr : 0.77NaOH : 98 H ₂ O
M-4	14	0.35Si : 0.025Al : 0.63CTABr : 0.77NaOH : 98 H ₂ O

5.2.1 CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL MCM-41.

El material sintetizado MCM-41 se caracterizó por difracción de rayos-X, microscopía electrónica de transmisión (MET), análisis texturales y por espectroscopía de infrarrojo (IR) con piridina. Mediante estos análisis, se determinó la estructura del material, el área específica, volumen y diámetro de poro, así como la acidez.

Caracterización por difracción de Rx. Los difractogramas de rayos-X de MCM-41 sintetizados sin y con diferente relación Si/Al fueron obtenidos en un difractómetro Siemens D5005 con un monocromador de grafito, en la región a bajo ángulo de 1.5° a 20° en una escala de 2θ. La identificación de las fases se realizó mediante la comparación de los difractogramas obtenidos con el difractograma ya reportado como se observa en la Gráfica 2.

Caracterización por microscopía electrónica de transmisión. Mediante el uso de ésta técnica se pudo corroborar el arreglo de los poros obteniéndose las micrografías para algunas de las MCM-41 sintetizadas.

Determinación de las propiedades texturales. Mediante un analizador de área superficial y porosimetría Micromeritics ASAP 2405, se empleó como adsorbato N₂ a 77 K. La acidez se determinó por IR con piridina a 10⁻³ mbar, temperatura ambiente, 100 °C, 200 °C y 300 °C.

5.3 INMOVILIZACIÓN DE LAS ISOFORMAS CIP2B4 Y CIP2C9.

La inmovilización se realizó por adsorción ^[13], empleando 0.9 ml de una solución 1.28 y 0.3 μM de CIP2B4 y CIP2C9 respectivamente y 50 mg de MCM-41, se adicionaron las mismas cantidades con todas las muestras de material MCM-41 sintetizado.

Se agitó el material en la solución de enzima a 4 °C por 2 h; una vez transcurrido este tiempo las muestras se centrifugaron a 5000 rpm a 4 °C por 20 min y al sobrenadante se le determinó la cantidad de proteínas.

El material precipitado se lavó con agua destilada y se centrifugó nuevamente a 5000 rpm a 4 °C por 20 min. Al sobrenadante obtenido en esta segunda centrifugación también se le determinó el contenido de proteína. El material se filtró y secó para ser empleado en la reacción, con el fin de determinar si la enzima que se fija al material tiene actividad catalítica. Al final de la inmovilización las muestras fueron codificadas como se muestra en la Tabla II.

Tabla II. Muestras de CIP2C9 y CIP2B4 inmovilizadas en MCM-41.

	RELACIÓN Si/A			
Enzima	Sin Al	8	10	14
CIP2C9	M-5	M-6	M-7	M-8
CIP2B4	M-9	M-10	M11	M-12

5.3.1. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA UNIDA A MCM-41.

La determinación de proteínas antes y después de la inmovilización se realizó mediante el método de BCA ^[85-86] debido a que la concentración de la solución de enzima es baja y este método es mucho más sensible que el de Lowry. El método de BCA permite determinar desde 0.2 hasta 50 µg de proteína en 500 µl. Para la curva estándar se empleó albúmina de suero bovino. Los reactivos para el ensayo fueron adquiridos de la casa sigma.

5.4. EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

Para llevar a cabo la reacción con los microsomas, la enzima libre e inmovilizada se empleó 1mM de ácido valproico como sustrato, 1mM de NADPH, 1mM de MgCl₂, 1nmol de CIP-450 de microsomas de hígado de rata tratadas con fenobarbital. En el caso de la isoforma pura se utilizó 0.1 nmoles (CIP2C9 y CIP2B4 fueron adquiridas de sigma), todo esto en un volumen final de 1ml utilizando buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.4. En el caso de las reacciones en las que se empleó citocromo P-450 reductasa se utilizarón 0.2 nmoles. La mezcla de reacción fue incubada a 37 °C por 40 min, se finalizó con la adición de 1 ml de HCl frío al 10%. Se adicionó 0.19 µg de ácido ciclohexancarboxílico (sigma) como estándar interno para los análisis de GC/MS. La muestra se centrifugó a 5000 rpm a 4 °C por 25 min. Al sobrenadante se le hizo una extracción con acetato de etilo, el extracto orgánico se secó con sulfato de magnesio y después se concentró con N₂ seco ultra alta pureza, hasta alcanzar un volumen de 20 µl. A éste concentrado se le adicionaron 50 µl de N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) [3-4] a 95 °C por 45 min, para obtener los derivados silanizados. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su determinación.

5.4.1. BIOTRANSFORMACIÓN DEL ÁCIDO VALPROICO.

La cantidad de ácido valproico transformado, se cuantificó mediante cromatografía de gases con detector de flama (GC/FID) empleando un cromatógrafo HP 6890 con helio como gas de arrastre y con una columna HP-1 de 60m x 0.32 mm id x 0.25 µm. La cantidad de muestra inyectada fue de 1 µl, la temperatura inicial fue de 50 °C durante 1min, la primera rampa fue de 25 °C/min hasta 120 °C, las siguientes rampas de 6 °C/min a 180 °C y de 30 °C/min a 260 °C manteniendo esta última durante 5 min. La temperatura del detector de ionización de flama fue de 270 °C y la del inyector Split de 250 °C. Para la cuantificación se empleo una curva de calibración a partir del área del estándar y del ácido valproico.

5.4.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS

Para la identificación de los metabolitos las muestras se analizaron por cromatografía de gases acoplada a masas^[87-88] (GC/MS), en un equipo Saturno 2000 Varian, la columna empleada en el cromatógrafo fue también HP-1. En los análisis de espectrometría de masas la técnica de ionización empleada fue de impacto electrónico con una energía de 70 eV, la trampa iónica a 180 μ A y las temperaturas en la línea de transferencia, la trampa y el inyector fueron de 250, 180 y 250 °C respectivamente. Las muestras que se analizaron en la reacción fueron codificadas como se observa en la Tabla III.

Tabla III. Codificación de las muestras en base en los componentes de la reacción.

MUESTRA	SISTEMA
M-13	CIP2C9 + NADPH sin la reductasa
M-14	CIP2C9 + NADPH con la reductasa
M-15	CIP2C9 sin NADPH con la reductasa
M-16	Microsomas
M-17	CIP2B4 + NADPH sin la reductasa
M-18	CIP2B4 + NADPH con la reductasa
M-19	CIP2C9-MCM-41(sin Al) + NADPH sin la reductasa
M-20	CIP2C9-MCM-41(Si/Al=8) + NADPH sin la reductasa
M-21	CIP2C9-MCM-41(Si/Al=10) + NADPH sin la reductasa
M-22	CIP2C9-MCM-41(Si/Al=14) + NADPH sin la reductasa
M-23	CIP2B4-MCM-41(sin Al) + NADPH sin la reductasa
M-24	CIP2B4-MCM-41(Si/Al=8) + NADPH sin la reductasa
M-25	CIP2B4-MCM-41(Si/Al=10) + NADPH sin la reductasa
M-26	CIP2B4-MCM-41(Si/Al=14) + NADPH sin la reductasa

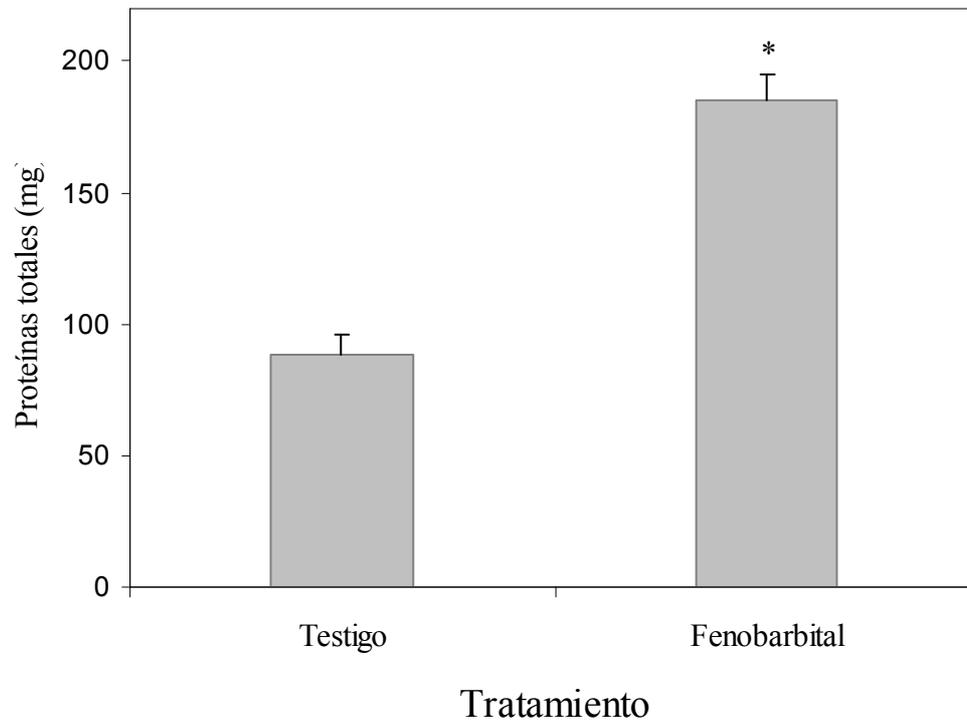
6. RESULTADOS.

6.1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES Y CITOCROMO P-450.

Para determinar si existía diferencia estadísticamente significativa entre los grupos con respecto al contenido de proteínas totales (Gráfica 4) se utilizó un análisis de varianza bifactorial para mediciones repetidas (RM). El resultado fue $P < 0.0001$ para los tratamientos, no así para las repeticiones, en donde $P > 0.05$, por lo que la diferencia se debe a los tratamientos y no a las repeticiones. Para el contenido de citocromo P-450 (Gráfica 5) se utilizó un análisis de varianza unifactorial y se obtuvo diferencia estadísticamente significativa entre el testigo y las ratas pretratadas con fenobarbital, en donde $P < 0.05$. Los datos se muestran en la Tabla IV.

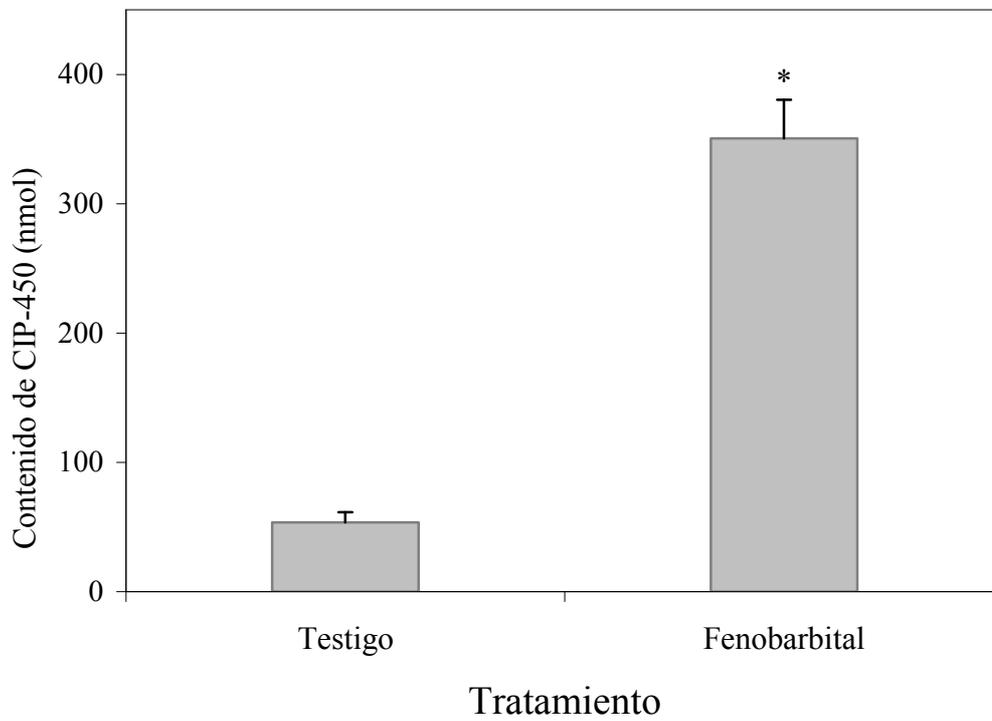
Tabla IV. Efectos de la administración de fenobarbital sobre el contenido de proteína microsomal y citocromo P-450.

Parámetro	Testigo n=11	Fenobarbital n=11
Peso del hígado (g).	13.7	17.7
Proteína total (mg).	88.34	185.34 ^a
mg de proteína por g de hígado.	6.45	10.44
Citocromo P-450 total (nmol).	53.50	350.49 ^a
nmol citocromo P-450 por mg de proteína.	0.60	1.89
nmol citocromo P-450 por g de hígado.	3.91	19.73



* $P < 0.05$.

Gráfica 4. Contenido de proteínas totales en microsomas de hígado de ratas pretratadas con fenobarbital.



* $P < 0.05$.

Gráfica 5: Contenido de citocromo P-450 en microsomas de hígado de ratas pretratadas con fenobarbital.

En la Figura 12 se muestra el espectro de UV-visible de los microsomas obtenidos de hígado de rata, en donde se observa el pico característico a 450 nm de citocromo P-450. El pico que se observa alrededor de 550 nm se debe a citocromo b₅ y no ha metahemoglobina ya que ésta da un pico a 520 nm.

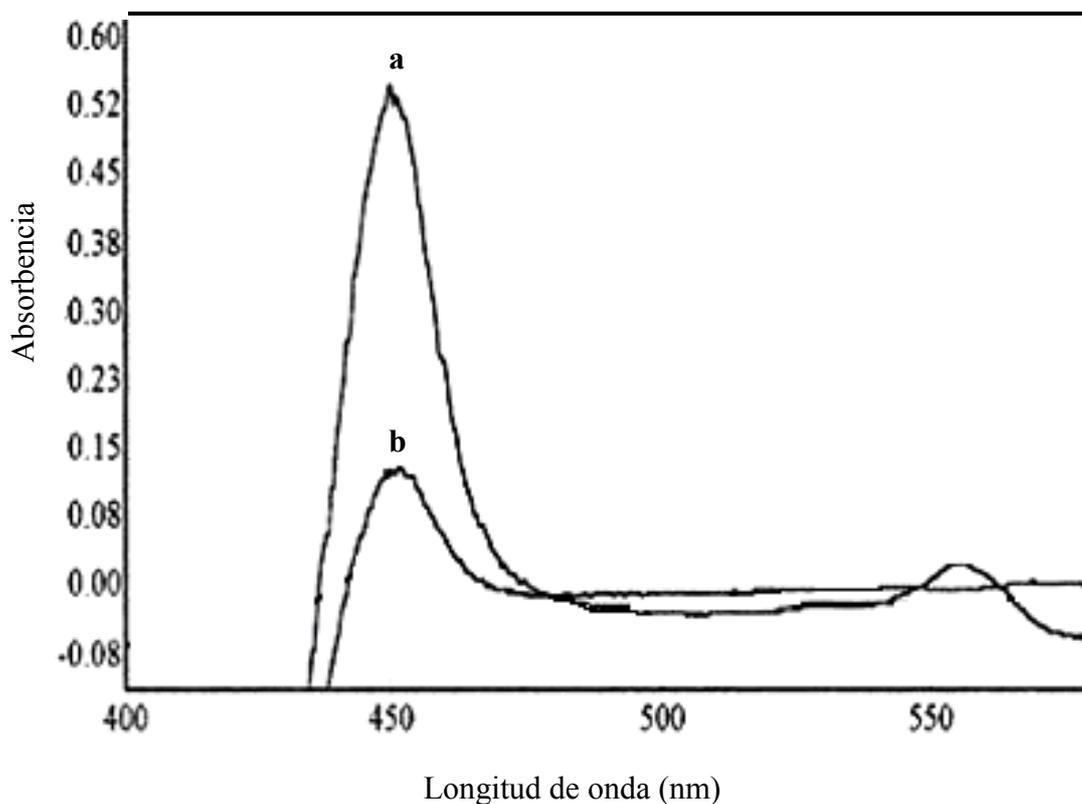


Figura 12. Pico característico del citocromo P-450, reducido y tratado con CO en microsomas de hígado de rata pretratadas: a) fenobarbital b) solución fisiológica.

6.2. CARACTERIZACIÓN DE MCM-41 CON DIFERENTES RELACIONES Si/Al.

Una vez sintetizados todos los materiales mesoporosos MCM-41, M-1, M-2, M-3, M-4 con relaciones Si/Al de 0, 8, 10, 14, respectivamente, estos se caracterizaron por difracción de rayos-X, microscopía electrónica y análisis de texturas.

Los patrones obtenidos mediante difracción de rayos-X (Figura 13) corresponden a un material mesoporoso del tipo MCM-41 con un arreglo hexagonal y una distancia interplanar en el plano (100) de 37.27, 37.52, 37.73, y 37.95 para el material M-1, M-2, M-3, M-4 respectivamente.

Así mismo, en la Figura 13 se puede observar que a medida que se incrementa el contenido de aluminio disminuye la intensidad en el pico de difracción (100) característico de los materiales mesoporosos con una estructura hexagonal. Estos resultados son similares a los obtenidos por L.Y. Chen^[81].

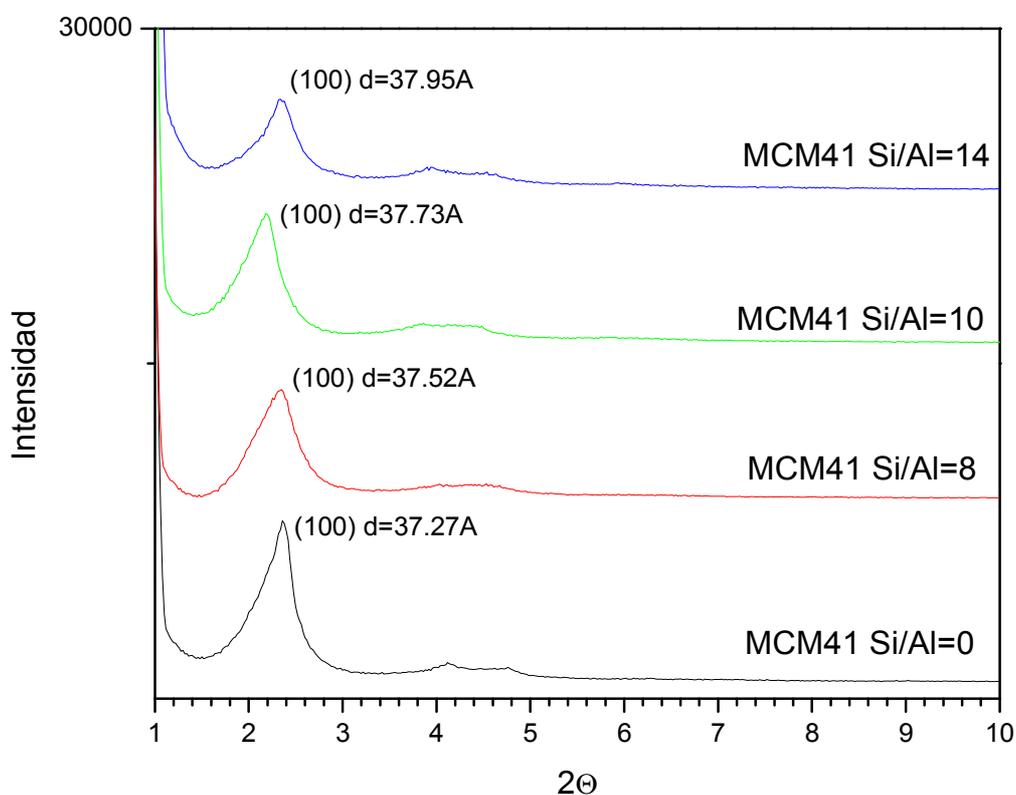


Figura 13. Patrón de difracción de rayos-X, de MCM-41 con y sin Al.

El arreglo ordenado y la forma hexagonal de los poros para cada una de las muestras se observaron mediante microscopía electrónica de transmisión (Figura 14). Aquí sólo se muestra la microscopía correspondiente a la muestra M-4.

Como se observa en la microscopía electrónica de transmisión y en base a la distancia interplanar obtenida por difracción de rayos-X, existen entre 6 y 7 poros en 25 nm para M-4 (Si/Al=14). Y debido a que todos los materiales tienen aproximadamente la misma distancia interplanar estos, pueden tener la misma cantidad de poros en 25 nm.

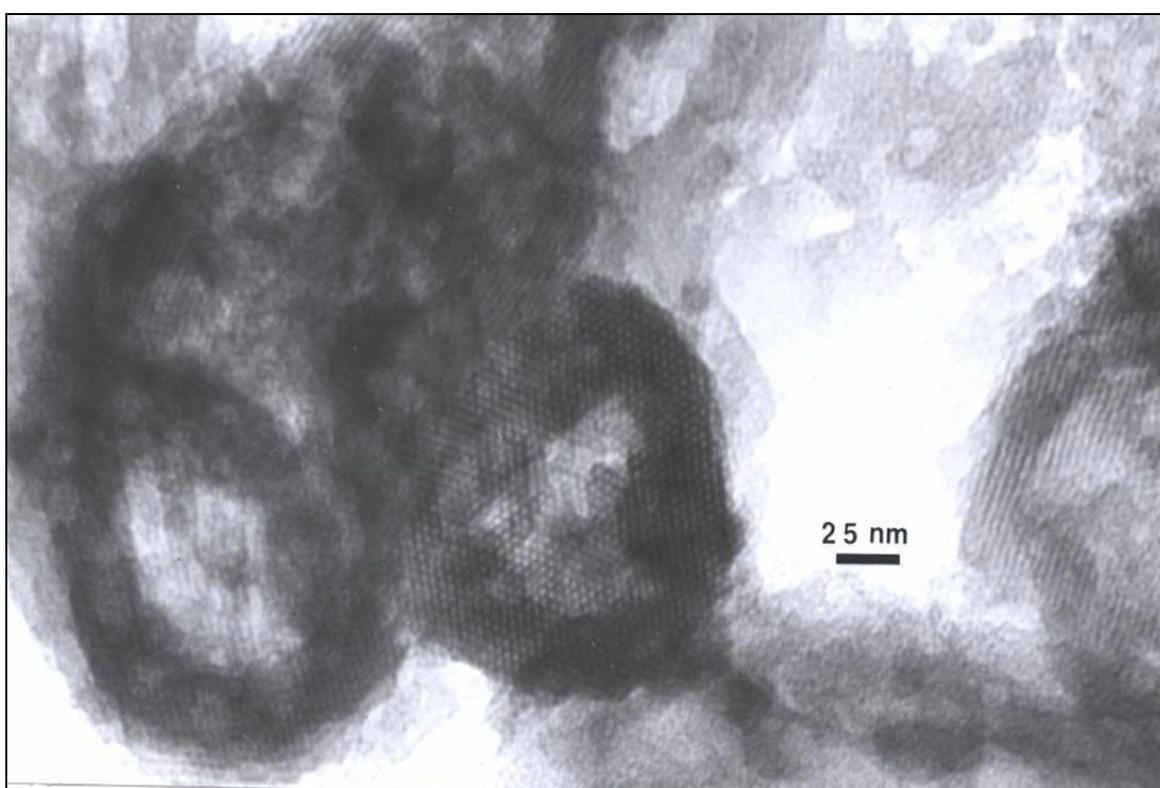


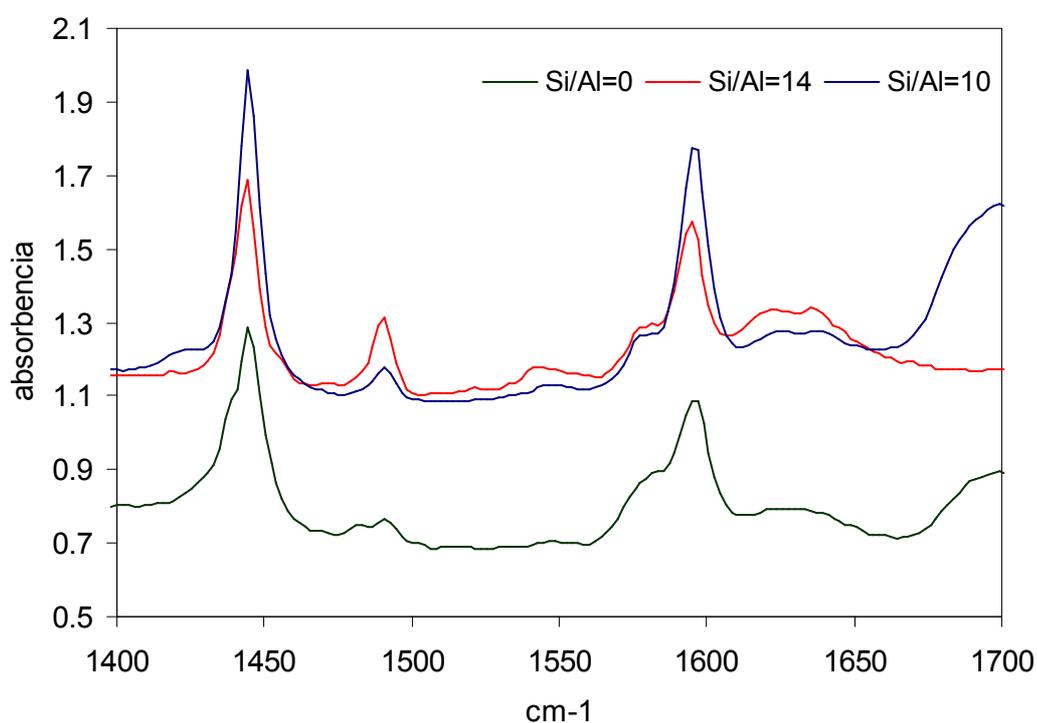
Figura 14. Microscopía electrónica de transmisión de M-4 (Si/Al= 14).

Mediante el análisis de texturas se obtuvo el área superficial, el diámetro y volumen de poro de todas las muestras sintetizadas (M-1, M-2, M-3, M-4), los cuales se resumen en la Tabla V.

Tabla V. Características texturales de MCM-41 con diferente relación Si/Al.

	MCM-41			
	M-1	M-2	M-3	M-4
Área específica (m ² /g)	915	1025	1056.72	1022
Diámetro de poro (Å)	45	47	51.6	55
Volumen de poro (cm ³ /g)	1.02	1.21	1.47	1.40
Acidez de Lewis (µg/g)	879	1968	1148	1273
Acidez de Bronsted (µg/g)	0	0	44	0

El material con mayor acidez es aquel que tiene una mayor cantidad de aluminio, ya que este provoca que aumente la cantidad de sitios ácidos de Lewis incrementando la absorbencia a 1449 cm⁻¹, la banda en 1600 cm⁻¹ se refiere a los grupos OH, los espectros que se muestran son los obtenidos a temperatura ambiente ver gráfica 6.



Gráfica 6. Espectro de IR con piridina

6.3. CANTIDAD DE ENZIMA INMOVILIZADA EN MCM 41.

Una vez sintetizados los materiales con diferente relación Si/Al se realizó la inmovilización de las dos isoformas puras CIP2B4 y CIP2C9 en los cuatro materiales. La cantidad de enzima inmovilizada en cada material se muestra en la Tabla VI.

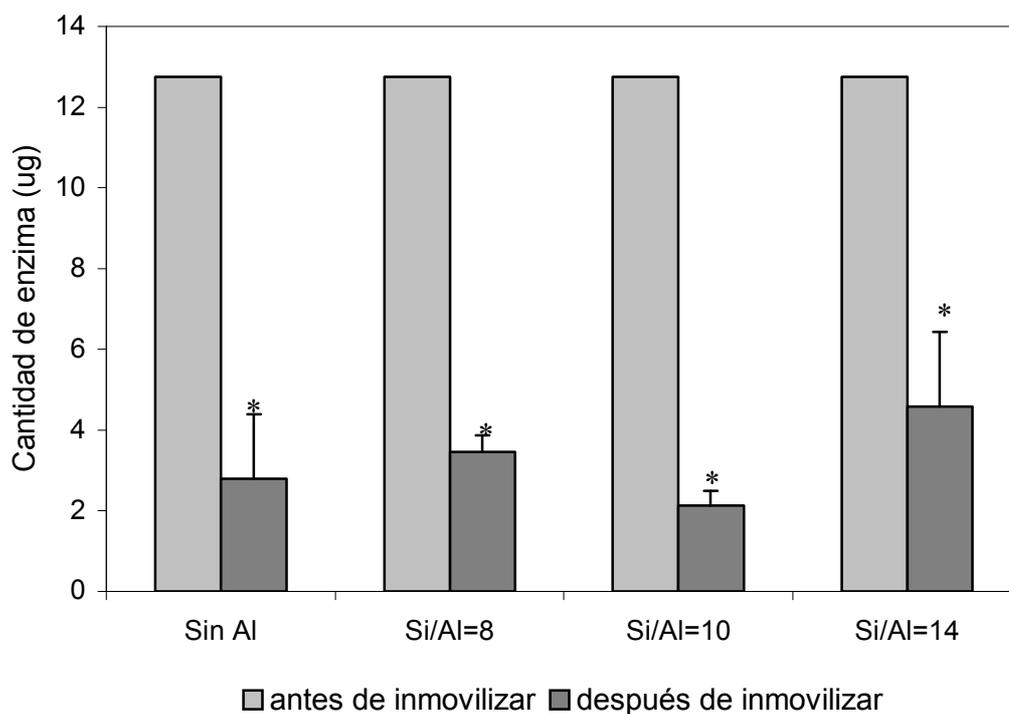
Tabla VI. Cantidad de enzima inmovilizada sobre MCM-41 con diferente relación Si/Al.

CIP2C9		CIP2B4	
Muestra	Cantidad de enzima inmovilizada (µg/ g material)	Muestra	Cantidad de enzima inmovilizada (µg/g material)
M-5	199**	M-9	870*
M-6	186**	M-10	682*
M-7	212**	M-11	914*
M-8	163**	M-12	817*

* n=6; ** n=3.

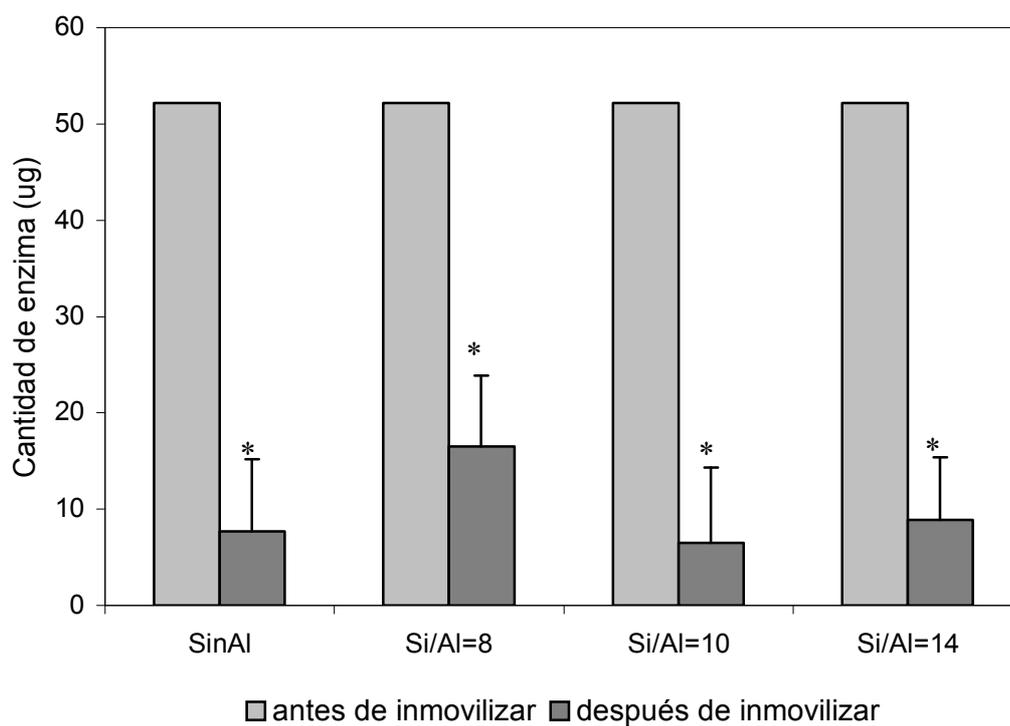
Mediante el análisis de varianza unifactorial no hubo diferencia estadísticamente significativa entre la cantidad de enzima inmovilizada en MCM-41 con diferente relación Si/Al, a pesar de que se observa un mayor contenido de enzima, en el material con relación Si/Al=10, esto podría ser debido a que este material es el que tiene una mayor área, como se muestra en la Tabla V, y además tiene una acidez intermedia en base a los materiales sintetizados.

En la gráfica 7 y 8 se muestra la cantidad de CIP2C9 y CIP2B4 en la solución antes y después de la inmovilización. En éstas se aprecia diferente cantidad de CIP2C9 y CIP2B4 en la solución antes de inmovilizar, debido a que se disponía de una mayor cantidad de CIP2B4.



* P>0.05.

Gráfica 7. Contenido de CIP2C9 en MCM-41 con diferentes relaciones Si/Al.



* $P > 0.05$.

Gráfica 8. Contenido de CIP2B4 en MCM-41 con diferentes relaciones Si/Al.

El porcentaje de enzima inmovilizada en cada uno de las MCM-41 se muestra en la Tabla VII, estos porcentajes coinciden con el de otras enzimas que han sido inmovilizadas sobre MCM-41^[2].

Tabla VII. Porcentaje de CIP2C9 y CIP2B4 inmovilizada en MCM-41.

CIP2C9		CIP2B4	
Muestra **	% de enzima inmovilizada	Muestra *	% de enzima inmovilizada
M-5	78	M-9	88
M-6	72	M-10	79
M-7	83	M-11	92
M-8	64	M-12	82

* n=6; ** n=3

Es necesario considerar, si la enzima tiene carga eléctrica a pH de 7.4, en el cual se realizó la inmovilización, debido a que si la enzima presenta carga, está podría interaccionar mejor con el material, ya que éste tiene acidez de Lewis, por lo que, sería conveniente que la enzima tuviera una carga negativa. Se calculó el porcentaje de aminoácidos con carga positiva y negativa a pH de 7.4, a partir de la secuencia de aminoácidos para cada una de las isoformas reportadas en la literatura^[89-90], la cantidad de aminoácidos con carga positiva y negativa se muestran en la Tabla VIII. A este valor de pH la enzima se encuentra en su punto isoeléctrico, por lo tanto es posible que la interacción con el material no sea suficiente para notar una diferencia entre la cantidad de enzima inmovilizada en las MCM-41 con diferente acidez. Por lo anterior, sería conveniente llevar a cabo la inmovilización con diferentes valores de pH, teniendo en cuenta la estabilidad de la enzima.

Tabla VIII. Porcentaje de aminoácidos con carga a pH de 7.4 en CIP2B4 y CIP2C9.

Aminoácidos	CIP2B4	CIP2C9
con carga positiva	11%	12%
con carga negativa	11%	11%

6.4. CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA CIP2B4-MCM 41 (M-12).

Una vez que las enzimas se inmovilizaron sobre las MCM-41, se eligió una muestra de CIP2B4 inmovilizada (M-12), ya que de ésta se disponía de una mayor cantidad y dado, que no se obtuvo diferencia significativa en la cantidad de enzima inmovilizada en los diferentes materiales. A esta muestra se le realizaron los mismos análisis de caracterización que al material solo, con la finalidad de observar si ocurrían cambios en la estructura del mismo después de la inmovilización.

En la Figura 15 se muestra el patrón de difracción de rayos-X para M-4 (con el proceso de inmovilización) y M-12 (CIP2B4-MCM-41-Si/Al=14), observando que el patrón de difracción de rayos-X no cambió entre M-4 y M-12 lo cual sugiere que las moléculas de CIP2B4 fueron adsorbidas en los poros de MCM-41, con un diámetro de poro de 54 Å y que esto contribuye a mantener la estructura. Sin embargo, ocurren algunos cambios en el patrón de difracción de rayos-X de M-4 cuando se adiciona solo el buffer sin la enzima, uno de estos es que el pico de difracción en el plano (100) es muy pequeño y los demás no aparecen, mostrando con ello que la estructura no se mantiene.

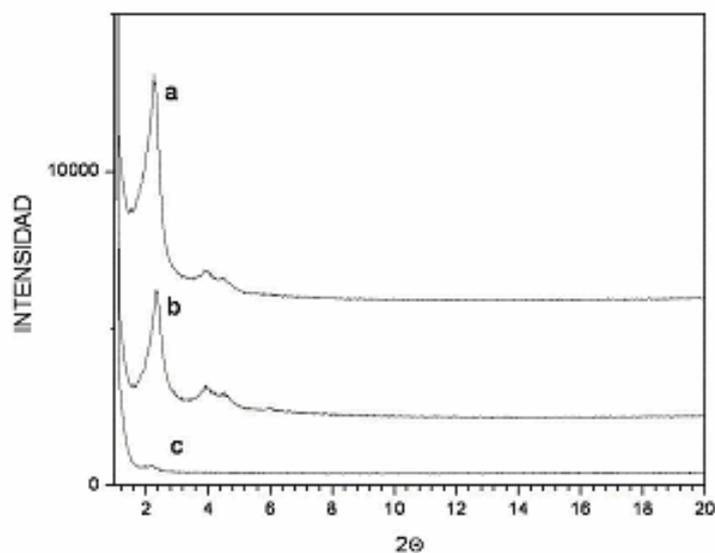


Figura 15. Patrón de DRX de: (a) M-4 (MCM-41 Si/Al =14), (b) M-12(CIP2B4-MCM-41 Si/Al=14), (c) M-4 con proceso de inmovilización.

Al realizar el análisis de texturas a la muestra M-12 (CIP2B4-MCM-41-Si/Al=14) se observó que el volumen de poro y las isothermas de adsorción de N₂ (Figura 16) disminuyen, en comparación con M-4 la cual se refiere a la misma MCM-41 pero sin la enzima, por lo cual, la enzima podría estar inmovilizada en el material y de esta forma ocupar parte del área, observándose con ello una disminución en la misma, al igual que en la cantidad de nitrógeno adsorbida. Los resultados del análisis de texturas de M-12 en comparación con M-4 se muestran en la Tabla IX.

Tabla IX. Análisis texturales de; M-4 (MCM-41 Si/Al=14) y M-12 (CIP2B4-MCM-41Si/Al=14).

Muestra	Área superficial (m ² /g)	Diámetro de poro (Å)	Volumen de poro (cm ³ /g)
M-4	1022	54.71	1.40
M-12	806	48.87	0.99

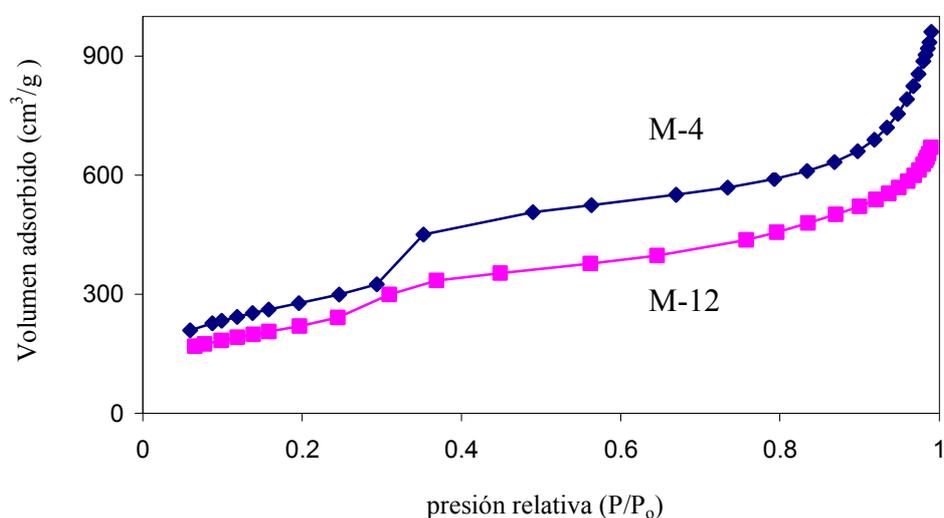


Figura 16. Isotherma de adsorción de N₂ de M-4 (MCM-41 Si/Al=14) y M-12 (CIP2B4-MCM-41Si/Al=14).

En la microscopía de M-4 (MCM-41 Si/Al=14) (Figura 14) se observa que los poros tienen un arreglo hexagonal tal y como se describió anteriormente. Sin embargo, cuando se ha inmovilizado la enzima (Figura 17 a), se observan regiones en las cuales ya no es posible distinguir los poros, esto podría ser debido a que la enzima los está cubriendo, ya que en la microscopía de CIP2B4 liofilizada (Figura 17 b), se muestra pequeñas partículas oscuras.

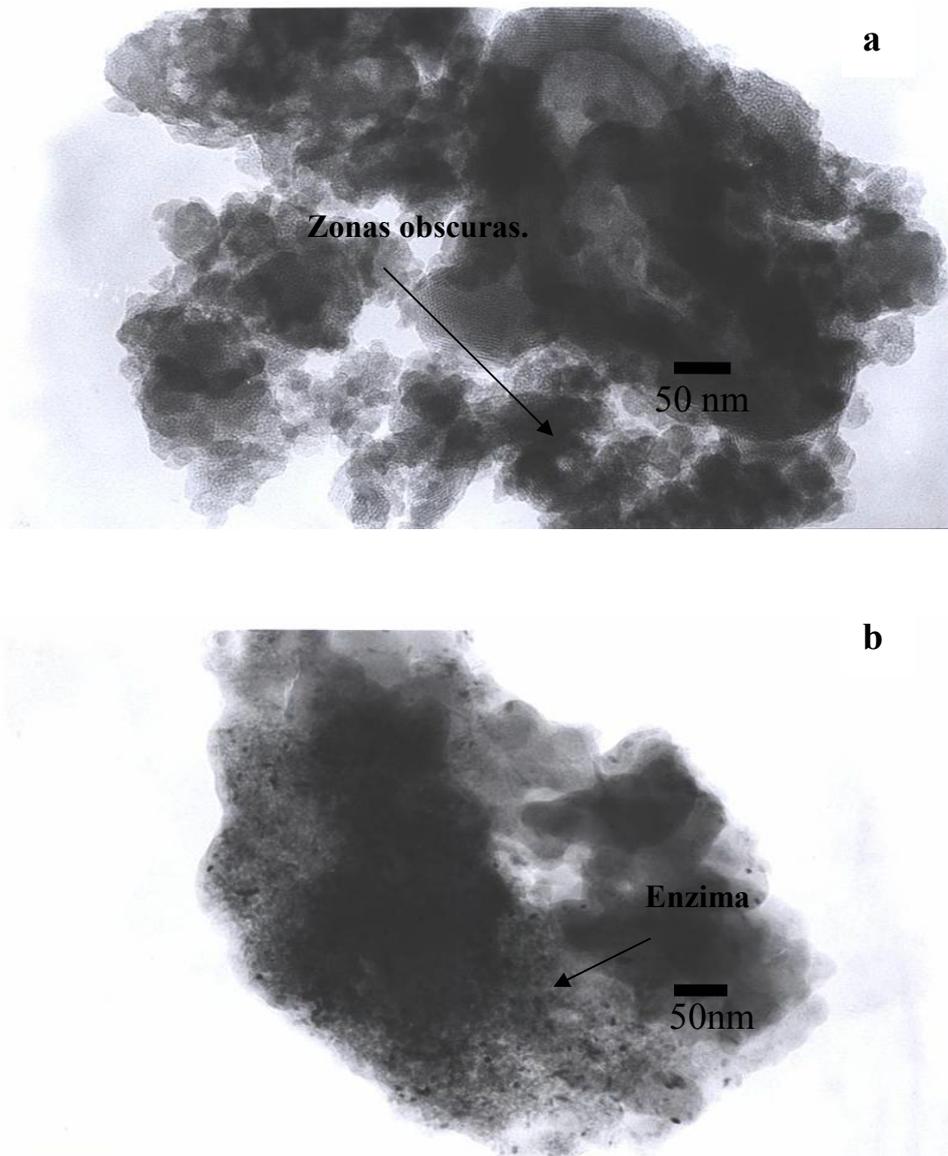


Figura 17. Microscopía electrónica de transmisión de: a) M-12 (CIP2B4 -MCM-41 Si/Al=14) y b) CIP2B4 liofilizada.

6.5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD.

Se obtuvieron los cromatogramas GC/FID, de cada uno de los componentes de la mezcla tales como: el estándar (Figura 18) el cual tiene un tiempo de retención de 18.94 min, el N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) (Figura 19) con un tiempo de retención de 9.4, y el ácido valproico (Figura 20) con un tiempo de retención de 17.689. Se realizó la cromatografía de gases para una muestra (Figura 21) y se descartaron los picos de todos los componentes dejando solo el que corresponde al ácido valproico. Para confirmar que era el pico del ácido valproico se realizó espectrometría de masas obteniendo el patrón de fragmentación correspondiente como se muestra en la Figura 22.

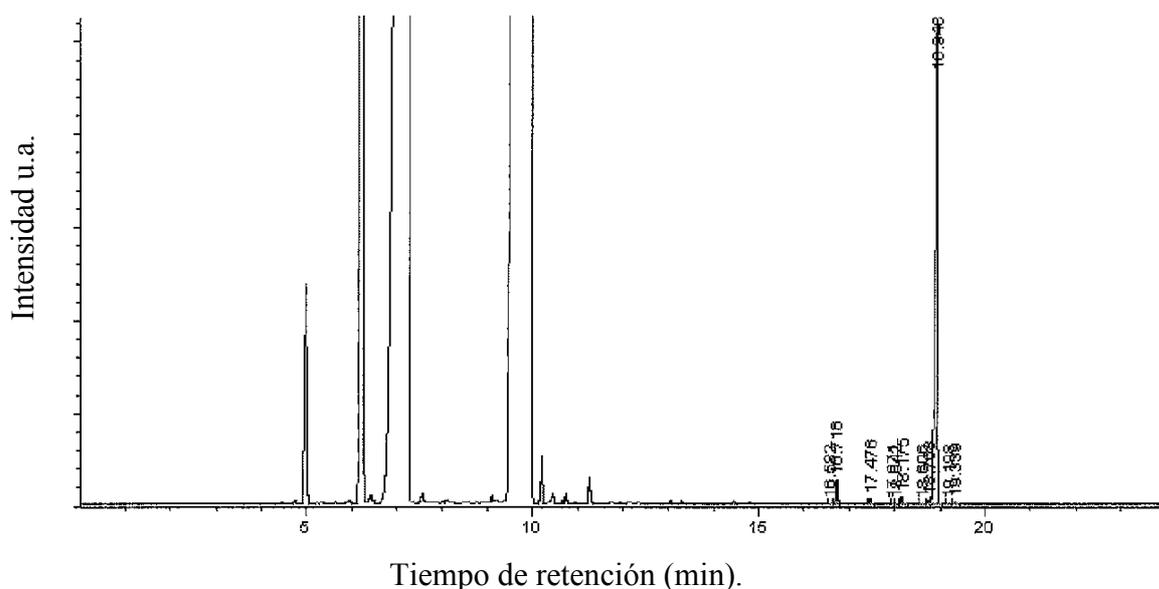


Figura 18. Cromatograma de GC/FID del ácido ciclohexancarboxílico (estándar).

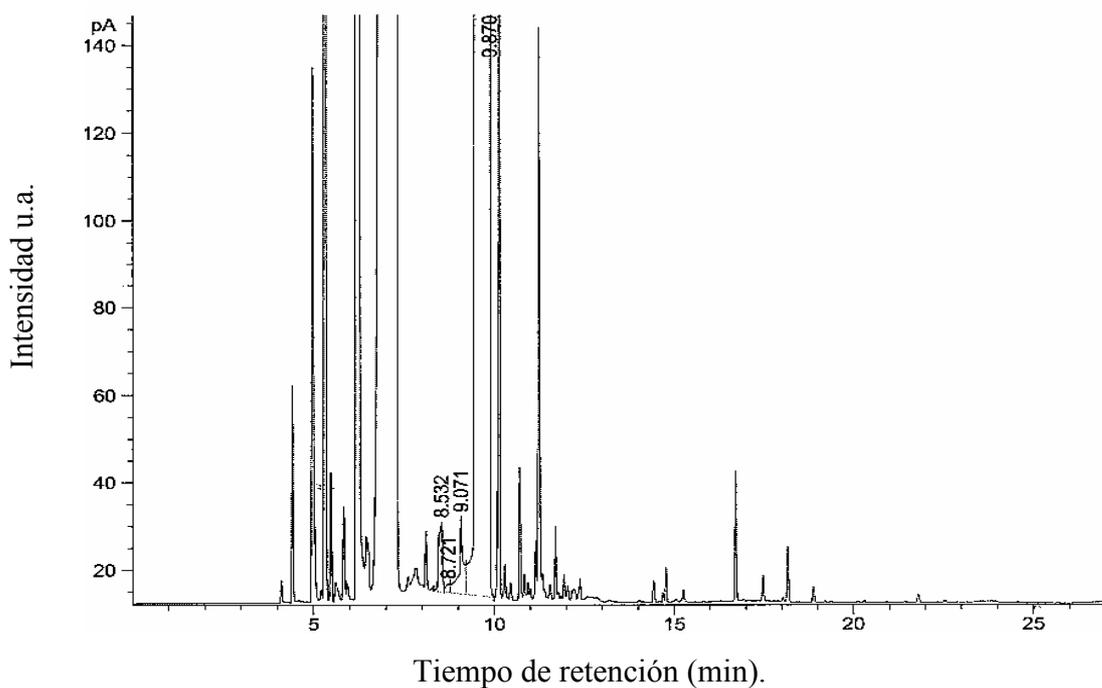


Figura 19. Cromatograma de GC/FID del N,O,-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA).

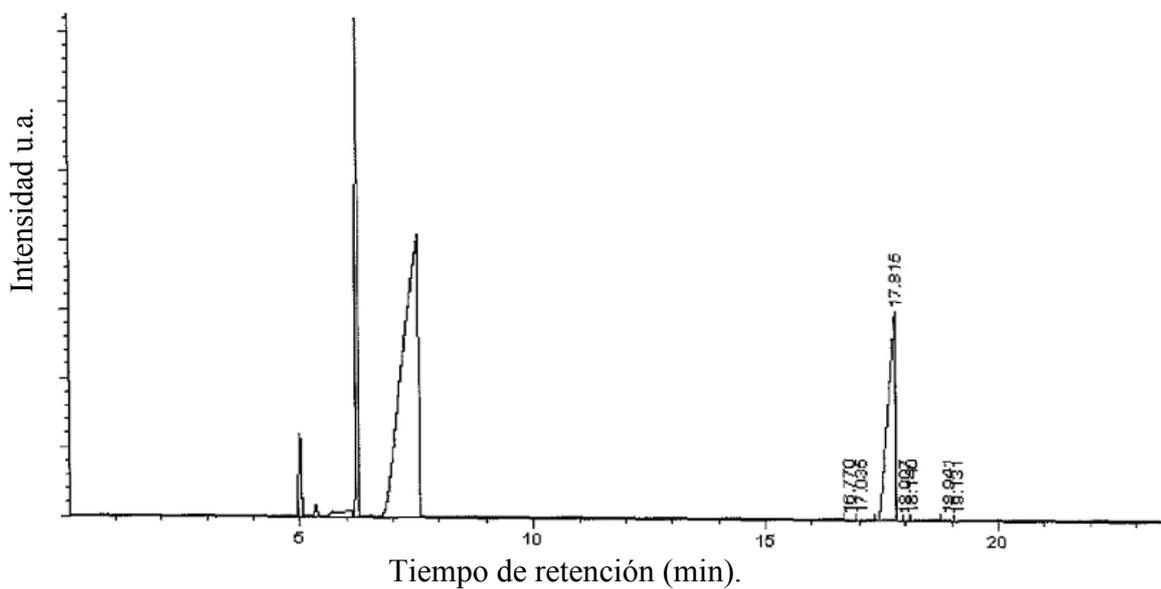


Figura 20. Cromatograma de GC/FID del ácido valproico.

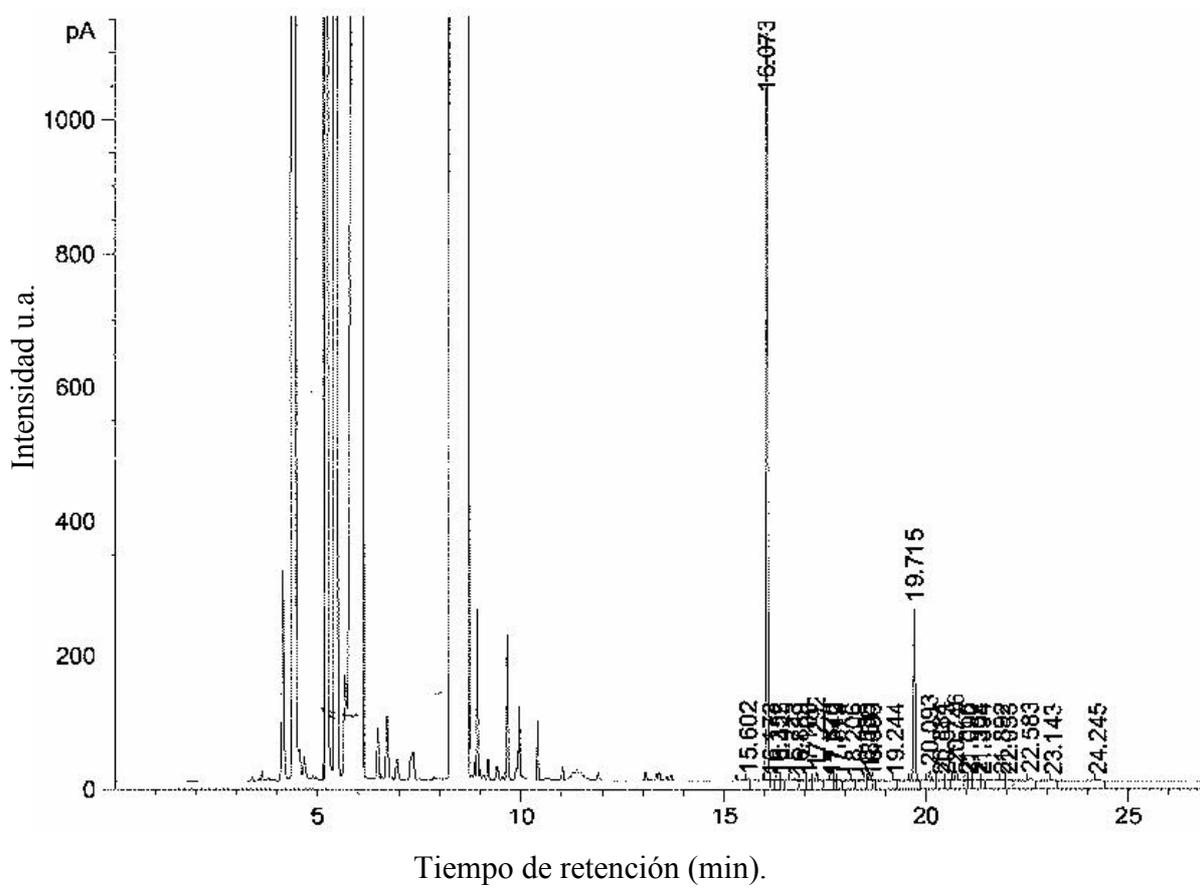


Figura 21. Cromatograma de GC/FID de una muestra con todos los componentes.

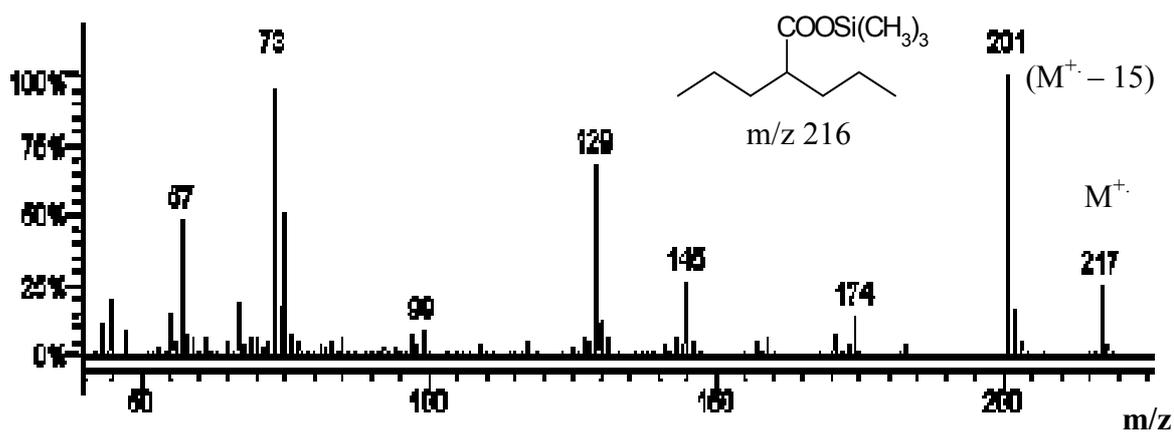


Figura 22. Espectro de masas del ácido valproico silanizado.

En el espectro de masas del ácido valproico figura 22, se puede observar el ión molecular muy pequeño, este corresponde a una relación m/z de 216, lo cual coincide con el peso molecular de dicho compuesto silanizado. Aunque el ión molecular es pequeño se observa el fragmento con relación m/z 201 que corresponde a la pérdida de un grupo metilo, y es el que generalmente se observa^[91-92].

Una vez que se confirmó por espectrometría de masas el pico correspondiente al ácido valproico, se cuantificó el área de éste para determinar la actividad de la enzima inmovilizada en cada uno de los materiales MCM-41.

6.5.1. ACTIVIDAD DEL SISTEMA CIP2C9-MCM-41.

La actividad del CIP2C9 libre, inmovilizada y bajo diferentes condiciones durante la reacción se resume en la Tabla X.

Tabla X. Actividad de CIP2C9 inmovilizada en MCM-41.

Muestra	Actividad (nmol de valproico/nmol de CIP2C9 /min)
M-13	N.D.
M-14	103±14.62
M-2	N.D.
M-7 sin NADPH	N.D.
M-19	28.56 ± 7.102*
M-20	30.40 ± 9.357*
M-21	35 ± 0.79
M-22	32.60 ± 10.77*

* Es la media de n=3 ± s

La conversión de ácido valproico se corroboró buscando por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas los metabolitos de la biotransformación ya sea el 3-OH-VPA, 4-OH-VPA, 5-OH-VPA o Δ^4 -VPA (la olefina). Se obtuvieron fragmentos característicos para estos compuestos hidroxilados como es el ion m/z 147 y m/z 117, además del ión molecular de la olefina, el espectro de masas de este compuesto se muestra en la Figura 23.

Cabe mencionar que los estudios de identificación de los metabolitos se hicieron, solo cualitativos y no cuantitativos.

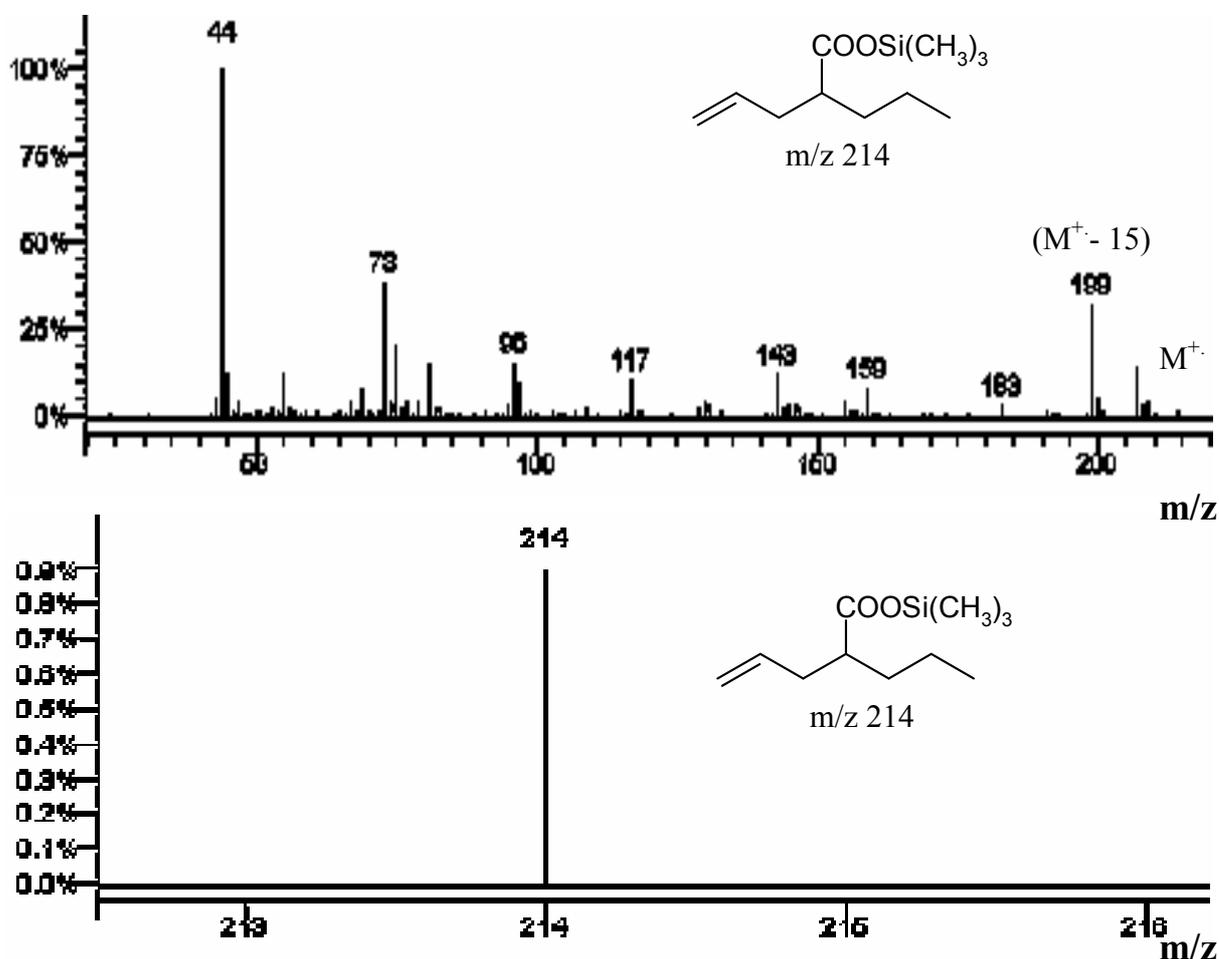


Figura 23. Espectro de masas del ácido 2-*n*-propil Δ^4 petenoico (Δ^4 -VPA).

En la figura anterior se muestra una amplificación del ión molecular de la olefina ya que este es muy pequeño, así como los fragmentos y la estructura a la cual corresponde dicho espectro. En el eje de las ordenadas en los espectros de masas se muestra la abundancia que tiene cada fragmento y en las abcisas la relación masa carga.

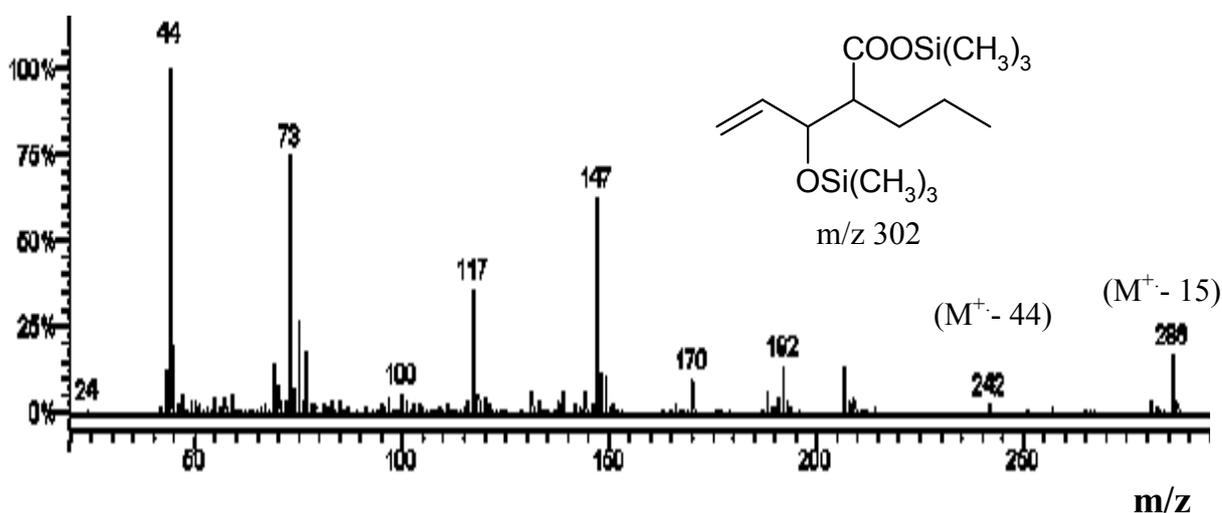


Figura 24. Espectro de masas del ácido 3-hidroxi-2-propil- Δ^4 -pentenoico (3-OH- Δ^4 -VPA).

También se obtuvo el espectro de masas que corresponde a la olefina con un grupo hidroxilo en la posición 3, este se observa en la figura 24. En este no se tiene el ión molecular pero sí el fragmento 286 que corresponde a la pérdida de un grupo metilo a partir del ión molecular.

El ion m/z 147 corresponde a la pérdida de dos grupos trimetilsililoxi ($\text{Me}_3\text{Si}-\text{O}^+=\text{SiMe}_2$), los cuales indican la presencia de grupos hidroxilo en los metabolitos silanizados^[21]. Las estructuras de los fragmentos se muestran en la siguiente Figura 25.

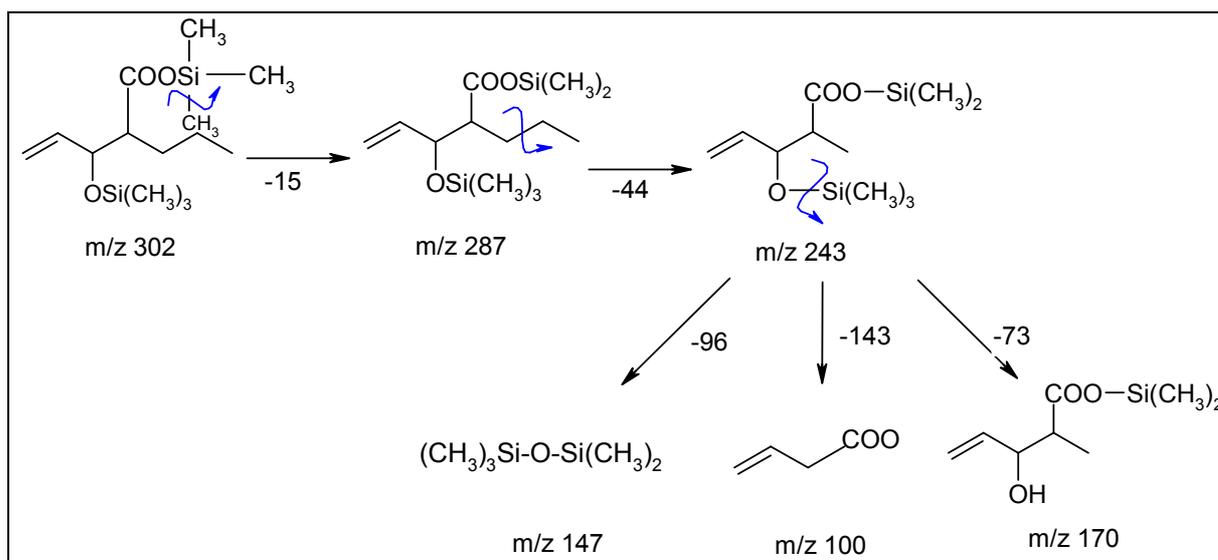


Figura 25. Fragmentos del ácido 3-hidroxi-2-propil- Δ^4 -pentenoico (3-OH- Δ^4 -VPA).

6.5.2. ACTIVIDAD DEL SISTEMA CIP2B4-MCM-41.

Se obtuvo la actividad de CIP2B4 libre e inmovilizada, los resultados se muestran en la Tabla XI.

Tabla XI. Actividad de CIP2B4 inmovilizada en MCM-41.

Muestra	Actividad (nmol de valproico/nmol de CIP2B4 /min)*
M-17	N.D.
M-18	81.78 \pm 7.67
M-23	56.797 \pm 9.43
M-24	27.163 \pm 6.54
M-25	78.87 \pm 11.86
M-26	63.083 \pm 10.89

* $n=3 \pm s$, N.D; no se detecto actividad.

Cuando se evaluó la actividad de CIP2B4 libre con NADPH sin la citocromo P-450 reductasa (M-17), no se detectó actividad, esto puede ser debido a que en este sistema no hay quien lleve a cabo la transferencia de los electrones del cofactor reducido a el CIP2B4, sin embargo para las muestras M-23, M-24, M-25 y M-26 el material podría estar participando como transportador de electrones; ya que no se tiene la citocromo P-450 reductasa y sin embargo se obtiene actividad.

En estas muestras se obtuvieron los mismos espectros de masas de los metabolitos obtenidos con CIP2C9, en la figura 26 se muestra el cromatograma de gases (CG), en este el pico que se observa es el de la olefina la cual esta presente en la muestra de CIP2C9 y CIP2B4.

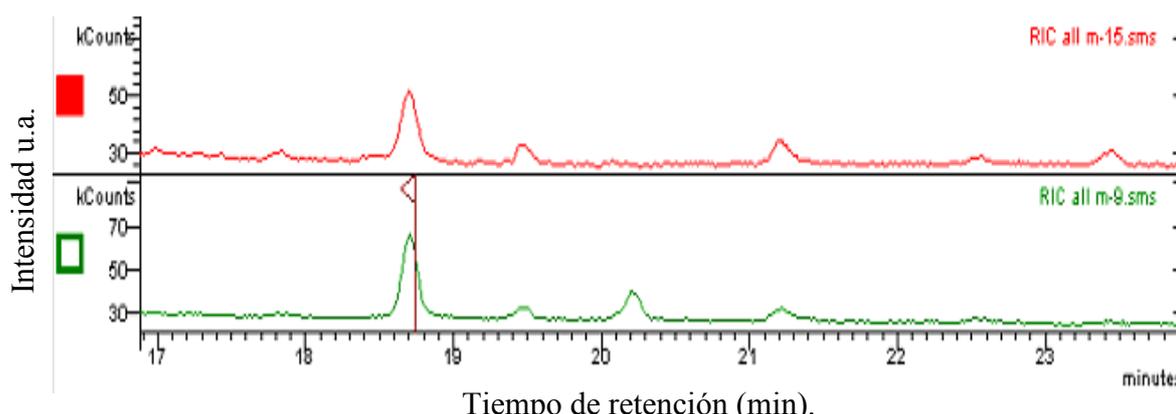


Figura 26. Cromatograma de gases de las muestras de CIP2C9 y CIP2B4.

6.5.3. ACTIVIDAD DE LOS MICROSOMAS.

La actividad de citocromo P-450 de hígado de rata pretratada con fenobarbital es baja, lo cual puede ser debido a que los metabolitos producidos lo inhiban, o a que la cantidad de NADPH fue muy poca y no se empleó un sistema regenerador.

Tabla XII. Actividad de citocromo P-450 de microsomas de hígado de rata.

Muestra	Actividad (nmol de valproico/nmol de cip-450/min)
M-16 *	24.4167 ± 2.72

* n = 3 ± s

Los microsomas metabolizaron al ácido valproico en compuestos hidroxilados como se muestra en el espectro de masas (Figura 27). Aunque en dicho espectro no se ha observado el ión molecular, esto puede ser debido a que la molécula sea muy inestable y se fragmente a compuestos más estables: el pico base con relación m/z 73 corresponde a la pérdida de un radical etilo con rearreglo para dar un catión estabilizado por resonancia, los fragmentos en 117 y 147 indican la existencia de metabolitos hidroxilados. Éstos fragmentos se observan en la Figura 27.

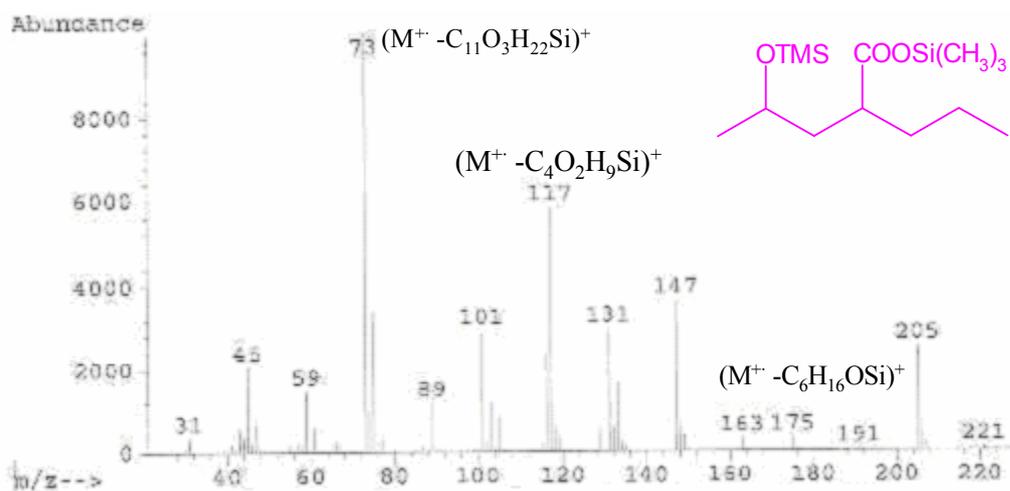


Figura 27. Espectro de masas del ácido 4-hidroxi-2-propil pentanoico, un metabolito del ácido valproico

El ion en m/z 117 se refiere al fragmento $\text{CH}_3\text{-CH=O}^+\text{-SiMe}_3$ el cual demuestra que la posición del OH es en el C-4, este ión ha sido ampliamente encontrado en espectros de ésteres de alcoholes (ω -1) silanizados [93].

DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

El contenido de proteínas totales así como el de citocromo P-450 aumentan en los microsomas de hígado de ratas pretratadas con fenobarbital. Éste fármaco incrementa el contenido de citocromo P-450 cerca de 6.6 veces y el contenido de proteínas aproximadamente 2.1 veces en comparación con las ratas testigo. Por lo tanto, existe diferencia significativa en el contenido de proteínas totales y citocromo P-450 entre los microsomas de hígado de rata pretratada con fenobarbital y los microsomas de hígado de rata a los cuales se les administro solución salina, ($P < 0.05$). Coincidiendo con lo reportado en la literatura^[94]

Los microsomas obtenidos contienen alrededor de 1.8 nmol de citocromo P-450/mg de proteína dato que es muy similar a lo determinado en los microsomas obtenidos de hígado de ratas pretratadas con fenobarbital y empleados en las reacciones de biotransformación por otros investigadores^[95-96]. En la figura 12, se puede observar que al determinar el contenido de citocromo P-450 mediante la absorción en el espectro visible a 450 nm no aparece ningún pico de absorbencia en 420 nm característico de la presencia de hemoglobina en los microsomas. La máxima absorbencia en 420 nm generalmente aparece cuando no se perfunde bien el hígado. Por lo tanto el espectro que se obtuvo carece de hemoglobina y es muy similar al reportado por Omura y Sato^[19].

Los materiales mesoporosos del tipo MCM-41 se han obtenido por síntesis hidrótermica con características como un área específica entre 800 y 950 m²/g cuando se sintetiza con y sin aluminio^[65,75]. Por lo tanto, el área específica de los materiales MCM-41 fue adecuada, ya que es superior a 1000 m²/g cuando se sintetizó con aluminio, en cambio cuando se sintetizó sin aluminio el área fue muy similar a lo que se reportado, lo cual puede ser debida a la incorporación del aluminio. Esto nos indica que existen una gran cantidad de poros en los que la enzima podría quedar atrapada.

Humpery^[97] y Díaz^[13] reportaron materiales MCM-41 con diámetros de poro de 3 a 4 nm para la inmovilización de enzimas como tripsina, papaína, citocromo c y peroxidasa, esta última tiene un peso molecular de 44 KD, una vez inmovilizada esta enzima tuvo poca actividad, debido a que fue poca la cantidad de enzima que se fijó en los poros, por esto se propuso el uso de MCM-41 con diámetros de poro mayores. Debido a que las enzimas del citocromo P-450 tienen un peso similar al de la peroxidasa, el diámetro de poro promedio obtenido fue de 5 nm y el diámetro de poro más grande en el cual se inmovilizó CIP2C9 y CIP2B4 fue de 5.5 nm por lo cual se consideró aceptable en base a lo reportado.

El patrón de difracción de rayos-X de los materiales MCM-41 sintetizados con diferente relación Si/Al, muestran que los materiales tienen una estructura ordenada ya que se obtuvo el pico que corresponde a la difracción en el plano (100), el cual es característico de este tipo de materiales, también se puede observar en la figura 13 que el orden disminuye conforme aumenta la cantidad de aluminio en el material y se va perdiendo la estructura tal como se ha reportado por Corma^[75,14].

Mediante microscopía electrónica de transmisión se corroboró que el material tiene un arreglo hexagonal y se pudo determinar la cantidad de poros de acuerdo a la escala empleada.

La adición de aluminio durante la síntesis de MCM-41 para su incorporación en la estructura sí modificó la acidez del mismo, ya que el material sin aluminio presentó una menor acidez en comparación con el de relación Si/Al de 8, por lo tanto al aumentar el contenido de aluminio en MCM-41 aumenta la acidez. Y debido a que la incorporación de aluminio aumenta los sitios ácidos de tipo Lewis incrementando la banda en 1449 cm^{-1} , tal y como lo demostró Jentys^[74], al realizar un estudio por IR de los grupos hidroxilos en donde bandas en 3745 , 3715 y 3530 cm^{-1} del espectro disminuyeron y se incrementaron las bandas en 1625 , 1600 , 1546 y 1449 cm^{-1} cuando se trataban con piridina, estas bandas han

servido para identificar la acidez en diversos soportes. También es importante mencionar que el material posee grupos hidroxilo (OH) debido a que se observa la banda en 1600 cm^{-1} por lo que la enzima podría formar puentes de hidrógeno.

La inmovilización de CIP2C9 y CIP2B4 en MCM-41 fue de 70-80 %, sin importar la relación Si/Al del material, ya que no se obtuvo diferencia estadísticamente significativa en la cantidad de enzima inmovilizada en los materiales MCM-41 con diferente diferente relación Si/Al. Esto podría ser debido a que en la inmovilización de la enzima no afecta la acidez, sino más bien es el espacio disponible y el diámetro de poro quienes tienen una participación determinante, ya que en todos los materiales se obtuvo un área y un diámetro de poro similar. Esto también podría ser debido a que la inmovilización se realizó a pH de 7.4; pH en el que la enzima se encuentra en su punto isoeléctrico, y por lo tanto la acidez del material no afecta.

Es importante señalar que la inmovilización de CIP2B4 en MCM-41 no modificó la estructura del material, ya que el patrón de difracción de rayos-X mostró el pico correspondiente al plano (100). En el patrón de difracción de rayos-X de MCM-41 con tan solo el proceso de inmovilización no se observó este pico ya que éste no mantuvo su estructura; por lo tanto se podría decir que CIP2B4 ayuda al material a mantener su arreglo hexagonal. Este comportamiento de los materiales cuando se les ha fijado una enzima ha sido descrito por Takahashi ^[65] cuando inmovilizó la peroxidasa en FSM-16 (material mesoporoso) y observó que el patrón de difracción de rayos-X se mantuvo.

Mediante la obtención de la isoterma de adsorción del CIP2B4 inmovilizada en MCM-41 se observó que la enzima se fija al material puesto que la cantidad de N_2 adsorbido es menor. Sugiriendo que la enzima podría estar tapando los poros ya que el área específica de la MCM-41 disminuye. En el trabajo realizado por Takahashi ^[65], también se muestra la disminución en la isoterma de adsorción antes y después de la inmovilización de la

peroxidasa. Esto también se observó cuando MCM-41 se empleó como soporte de heteropoliácidos y en el análisis estructural se presentó una gran disminución en el área específica indicando que algunos poros fueron bloqueados, Corma ^[14].

Ninguna de las enzimas en su forma libre empleadas en este trabajo tuvo actividad en ausencia de la citocromo P-450 reductasa, debido a que la enzima libre requiere del sistema completo (NADPH, citocromo P-450 reductasa) esto se ha reportado por muchos investigadores, como en el estudio de biotransformación de ácido valproico realizado por Rettie ^[3]. El hecho de que el citocromo P-450 no tenga actividad catalítica en ausencia de la citocromo P-450 reductasa es debido a que ésta le transfiere los electrones a partir del NADPH para que el citocromo P-450 pueda oxidar sustratos. Se transfiere un solo electrón debido a que las enzimas del citocromo P-450 no pueden captar los dos en un solo paso.

Cabe mencionar que el material mesoporoso sólo no presenta actividad catalítica para transformar al ácido valproico, aún en presencia de NADPH. Así mismo es importante señalar que el CIP2C9 inmovilizado en MCM-41 mantiene la tercera parte de su actividad aún sin citocromo P-450 reductasa, a diferencia de la enzima libre que sin la reductasa no tiene actividad catalítica, lo cual sugiere que el material MCM-41 podría transferir los electrones a la CIP2C9. Esto representa una gran ventaja, ya que si se emplea la enzima inmovilizada no será necesario el uso de citocromo P-450 reductasa para obtener la biotransformación del sustrato que aunque es moderada, ésta podría mejorarse si se modifica el proceso de inmovilización y el material.

La isoenzima CIP2B4 presenta mayor actividad que CIP2C9 por lo que se podría decir que es más específica para la conversión de ácido valproico. La actividad de CIP2B4 inmovilizada en MCM-41 con relación Si/Al =10 fue mayor que la enzima libre, esto puede ser debido a la presencia de cargas en el material; referido Sundbelg ^[98] quien reportó que la actividad de CIP2B4 fue menor en membranas que contenían fosfatidilcolina, en cambio aumentó cuando se introdujeron fosfolípidos con carga negativa,

sugiriendo que probablemente había un transporte de electrones más eficiente entre la citocromo P-450 reductasa y el CIP2B4. Es tal vez por esto, que CIP2B4 muestra una mayor actividad en el material con relación Si/Al=10 ya que éste presenta acidez de Bronsted.

La actividad de las enzimas inmovilizadas en MCM-41 con diferente relación Si/Al varía, lo que nos sugiere que la acidez del material influye en la actividad de las enzimas. Sin embargo existe un límite en la relación Si/Al que hace que disminuya la actividad de la enzima, ya que cuando éstas fueron inmovilizadas en MCM-41 con relación Si/Al=10 la actividad fue mayor que en MCM-41 relación Si/Al=8.

La actividad de estas isoformas en comparación con los microsomas obtenidos de hígado de ratas pretratadas con fenobarbital fue mayor debido a que las enzimas purificadas presentan una mayor actividad. O puede deberse a que en la reacción no se contó con un sistema regenerador de NADPH que es necesario cuando se utilizan microsomas como ha sido reportado por Manno^[82] y otros investigadores.

Mediante espectrometría de masas se identificaron en todas las muestras el ácido 3-hidroxi-2-propil- Δ^4 -pentenoico (3-OH- Δ^4 -VPA), el ácido 2-propil- Δ^4 -pentenoico (Δ^4 -VPA). Durante la biotransformación del ácido valproico por los microsomas se obtuvo también el 4-hidroxi-2-propil- Δ^4 -pentenoico (4-OH- Δ^4 -VPA), todos estos metabolitos han sido ampliamente encontrados durante la biotransformación del ácido valproico y el ácido 2-propil- Δ^4 -pentenoico (Δ^4 -VPA) con microsomas e isoformas libres en los estudios realizados por Rettenmeir^[91-92].

El hecho de que estas isoformas del citocromo P-450 mantengan su actividad una vez que han sido inmovilizadas y evaluadas en ausencia de citocromo P-450 reductasa, sugiere que el MCM-41 puede estar participando en la transferencia de los electrones^[99] sustituyendo a

la citocromo P-450 reductasa, lo cual genera un aporte importante en los procesos de biotransformación.

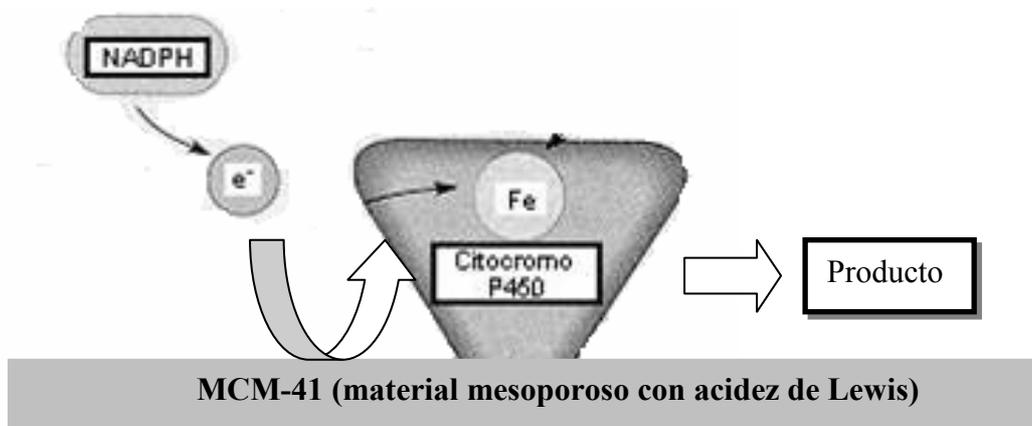


Figura 28. Transporte de electrones a partir del NADPH al citocromo P-450 por MCM-41

En la figura anterior se observa la transferencia de los electrones del NADPH al citocromo P-450 en ausencia de citocromo P-450 reductasa y en su lugar el material mesoporoso. Dado que el material presenta áidez de Lewis esto sugiere que dicho material puede captar los electrones y transferirlos quizá al citocromo P-450. Sin embargo, la disminución en la actividad puede ser debido a que enzimas son catalizadores más rápidos que los catalizadores inorgánicos y la transferencia de los electrones puede estar ocurriendo más lentamente.

CONCLUSIONES.

CIP2C9 y CIP2B4 se fijaron a MCM-41 y mantuvieron sus propiedades catalíticas.

La incorporación de aluminio en MCM-41 no influye en la inmovilización de CIP2C9 y CIP2B4 pero si en la actividad catalítica.

La actividad catalítica de CIP2C9 y CIP2B4 inmovilizadas fue mayor que la de los microsomas obtenidos de hígado de rata pretratadas con fenobarbital.

CIP2C9 y CIP2B4 tuvieron mayor actividad cuando fueron inmovilizadas en MCM-41 con relación Si/Al=10 lo que sugiere que la acidez de Bronsted contribuye, a la estabilidad de las enzimas, ya que fue el único material que la presentó.

La sola inmovilización de CIP2C9 y CIP2B4 en MCM-41 mantuvo la actividad catalítica, aún en ausencia de citocromo P-450 reductasa, lo que sugiere que el material podría estar participando en la transferencia de electrones.

PROPUESTAS

Estudiar si la inmovilización de isoformas de citocromo P-450 a diferentes valores de pH, influye en la cantidad de enzima inmovilizada.

Con el objeto de determinar si el material mesoporoso participa en la transferencia de electrones sería interesante analizar mediante Resonancia electro paramagnética (EPR) diversas enzimas inmovilizadas en MCM-41 con áidez de Bronsted y Lewis.

Realizar pruebas con la enzima inmovilizada en presencia de citocromo P-450 reductasa para determinar si la actividad se incrementa.

Emplear estos materiales para la inmovilización de otras proteínas como los anticuerpos, que pueden tener una gran utilidad en el reconocimiento de diversos antígenos en las reacciones antígeno-anticuerpo.

BIBLIOGRAFIA.

1. Guengerich FP. *Cytochrome P-450 oxidations in the generation of reactive electrophiles: epoxidation and related reactions* Arch. Biochem. Biophys., **409** (2003): 59.
2. Mansuy D. *The great diversity of reactions catalyzed by cytochrome P-450*, Comparative Biochemistry and Physiology part C, **121** (1998): 5.
3. Rettie AE, Rettenmeir AW, Howald WN, Baillie TA. *Cytochrome P-450 catalyzed formation of Δ^4 -VPA a toxic metabolite of valproic Acid.*, Science, **235** (1986): 890.
4. Abu JM, Fisher BM, Korzekwa R, Gonzalez J, Rettie AE. *Human CYP2C9 and CYP2A6 mediate formation of the hepatotoxin 4-ene-valproic acid.*, J. Phar. Exp. Ther., **283** (1997): 698.
5. Rettie AE, Korzekwa KR, Lawrence RF, Eddy AC, Aoyama T, Gelboin HV, Gonzalez FJ, Trager WF. *Hydroxylation of warfarin by human cDNA-expressed cytochrome P-450: a role for P4502C9 in the etiology of (S)-warfarin drug interactions*, Chem. Res. Toxicol., **5** (1992): 54.
6. Veronese ME, Mackenzie PI, Doecke CJ, Mcmanus ME, Miners JO, Birkett DJ. *Tolbutamide and phenytoin hydroxylations by cDNA-expressed human liver cytochrome P450 2C9*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **175** (1991): 1112.
7. Hauck RS, Nau H. *Asymmetric synthesis and enantioselective teratogenicity of 2-n-propyl-4-pentenoic acid (4-en-VPA), an active metabolite of the anticonvulsant drug, valproic acid*, Toxicol. Letters, **49** (1989): 41.
8. Lehman JP, Ferrin L, Fenselau C, Yost GS. *Simultaneous immobilization of cytochrome P-450 and glucuronyltransferase for synthesis of drug metabolites*, Drug Metab. Dispos., **9** (1980): 15.
9. Salguero PF, Merino CG, Bunch AW. *Effects of immobilization on the activity of rat hepatic microsomal cytochrome P450 enzymes*, Enzyme Microb. Technol., **15** (1993): 100.

10. Lamb SB, Lamb DC, Kelly SL, Stuckey DC. *Cytochrome P450 immobilization as a route to bioremediation/biocatalysis*, FEBS Letters, **431** (1998): 343.
11. Taylor M, Lamb DC, Cannell RJP, Dawson MJ, Kelly SL. *Cofactor recycling with immobilized heterologous cytochrome P-450 105D1 (CYP105D1)*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **279** (2000): 708.
12. Kresge CT, Leonowicz ME, Roth WJ, Vartuli JC, Beck JS. *Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid crystal templete mechanism*, Nature, **359** (1992): 710.
13. Díaz JF, Balkus Jr. *Enzyme immobilization in MCM-41 molecular sieves*, J. Mol. Catal. B: Enzymatic., **2** (1996): 115.
14. Corma A. *Microporous to mesoporous molecular sieves materials and their use in catalysis*, Chem. Rev., **97** (1997): 2373.
15. Arroyo M. *Immobilizes enzymes: Theory methods of study and applications*, Ars. Pharma., **39** (1998): 23.
16. Axelrod J. *The enzymatic demethylation of ephedrine*, J. Pharma., **114**: 430 , 1955.
17. Brodie B, Axelrod J, Copper JR, Gaudette L. *Detoxycation of drugs and other foreing compounds by liver microsomes*, Science, **21** (1955): 603.
18. Klingenberg M. *Pigments of rat liver microsomes*, Arch. Biochem. Biophys., **75** (1958): 376.
19. Omura T, Sato R. *The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature*, J. Biol. Chem., **239** (1964): 2370.
20. Omura T, Sato R. *The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes II. Solubilization, purification and propertie*, J. Biol. Chem., **239** (1964): 2379.
21. Imai Y, Sato R. *Evidence for two forms of P-450 hemoprotein in hepatic microsomal membranes*, Biochem. Biophys. Res Commun., **23** (1966): 5.
22. Narasimhulu S, Cooper DY, Rosenthal O. *Spectrophotometric properties of a trtoclarified steroid 21 hidroxylase of adrenocortical microsomes*, Life Sci., **4** (1965): 2101.

23. Remmer H, Schenkman J, Estrabrook RW, Sasame H, Grette J, Narasimhulu S, Cooper DY, Rosenthal O. *Drug interaction with hepatic microsomal cytochrome*, Mol. Pharmacol., **2** (1966): 187.
24. Schenkman JB, Remmer H, Estrabrook RW. *Spectral studies of drug interactions with hepatic microsomal cytochrome*, Mol. Pharmacol., **3** (1967): 113.
25. Imai Y, Sato R. *Substrate interaction with hydroxylase sistem in liver microsomes* Biochem. Biophys. Res Commun., **22** (1966): 620.
26. Cammer W, Schenkman JB, Estrabrook RW. *Measurments of substrate interaction with cytochrome P-450*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **23** (1966): 264.
27. Kuriyama YF, Kami YM, Kawajiri K, Sogawa K, Muramatsu M. *Primary structure of a cytochrome P-450 codig nucleotide sequence of phenobarbital-inducible*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79** (1982): 2793.
28. Kawajiri K, Gotoh O, Sogawa K, Tagashira Y, Muramatsu M, Kuriyama YF. *Coding nucleotide sequence of 3-methylcholantrene inducible cytochrome P-450 cDNA from rat liver* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **81** (1984): 1649.
29. Sogawa K, Gotoh O, Kawajiri K, Harada T, Kuriyama YF. *Complete nucleotide sequence of methylcholantrene-inducible cytochrome P-450(P-450d) gene in the rat*, J. Biol. Chem., **260** (1985): 5026.
30. Suwa Y, Muzukami Y, Sogawa K, Kuriyama YF. *Gene structure of a mejor form of phenobarbital inducible cytochrome P-450 in rat liver*, J. Biol. Chem., **260** (1985): 7980.
31. Devlin TM. *Textbook of Biochemistry with clinical correlations*, Wiley-Liss, (1997): 982.
32. Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsales IC, Gotoh O, Okuda K, Nebert DW. *The P-450 superfamily:update on new sequences, gene mapping accesion numbers, early trivial names of enzymes and nomenclature DNA*, DNA Cell. Biol., **12** (1993): 1.

33. Komori M, Higami A, Imai Y, Imaoka S, Funae Y. *Purification and characterization of a form of P-450 from horse liver microsomes*, J. Biochem., **114** (1993): 445.
34. García MPL, Dansette PM, Valadon P, Amar C, Beaune PH, Guengerich FP, Mansuy D. *Human-liver cytochromes P-450 expressed in yeast as tool for reactive-metabolite formation studies: Oxidative activation of tienilic acid by cytochromes P-450C9 and CIP2C10*, Eur. J. Biochem., **213** (1993): 223.
35. Waxman DJ, Walsh C. *Cytochrome P-450 isozyme I from phenobarbital-induced rat liver purification, characterization and interactions with metyrapone and cytochrome b5*, Biochemistry, **22** (1983): 4846.
36. Hardwich JP, Gonzalez FJ, Kasper CB. *Transcriptional regulation of rat liver epoxide hydratase, NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase, and cytochrome P450B genes by phenobarbital*, J. Biol. Chem., **258** (1983): 8081.
37. Meehan RR, Forrester LM, Stevenson K, Hastie ND, Buchmann A, Kunz H, Wolf CR. *Regulation of phenobarbital-inducible cytochrome P-450s in rat and mouse liver following dexamethasone administration and hypophysectomy*, Biochem., **254** (1988): 789.
38. Omiecinski CJ. *Tissue-specific expression of rat mRNAs homologous to cytochromes P-450b and P-450e*, Nucleic. Acids. Res., **14** (1986): 1525.
39. Lilienblum W, Platt KL, Schirmer G, Oesch F, Bock KW. *Regioselectivity of rat liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities toward phenols of benzo(a)pyrene and dibenz(a)anthracene*, Mol. Pharmacol., **32** (1987): 173.
40. Pickett CB, Lu AYH. *Glutathione S-transferases: gene structure, regulation, and biological function*, Annu. Rev. Biochem., **58** (1989): 743.
41. Dunn TJ, Koleski AJ, Lindahl R, Pitot HC. *Phenobarbital-inducible aldehyde dehydrogenase in the rat. cDNA sequence and regulation of the mRNA by phenobarbital in responsive rats*, J. Biol. Chem., **264** (1989): 13057.

42. Nelson SD, Harvinson PJ. *Roles of cytochromes P-450 in chemically induced cytotoxicity in mammalian Cytochromes P-450*, F.P. Guengerich, Ed. CRC Press, Boca Raton Vol. 2 (1987) chap. 2.
43. Lau SS, Monks TJ, Gillette JR. *Multiple reactive metabolites derived from bromobenzene*, Drug Metab. Dispos., **12** (1984): 291.
44. Jover R, Ponsoda X, Gomez JL, Castell JV. *Cocaine hepatotoxicity: two different toxicity mechanisms for phenobarbital-induced and non induced rat hepatocytes*, Biochem. Pharmacol., **46** (1993): 1967.
45. Boelsteril UA, Lanzotti A, Goldlin C, Oertle M. *Identification of cytochrome P-450IIB1 as a cocaine-bioactivating isoform in rat hepatic microsomes and in cultured rat hepatocytes*, Drug Metab. Dispos., **20** (1992): 96.
46. Kamataki T, Neal RA. *Metabolism of diethyl-p-nitrophenyl phosphorothionate (parathion) by a reconstituted mixed-function oxidase enzyme system: studies of the covalent binding of the sulfur atom*, Mol. Pharmacol., **12** (1976): 933.
47. Bayer E, Hill HAO, Roder A, Williams RJP. *The interaction between haem-iron and thiols*, Chem. Commun., **109** (1969).
48. Poulos TL, Finzel BC, Howard AJ. *Crystal structure of substrate free pseudomonas putida cytochrome*, Biochemistry, **25** (1986): 5314.
49. McMurry TJ, Groves JT, Montellano O. *Cytochrome P-450*, **217** (1986): 1.
50. Groves JT, Watanabe Y. *Reactive iron porphyrin derivatives related the catalytic cycles of cytochrome P-450 and peroxidase studies of oxigen activation*, J. Am . Chem. Soc., **110** (1988): 8433.
51. White RE, Coon MJ. *Oxigen Activation by cytochrome P-450*, Annu. Rev. Biochem., **49** (1980): 315.
52. Egawa T, Ogura T, Makino R, Kitagawa T. *Observation of O-O stretching raman band for cytochrome P-450cam under catalytic conditions*, J. Biol. Chem., **266** (1991): 10246.
53. Guengerich FP. *Enzimatic oxidations of xenobiotic chemicals*, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., **25** (1990): 97.

54. Guengerich FP. *Cytochrome P-450 enzymes*, *American Scientist*, **81** (1993): 440 .
55. Nebert DW, Nelson DR, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsales IC, Johnson EF, Kemper B, Levin W, Phillips IR, Waterman MR. *The P-450 superfamily: up date listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci DNA.*, *DNA*, **8** (1989): 1.
56. Murray M, Reidy GF. *Selectivity in the inhibition of mammalian cytochromes P-450 by chemical agents.*, *Pharmacol. Rev.*, **42** (1990): 85.
57. Estabrook RW, Werringloer J. *Microsomes and Drug Oxidations*, V. Ullrich, A. Hildebrandt, R.W. Estabrook, A.H. Conney, Pergamon Press, Oxford, (1977): 748.
58. Goeptar AR, Scheerens H, Vermeulen NPE. *Oxygen and xenobiotics reductase activities of cytochrome P-450.*, *Crit. Rev. Toxicol.*, **25** (1995): 25.
59. Sundberg M, Hagbjork AL. *On the significance of the cytochrome P-450 dependent hydroxyl radical mediated oxygenation mechanism.*, *Xenobiotica*, **12** (1982): 673.
60. Slater TF, Sawyer BC. *The stimulatory effects of carbon tetrachloride on peroxidative reactions in rat liver fraction in vitro.*, *Biochem. J.*, **123** (1971): 815.
61. Rettie AE, Boberg M, Rettenmeir AW, Baillie TA. *Cytochrome P-450 catalyzed desaturation of valproic acid in vitro.* *J. Biol. Chem.*, **263** (1988): 13733.
62. Rettie AE, Eddy AC, Heimark LD, Gibaldi M, Trager WF. *Drug Metab. Dispos.*, **17** (1989): 265
63. Rettie AE, Sheffels PR, Korzekwa KR, Gonzalez FJ, Philpot R.M, Baillie TA. *CYP4 isozyme specificity and the relationship between ω -hydroxylation and terminal desaturation of valproic acid.*, *Biochem.*, **34** (1995): 7889.
64. Rettie AE, Boberg M, Rettenmeir AW, Baillie TA. *Cytochrome P-450 catalyzed desaturation of valproic acid in vitro.* *J. Biol. Chem.*, **263** (1988): 13733.
65. Takahaishi H, Sasahi BLT, Miyaza C, Kajno KT, Inagaki S. *Immobilized enzymes in ordered mesoporous silica materials and improvement of their stability and catalytic activity in an organic solvent.*, *Microp. and Mesop. Mater.*, **44** (2001): 755.
66. Delannay F, Delmon B. "Methods of catalyst characterization and overview", New York and Basel, (1995): cap. 1.

67. Huo Q, Margolese DI, Stucky GD. *Surfactant control of phases in the synthesis of mesoporous silica based materials*, Chem. Mater., **8** (1996): 1147.
68. Gregg SJ, Sing KSW. *Adsorption, Surface Area and Porosity*, 2nd edn, Academic Press, London. (1995).
69. Wheeler A. *Catalysis*, Vol. II., Rheinhold, New York (1955).
70. Langmuir I. *The constitution and fundamental properties of solids and liquids part I. Solids*, J. Am. Chem. Soc., **38** (1916): 2221.
71. Ciesla U, Scuth F. *Ordered mesoporous materials*, Microp. and Mesop. Mater. **27** (1999): 131.
72. Grun M, Unger K, Matsumoto A, Tsutsumi K. *Novel pathways for the preparation of mesoporous MCM-41 materials control of porosity and morphology*. Microp. and Mesop. Mater., **27** (1999): 207.
73. Barret EP, Joyner G, Halenda PA. *The determination of pore volume and area distributions in porous substances I. Computations from nitrogen Isotherms*, J. Amer. Chem. Soc., **73** (1951): 373.
74. Jentys A, Kleestorfer K, Vinek H. *Concentration of surface hidroxyl groups on MCM-41*, Microp. and Mesop. Mater., **27** (1999): 321.
75. Hunger M, Schenk U, Breuninger M, Glaser R, Weitkamp J. *Charaterization of the acid sites in MCM-41 type materials by spectroscopic and catalytic techniques.*, Microp. and Mesop. Mater. **27** (1999): 261.
76. Blum Z, Hyde ST. *Solid-state structures and liquid crystals as ordering matrices for proteins.*, Acta Chem. Scand, **48** (1994): 88.
77. Kinsel MEG, Jimenez VI, Washnon L, Balkus KJ. *Mesoporous molecular sieves immobilized enzymes*, Mesopor. Molecular sieves. **117** (1998): 373.
78. Zhao DY, Feng JT, Huo QS, Melosh N, Fredrickson GH, Chmelka BF, Stucky GD. *Nonionic triblock and star diblock copolymer and oligomeric surfactant sybtheses of higly ordered hydrothermally stable, mesoporous silica structures*, J. Am. Chem. Soc., **120** (1998): 6024.

79. Cesteros Y, Haller GL. *Several factor affecting Al-MCM-41 synthesis.* Microp. and Mesop. Mater., **43** (2001): 171.
80. Eimer G, Pierella L, Monti G, Anunziata O. *Preparation and characterization of aluminium conteining MCM-41,* Catal. Commun., **4** (2003): 118.
81. Cheng LY, Ping Z, Chuah GK, Jaenicke S, Simon G. *A comparasion of post-synthesis alumination and sol gel synthesis of MCM-41 with high framework aluminum content.,* Microp. and Mesop. Mater., **27** (1999): 231.
82. Manno M, Cazzaro S, Rezzadore M. *The mechanism of the suicidal reductive inactivation of microsomal cytochrome P-450 by halotane,* Arch. Toxicol., **65** (1990): 191.
83. Kamath SA, Kummerow FA, Nayaran KA. *A simple procedure for the isolation of rat liver microsomes,* Febs Letters, **17** (1971): 90.
84. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal RJ. *Protein measurement with the folin phenol reagent,* J. Biol. Chem. **193** (1951): 265.
85. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GI, Mallia AK, Garther FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goecke NM, Olson BJ, Klenk DC. *Measurement of protein using bianchoninic acid.,* Anal. Biochem., **150** (1985): 76.
86. Wiechelman KJ. *Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation.,* Anal. Biochem., **175** (1988): 231.
87. Budzikiewicz H, Djerassi C, Williams DH. *Mass Spectrometry of Organic Compounds,* Holden-Day, San Francisco (1967): 476.
88. Goodman SI, Markey SP. *Diagnosis of organic acidemias by gas chromatograpy-mass spectrometry.* In "Laboratory and Research methods in biology and medicine" (1981).
89. Williams PA, Cosme J, Ward A, Angove HC, Vinkovic DM, Jhotl H. *Crystal structure of human cytochrome P-450 2C9 with bound warfarin,* Nature, **424** (2003): 464.
90. Tarr GE, Blanck SD, Fujita VS, Coon MJ. *Complete amino acid sequence and predicted membrane topology of phenobarbital-induced cytochrome P-450 (isozyme 2) from rabbit liver microsomes,* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80** (1983): 6552.

91. Rettenmier AW, Gordon WP, Prickett KS, Levy RH, Baillie TA. *Biotransformation and pharmacokinetics in the rhesus monkey of 2-n-propyl-4-pentenoic acid, a toxic metabolite of valproic acid*, Drug Metab. Dispos., **14** (1986): 454.
92. Rettenmier AW, Prickett KS, Gordon WP, Bjorge SM, Chang S, Levy RH, Baillie TA. *Studies on the biotransformation in the perfused rat liver of 2-n-propyl-4-pentenoic acid, a metabolite of the antiepileptic drug valproic acid.*, Drug Metab. Dispos., **13** (1984): 81.
93. Fisher M, Zheng Y, Rettie A. *Positional specificity of rabbit CYP4B1 for ω -hydroxylation of short-medium chain fatty acids and hydrocarbons*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **248** (1998): 352.
94. Brouwer KLR, Kostenbauder HB, McNamara PJ, Bloun RA. *Phenobarbital in the genetically obese zucker rat. II. In vivo and in vitro assessments of microsomal enzyme induction*. J. Pharmacol. Exp. Ther., **231** (1984): 654.
95. Jones CR, Lubet RA, Henneman JR, Nims RW. *Dose-response relationships for cytochrome P450 induction by phenobarbital in the cotton rat (*Sigmodon hispidus*)*, Comp. Biochem and Physiology Part C., **121** (1998): 197.
96. Qualls CW, Lubet RA, Lochmiller RL, Elangbam CS, Lish JW, Nims RW. *Cytochrome P450 induction in feral cricetid rodents: a review of field and laboratory investigations*, Comp. Biochem. and Physiology Part C., **121** (1998) 55.
97. Yiu HHP, Wright PA, Botting NP. *Enzyme immobilization using siliceous mesoporous molecular sieves*, Microp. and Mesop. Mater., **44** (2001): 763.
98. Sundberg MI, Hagbjork AL, Ueng YF, Yamazaki, Guengrich F.P. *High rates of substrate hydroxylation by human cytochrome P-450 3A4 in reconstituted membranous vesicle; influence of membrane charge*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **221** (1996): 318.
99. Tang Y, Dave BC. *Bioelectronic Glasses: electrical addressability of sol-gel immobilized biomolecules*, Advances Materials, **10** (1998): 1536.