

ESTUDIO CINÉTICO DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE MATERIALES COMPUESTOS DE POLIURETANO POROSO/HIDROXIAPATITA

Norma A. Rangel Vázquez^{1}, Hugo De Alva Salazar¹, Jorge Romero García²,
José Rivera Armenta¹, Edgar García-Hernández³, René Salgado-Delgado³*

1) División de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de Ciudad Madero. Juventino Rosas y Jesús Urueta S/N Col. Los Mangos, CP 89440, Ciudad Madero, Tamaulipas, México. Correo electrónico: doc_aurea@yahoo.com.mx

2) Centro de Investigación de Investigación en Química Aplicada. Blvd. Enrique Reyna Herosillo #140, Saltillo, Coahuila, México.

3) División de Estudios de Posgrado e Investigación y Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica del Instituto Tecnológico de Zacatepec. Calzada Instituto Tecnológico 27, Col. Ampliación Plan de Ayala, CP 62780, Zacatepec, Morelos, México

Recibido: Junio de 2007; Aceptado: Septiembre de 2007

RESUMEN

En esta investigación se estudió la cinética de la hidrólisis enzimática de los compositos mezclados y soportados de poliuretano poroso/hidroxiapatita. Las enzimas empleadas para la hidrólisis fueron la papaína, ureasa y esterasa debido a que estas enzimas han presentado alguna especificidad sobre algún tipo de enlace en el poliuretano. La cinética fue estudiada mediante la aplicación diversas ecuaciones cinéticas para orden 1, 1,5 y 2, respectivamente, y se corroboró el orden de reacción mediante la simulación con el software HYPER, el cual correspondió al primer orden de reacción, debido a que las constantes de velocidad son muy similares a diferentes periodos de tiempo.

Palabras claves: cinética, materiales reforzados, enzimas, hidrólisis, poliuretano poroso/hidroxiapatita.

ABSTRACT

In this research the kinetics of the enzymatic hydrolysis of the blended and supported composites of porous polyurethane/hydroxyapatite were studied. The enzymes used were the papaine, urease and esterase because these enzymes have presented some specificity on some bond type in the polyurethane. The kinetics was studied by means of the application different kinetic equations for order 1, 1.5 and 2, respectively, and corroborates the reaction order by means of the simulation with the HYPER software, which corresponded to the first reaction order, because the speed constants were very similar to different periods of time.

Keywords: Kinetics, composite, enzymes, hydrolysis, polyurethane/hydroxyapatite.

1. INTRODUCCIÓN

Las enzimas, en los sistemas biológicos constituyen las bases de las complejas y variadas reacciones que caracterizan los fenómenos vitales [1] y algunas de ellas catalizan la hidrólisis de los materiales, la cual se produce cuando el polímero tiene principalmente enlaces inestables y algún grado de hidrofilia. La característica principal de una reacción catalizada enzimáticamente es que ocurre en un lugar específico del enzima, es decir, el *sitio activo*. La molécula fijada en el sitio activo y sobre la que actúa el enzima se denomina *sustrato*. La interacción de la enzima con el sustrato (reactivo), para formar un complejo intermediario, posteriormente, la descomposición del complejo intermediario para formar los productos y regenerar la enzima [2].

Por otro lado, uno de los enfoques utilizados para el desarrollo de materiales a ser potencialmente utilizados como sustitutos de hueso, es por medio de materiales compuestos tipo esponja con una estructura celular interconectada [3,4].

Después de la obtención de materiales biocompatibles, es necesario efectuar pruebas de estabilidad “*in vitro*” o “*in vivo*” para diseñar sus aplicaciones futuras. Debido a esto, en el presente trabajo se describe la comparación de la hidrólisis enzimática de materiales compuestos hechos con poliuretano e hidroxiapatita, en dos modalidades, mezclada y soportada, con la finalidad de analizar las diferencias en el método de obtención de estos biomateriales y su estabilidad relativa.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Pruebas de hidrólisis enzimática de los materiales compuestos. En diferentes soluciones tampón se adicionó cada enzima en concentraciones de 0,1% de la enzima especificada. Los materiales reforzados (“*composites*”) de 0,1 g se colocaron en viales previamente esterilizados, agregando posteriormente 15 mL de la solución tampón con la enzima. Posteriormente se incubaron los viales a temperaturas que se muestran en la Tabla 1 (temperaturas de reacción), siendo el tiempo de incubación de 15 días [5].

Tabla 1. Características de las diferentes enzimas utilizadas.

Nombre comercial	Papaína	Ureasa	Esterasa
Enzima	Proteasa	Hidrolasa	Hidrolasa
Fuente	Látex de papaya	Habas	Hígado de cerdo
pH	6	8	8
Temperatura de reacción (°C)	60	25	25
Marca	Aldrich	Fluka	Aldrich

2.2. Cinética enzimática mediante ecuaciones cinéticas. En la Tabla 2 se muestran las ecuaciones que representan los órdenes de reacción (1, 1,5 y 2) para la hidrólisis enzimática de los materiales reforzados mezclados y soportados con 15 y 30% de hidroxiapatita, respectivamente. Además, para corroborar el orden de reacción se llevó a cabo la aplicación del método diferencial y la simulación mediante el software *Hyper* [6]. El *Hyper* es un programa de aplicación biológica, el cual se emplea para determinar las constantes cinéticas de las reacciones enzimáticas. Realiza análisis cuantitativos de la actividad enzimática así como cálculos de *Michaelis - Menten*.

Tabla 2. Ecuaciones representativas de los órdenes de reacción para estudios cinéticos.

Orden 1	Orden 1,5	Orden 2
$\ln [S] = \ln [S_0] - K t$	$\frac{1}{[S]^{0.5}} = \frac{1}{[S_0]^{0.5}} - \frac{K.t}{2}$	$\frac{1}{[S]} = \frac{1}{[S_0]} - \frac{K.t}{2}$

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Porcentajes de la hidrólisis enzimática de los materiales compuestos. En las Tablas 3 a 5 se muestran los pesos de los materiales reforzados mezclados y soportados con 15 y 30% de hidroxiapatita, a diferentes tiempos de la hidrólisis, mediante las enzimas papaína, ureasa y esterasa.

Tabla 3. Pesos de los materiales reforzados después de la hidrólisis mediante la enzima papaína.

Materiales reforzados	Día 0 g	Día 5 g	Día 10 g	Día 15 g
Mezclados 15%	1	0,9770	0,9502	0,9403
Mezclados 30%	1	0,9809	0,9624	0,9568
Soportados 15%	1	0,9788	0,9594	0,9524
Soportados 30%	1	0,9815	0,9721	0,9692

Tabla 4. Pesos de los materiales reforzados después de la hidrólisis mediante la enzima ureasa.

Materiales reforzados	Día 0 g	Día 5 g	Día 10 g	Día 15 g
Mezclados 15%	1	0,9787	0,9588	0,9497
Mezclados 30%	1	0,9832	0,9744	0,9682
Soportados 15%	1	0,9811	0,9745	0,9695
Soportados 30%	1	0,9833	0,9780	0,9712

Tabla 5. Pesos de los materiales reforzados después de la hidrólisis mediante la enzima esterasa.

Materiales reforzados	Día 0 (g)	Día 5 (g)	Día 10 (g)	Día 15 (g)
Mezclados 15%	1	0,9806	0,9624	0,9529
Mezclados 30%	1	0,9852	0,9778	0,9694
Soportados 15%	1	0,9834	0,9752	0,9719
Soportados 30%	1	0,9868	0,9807	0,9771

3.2. Análisis de las ecuaciones cinéticas de los materiales compuestos.

3.2.1. *Enzima papaína.* En las figuras 1 y 2, en donde se observan las ecuaciones de la línea recta, de la cuales se obtienen la constante de velocidad de reacción que es representada para los ordenes uno y dos por el valor de las pendientes, mientras que para el orden 1,5 la velocidad de reacción es igual a dos veces el valor de la pendiente, además se presentan los coeficientes de las correlaciones de reacción correspondientes a los compositos mezclados y soportados con 15 y 30% de hidroxiapatita, respectivamente, mediante la enzima papaína, determinándose que la hidrólisis se ajusta al orden 1 debido a que las correlaciones no presentan cambios significativos.

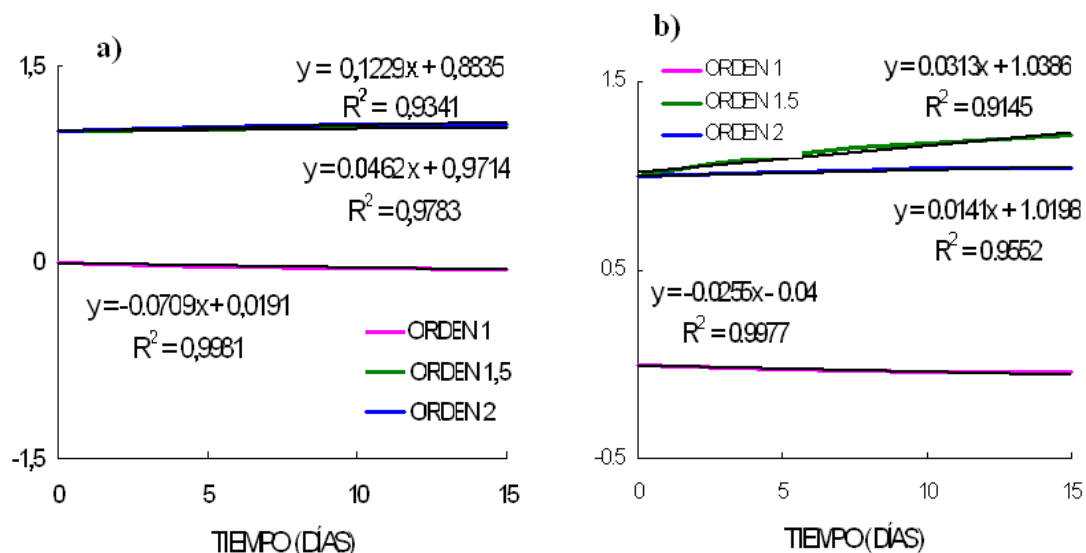


Figura 1. Gráficas de las ecuaciones de la línea recta y coeficientes de las correlaciones de los materiales reforzados mezclados, en donde (a) 15% y (b) 30% de hidroxiapatita mediante la enzima papaína a diferentes ordenes de reacción enzimática.

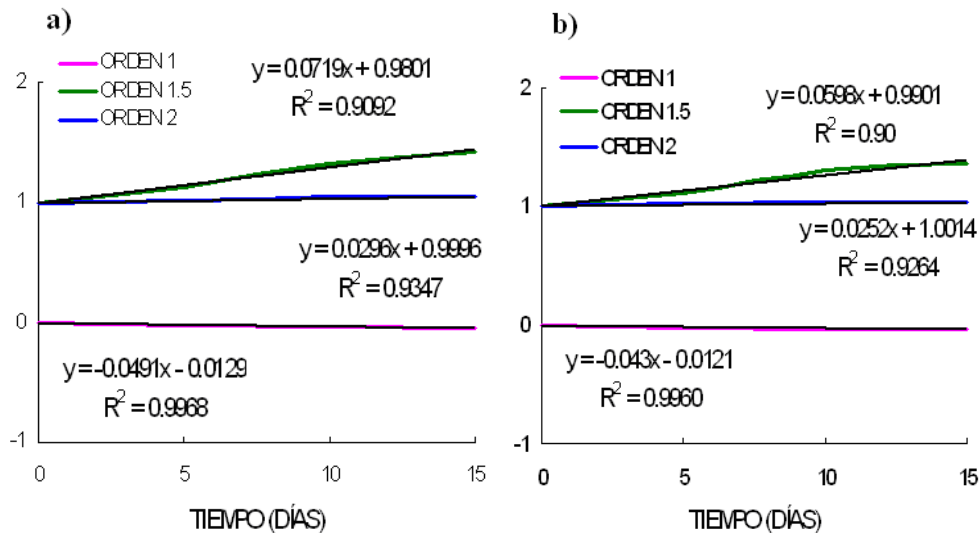


Figura 2. Gráficas de las ecuaciones de la línea recta y coeficientes de las correlaciones de los materiales reforzados soportados, en donde (a) 15% y (b) 30% de hidroxapatita mediante la enzima papaína a diferentes ordenes de reacción enzimática.

3.2.2. Enzima ureasa. En las Figuras 3 y 4, en las cuales se aprecian las diversas ecuaciones de la línea recta, a través de las cuales se obtienen las constante de velocidad de reacción que es representada para los ordenes uno y dos por el valor de las pendientes, mientras que para el orden de 1,5 la velocidad de reacción es igual a dos veces el valor de la pendiente, además se presentan los coeficientes de las correlaciones de reacción correspondientes a los materiales reforzados mezclados y soportados con 15 y 30% de hidroxapatita, respectivamente, determinándose que el mecanismo de reacción para la enzima ureasa corresponde al orden 1 debido a que las correlaciones no presentan cambios significativos en comparación con los órdenes de 1,5 y 2, respectivamente.

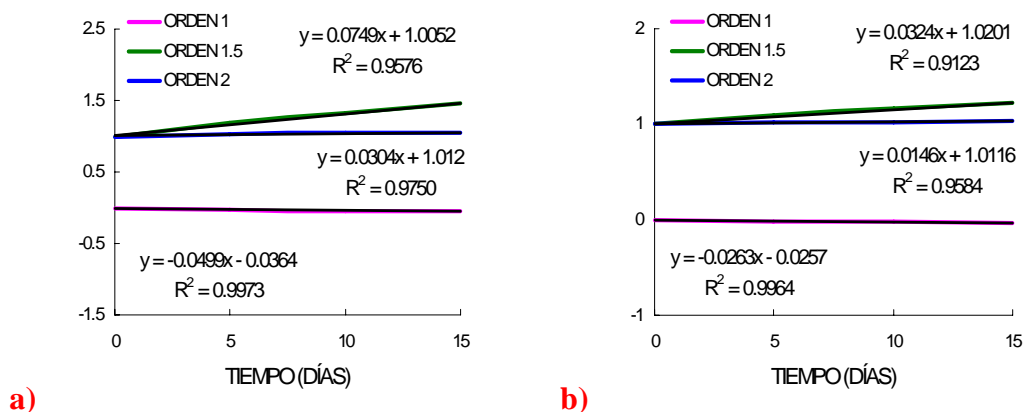


Figura 3. Gráficas de las ecuaciones de la línea recta y coeficientes de las correlaciones de los materiales reforzados mezclados, en donde (a) 15% y (b) 30% de hidroxapatita mediante la enzima ureasa a diferentes órdenes de reacción enzimática.

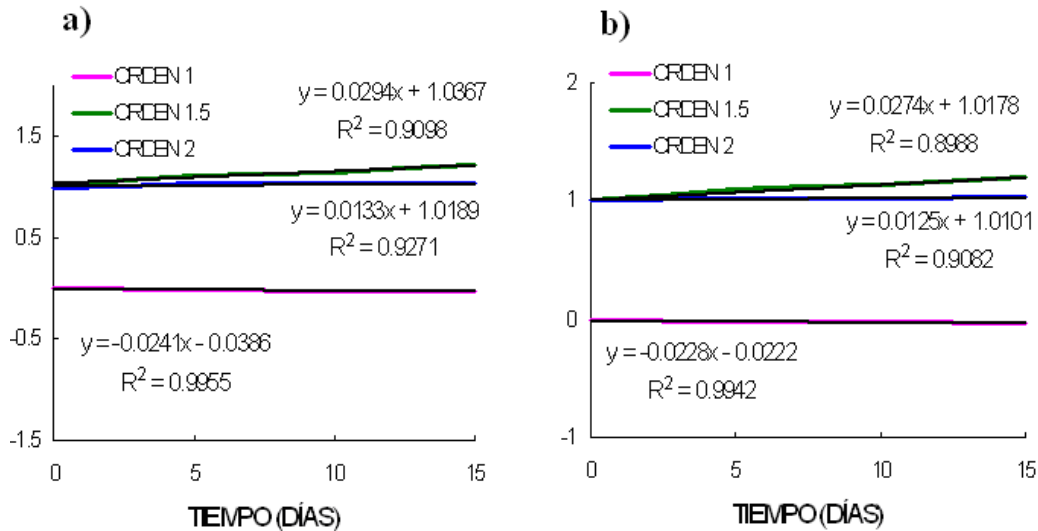


Figura 4. Gráficas de las ecuaciones de la línea recta y coeficientes de las correlaciones de los materiales reforzados soportados, en donde (a) 15% y (b) 30% de hidroxapatita mediante la enzima ureasa a diferentes órdenes de reacción enzimática.

3.2.3. Enzima esterasa. En las Figuras 5 y 6, en las cuales se observan las diversas ecuaciones de la línea recta, en donde las constante de velocidad de reacción es representada para los ordenes uno y dos por el valor de las pendientes, mientras que el valor de la velocidad de reacción para el orden de 1,5 es igual a dos veces el valor de la pendiente, además se aprecian los coeficientes de las correlaciones de reacción correspondientes a los materiales reforzados mezclados y soportados con 15 y 30% de hidroxapatita, respectivamente, con los que se determina que el mecanismo de reacción para la enzima esterasa es de orden 1, esto debido a que las correlaciones no presentan cambios significativos en comparación con los órdenes de 1,5 y 2 que si disminuyen considerablemente.

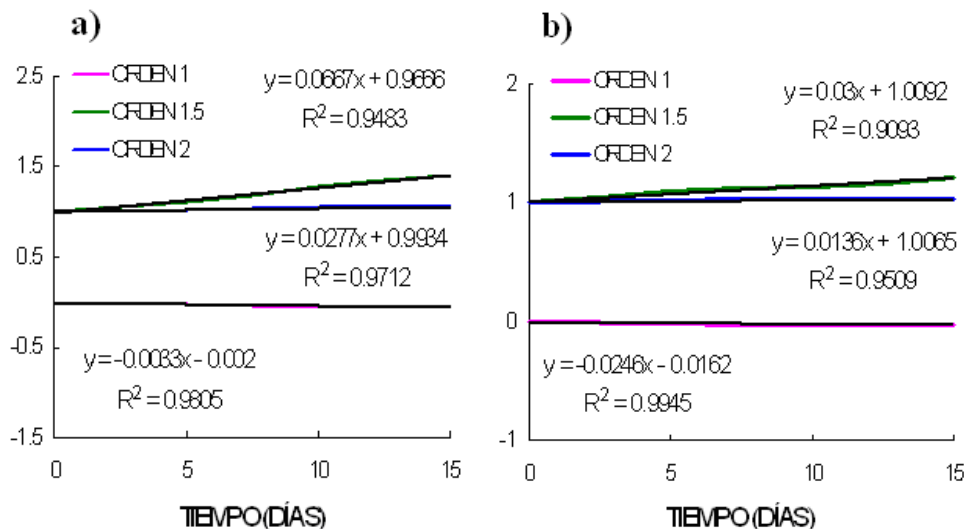


Figura 5. Gráficas de las ecuaciones de la línea recta y coeficientes de las correlaciones de los materiales reforzados mezclados, en donde (a) 15% y (b) 30% de hidroxapatita mediante la enzima esterasa a diferentes órdenes de reacción enzimática.

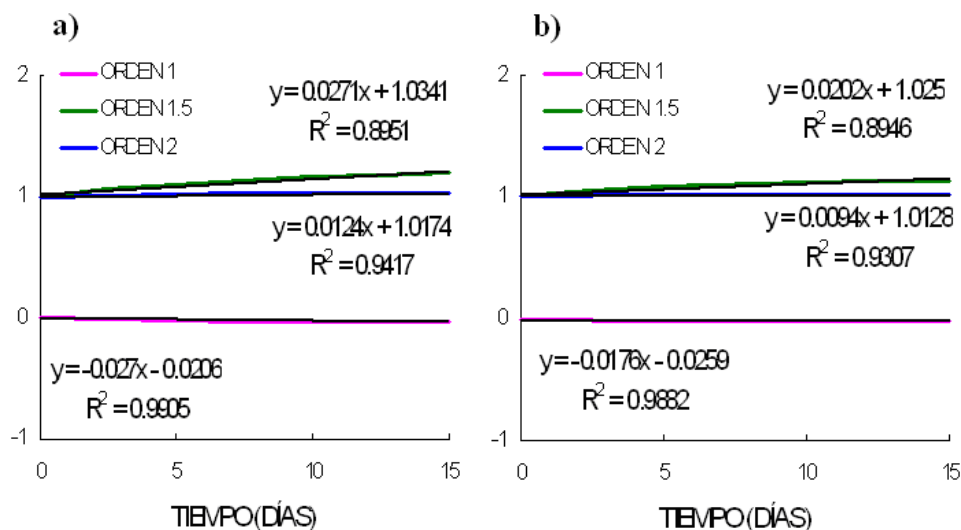


Figura 6. Gráficas de las ecuaciones de la línea recta y coeficientes de las correlaciones de los materiales reforzados soportados, en donde (a) 15% y (b) 30% de hidroxapatita mediante la enzima esterasa a diferentes ordenes de reacción enzimática.

3.3. Aplicación del método diferencial. En las Tablas 6 y 7 se muestra la comparación de los diferentes ordenes de reacción (1, 1,5 y 2) mediante la enzima papaína para los materiales reforzados mezclados y soportados con 15 y 30% de hidroxapatita obtenidos mediante la aplicación del método diferencial, mediante el análisis de la concentración de los materiales reforzados a diferentes tiempos, comprobándose que el mecanismo de reacción enzimático se ajusta a una reacción de primer orden, debido a que las constantes de velocidad a los diferentes días son semejantes y en comparación con los ordenes de 1,5 y 2 se observan que los valores son más cambiantes.

Tabla 6. Comparación de los ordenes de reacción obtenidos mediante el método diferencial para los materiales reforzados mezclados con 15 y 30% de hidroxapatita y la enzima papaína.

		Mezclado 15%			Mezclado 30%	
Tiempo Días	N = 1	N = 1,5	N = 2	N = 1	N = 1,5	N = 2
0	0,0727	0,0781	0,0919	0,0429	0,0441	0,0463
5	0,0725	0,0702	0,0848	0,0415	0,0360	0,0416
10	0,0710	0,0662	0,0773	0,0390	0,0278	0,0369

Tabla 7. Comparación de los ordenes de reacción obtenidos mediante el método diferencial para los materiales reforzados soportados con 15 y 30% de hidroxiapatita y la enzima papaína.

		Soportado 15%			Soportado 30%	
Tiempo Días	N = 1	N = 1,5	N = 2	N = 1	N = 1,5	N = 2
0	0,0494	0,0584	0,0555	0,0469	0,0441	0,0463
5	0,0478	0,0469	0,0512	0,0417	0,0288	0,0313
10	0,0473	0,0324	0,0489	0,0394	0,0136	0,0263

En las Tablas 8 y 9 se observan los diferentes ordenes de reacción (1, 1,5 y 2) después de la hidrólisis mediante la enzima ureasa de los materiales reforzados mezclados y soportados con 15 y 30% de hidroxiapatita obtenidos mediante la aplicación del método diferencial, se aprecia que para un orden uno las variaciones de las constantes son mínimas, mientras que para orden 1,5 y 2 se presentan cambian considerablemente en las constantes, por lo tanto, se deduce que el orden de reacción al que se ajustan la enzima es a orden uno.

Tabla 8. Comparación de los ordenes de reacción obtenidos mediante el método diferencial para los materiales reforzados mezclados con 15 y 30% de hidroxiapatita y la enzima ureasa.

		Mezclado 15%			Mezclado 30%	
Tiempo/días	N = 1	N = 1,5	N = 2	N = 1	N = 1,5	N = 2
0	0,0511	0,0702	0,0907	0,0281	0,0388	0,0606
5	0,0508	0,0683	0,0832	0,0275	0,0312	0,0543
10	0,0495	0,0664	0,0758	0,0268	0,0236	0,0481

Tabla 9. Comparación de los órdenes de reacción obtenidos mediante el método diferencial para los materiales reforzados soportados con 15 y 30% de hidroxiapatita y la enzima ureasa.

		Soportado 15%			Soportado 30%	
Tiempo/días	N = 1	N = 1,5	N = 2	N = 1	N = 1,5	N = 2
0	0,0248	0,0468	0,0693	0,0239	0,0337	0,0750
5	0,0246	0,0332	0,0462	0,0230	0,0294	0,0621
10	0,0241	0,0196	0,0331	0,0226	0,0251	0,0492

En las Tablas 10 y 11 se aprecia la comparación de los diferentes ordenes de reacción (1, 1,5 y 2) hidrolizados mediante la enzima esterasa para los materiales reforzados mezclados y soportados con 15 y 30% de hidroxiapatita, respectivamente, y mediante la aplicación del método diferencial se determinó que el mecanismo de reacción enzimático se ajusta a una reacción de primer orden, debido a que las constantes de velocidad a los diferentes días de la hidrólisis son muy semejantes, mientras que para el orden 1,5 y 2 las constantes presentan cambios importantes en las constantes.

Tabla 10. Comparación de los ordenes de reacción obtenidos mediante el método diferencial para los materiales reforzados mezclados con 15 y 30% de hidroxiapatita y la enzima esterasa.

		Soportado 15%			Soportado 30%	
Tiempo/días	N = 1	N = 1,5	N = 2	N = 1	N = 1,5	N = 2
0	0,0475	0,0568	0,0713	0,0259	0,0427	0,0650
5	0,0470	0,0530	0,0604	0,0256	0,0394	0,0546
10	0,0466	0,0472	0,0494	0,0248	0,0331	0,0442

Tabla 11. Comparación de los órdenes de reacción obtenidos mediante el método diferencial para los materiales reforzados soportados con 15 y 30% de hidroxiapatita y la enzima esterasa.

	Soportado 15%			Soportado 30%		
Tiempo/días	N = 1	N = 1,5	N = 2	N = 1	N = 1,5	N = 2
0	0,0279	0,0388	0,0406	0,0178	0,0287	0,0297
5	0,0274	0,0258	0,0278	0,0177	0,0186	0,0197
10	0,0270	0,0128	0,0150	0,0176	0,0086	0,0097

3.4. Programa HYPER. En la Tabla 12 se muestran los resultados del análisis mediante el programa HYPER el cual permite la visualización con mayor rapidez de los parámetros cinéticos, con los cuales se confirma que el mecanismo de reacción enzimático se ajustó a una reacción de primer orden, para los materiales reforzados mezclados y soportados con 15 y 30% de hidroxiapatita mediante las enzimas papaína, ureasa y esterasa, respectivamente.

Tabla 12. Ordenes de reacción obtenidos mediante simulación utilizando el programa HYPER.

Material reforzado	Papaína	Ureasa	Esterasa
Mezclado 15%	1,004	1,011	1,015
Mezclado 30%	1,001	1,004	1,008
Soportado 15%	1,005	1,008	1,012
Soportado 30%	1.003	1,006	1,010

4. CONCLUSIONES

De acuerdo al mecanismo de reacción propuesto y en base a los resultados de las enzimas papaína, ureasa y esterasa se determino que la hidrólisis enzimática se ajusta a un modelo de reacción de primer orden, debido a una asociación rápida de la enzima (E) con el sustrato (S) para formar el complejo enzima-sustrato (ES) el cual posteriormente se convierte en productos y enzima.

Además, las correlaciones para orden 1 presentan menores cambios en comparación de los órdenes 1,5 y 2, respectivamente.

5. Agradecimientos. Al Consejo del Sistema Nacional de Educación Tecnológica (COSNET) por la beca otorgada 402003076MP. A la División de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de Cd. Madero, México, al Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) de Saltillo, México y a la División de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de Zacatepec, México.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Dillon JG y Hughes MK, Degradation of five Polyurethane Gastric Bubbles Following *in vivo* use: SEC, ATR-IR and DSC studies”, *Biomaterials*, **13(4)**, 240 (1999)
- [2] Phua SK, Castillo E, Anderson JM, Hiltner A, *J. Biomedical Materials Research*, **21**, 231 (1987)
- [3] Asha S, Mathew K, Sreenivasan P, Mohanan V. *Biomaterials Artificial Organs*; **19(2)**, 115 (2006)
- [4] Martínez PCA “Desarrollo de un Material Compuesto Poliuretano/Hidroxiapatita por un método biomimético”, Tesis de Doctorado, Chihuahua, Chihuahua, México. Centro de Investigación en Materiales Avanzados (2001)
- [5] Zavala ARE “Síntesis de Poliuretano a Partir de Aceites Naturales”. Tesis de Doctorado,

Ciudad Madero, Tamaulipas, México. División de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de Ciudad Madero (2003)

[6] Atkins GL, Nimmo A, *Journal Biochemical*; **149**, 775 (1975)