



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS C/M EN QUÍMICA**

Tesis para optar al grado de:

Doctor en Ciencias con Mención en Química

**REACCIONES DE EPOXIDACIÓN DE DERIVADOS DEL ESTIRENO
CATALIZADAS POR CLOROPEROXIDASA DE *Caldariomyces fumago*
INMOVILIZADA EN SOPORTES NANOESTRUCTURADOS PARA EL
MEJORAMIENTO DE SU ESTABILIDAD OPERACIONAL**

FABIO A. MUÑOZ GUERRERO

GRUPO DE BIOMATERIALES Y DISEÑO MOLECULAR (BDM)

CONCEPCIÓN, CHILE

2015

Profesor Guía: Dr. Joel Alderete Triviños
Profesor Co-Guía: Dr. Rafael Vazquez Duhalt





UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
ESCUELA DE GRADUADOS
PROGRAMA DE GRADUADOS EN QUÍMICA



EXAMEN DE GRADO

El día.....del año 2015, el Sr. Fabio A. Muñoz Guerrero rindió su examen de grado, presentando su tesis titulada “**Reacciones de epoxidación de derivados del estireno catalizadas por cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* inmovilizada en soportes nanoestructurados para el mejoramiento de su estabilidad operacional**”.

La comisión de examen de grado, constituida de acuerdo al Art. 42 del Reglamento Normativo de la Escuela de Graduados, acordó.....
este examen con calificación.....

Dr. Joel Alderete Triviños
Profesor Tutor

Dr. Rafael Vazquez Duhalt
Profesor co-Tutor

Dra. Lorena Wilson
Miembro comisión

Dr. Patricio Reyes
Miembro comisión

Dr. Héctor Mansilla
Miembro comisión

Concepción,.....de 2015

Dedicatoria

A mi esposa Paula, quien llena de inspiración todos los días de mi vida.



Agradecimientos



Tabla de contenido

Resumen		15
Abstract		16
Capítulo 1	Introducción	17
	1.1 Objetivo general	24
	1.2 Objetivos específicos	25
Capítulo 2	Metodología	26
	2.1 Reactivos químicos	26
	2.2 Caracterización de los soportes nanoestructurados	26
	2.3 Actividad enzimática	27
	2.4 Determinación de los parámetros catalíticos de la CPO	28
	2.5 Evaluación del co-solvente orgánico sobre la actividad catalítica de la CPO	30
	2.6 Síntesis de las nanopartículas magnéticas (NP _γ -Fe ₂ O ₃) por co-precipitación	30
	2.7 Inmovilización de CPO en soportes nanoestructurados por interacción electrostática	31
	2.8 Inmovilización de CPO sobre nanopartículas (NP _γ -Fe ₂ O ₃) y nanotubos magnéticos (NT _{Fe₃O₄}) por unión covalente	32

2.9	Determinación de la estabilidad operacional de la CPO libre e inmovilizada	33
Capítulo 3	<i>Evaluación de parámetros operacionales de las reacciones de epoxidación con CPO libre</i>	34
3.1	Efecto de la concentración del peróxido de hidrógeno	35
3.2	Efecto de la dosificación del peróxido de hidrógeno	38
3.3	Efecto del tipo y contenido de co-solvente	41
3.4	Parámetros catalíticos y estabilidad operacional de la CPO libre	48
Capítulo 4	<i>Biocatálisis de las reacciones de epoxidación utilizando CPO inmovilizada en materiales nanoestructurados no magnéticos de sílice y titania</i>	51
4.1	Caracterización de los soportes.	51
4.2	Inmovilización de la CPO en materiales nanoestructurados no magnéticos.	55
4.3	Eficiencia catalítica y estabilidad operacional de los biocatalizadores no magnéticos	59
4.4	Relación estructura - actividad	70
Capítulo 5	<i>Biocatálisis de las reacciones de epoxidación utilizando CPO inmovilizada en materiales nanoestructurados magnéticos de óxidos de hierro</i>	78
5.1	Caracterización de los soportes	78
5.2	Inmovilización de CPO por interacción electrostática y por unión covalente a nanomateriales magnéticos.	82
5.3	Eficiencia catalítica y estabilidad operacional de los biocatalizadores magnéticos	87
	<i>Conclusiones y perspectivas</i>	92



Lista de figuras

- Figura 1.1.** Métodos de inmovilización de enzimas más utilizados (tomado de [32]). **20**
- Figura 3.1.** Efecto de la relación $R_{H_2O_2}/CPO$ sobre la actividad catalítica de la CPO en la reacción de epoxidación, utilizando estireno $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$ como sustrato y 5 % (v/v) de acetonitrilo como co-solvente en el medio de reacción. **36**
- Figura 3.2.** Ciclo catalítico de una hemo-tiolato haloperoxidasa. Compuestos y especies intermediarias: (1) enzima férrica en reposo; (2) compuesto I de CPO; (3) compuesto X que libera ácido hipohaloso, HOX; (4) compuesto II protonado; (5) compuesto II de CPO (Tomado de [86], con modificaciones). **37**
- Figura 3.3.** Efecto de la velocidad de adición del peróxido de hidrógeno sobre la producción de epóxido a partir de la CPO ($R_{H_2O_2}/CPO = 12500$). **39**
- Figura 3.4.** Efecto del contenido de co-solvente (ACN y 2M2P) sobre la actividad específica de la CPO. Se utilizó estireno $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ y una $R_{H_2O_2}/CPO$ de 1250. **43**
- Figura 3.5.** Efecto del tipo de co-solvente sobre las curvas de actividad específica de la CPO para la reacción de epoxidación del estireno: acetonitrilo (ACN), 2-metil-2-butanol (2M2B) y 2-metil-2-propanol (2M2P).

Se utilizó un contenido de co-solvente de 15 %(v/v) y una $R_{H_2O_2}/CPO$ de 1250. **44**

Figura 3.6. Relación entre los parámetros catalíticos de una reacción enzimática y las energías libres de Gibbs. **46**

Figura 3.7. Efecto del contenido de 2M2P sobre la actividad específica de la CPO para la reacción de epoxidación llevada a cabo a pH 6,0. Condiciones de la reacción: 0,2 mM de sustrato, $0,2 \mu\text{mol min}^{-1}$ de H_2O_2 (1 μmol total adicionado), una $R_{H_2O_2}/CPO$ de 1250, 20 °C, 400 rpm y 5 minutos de reacción. **47**

Figura 4.1. Micrografías TEM del MSU-F (izquierda) y del $TiO_2(NT)$ (derecha). **52**

Figura 4.2. Isotermas de adsorción/desorción de nitrógeno para el MSU-F y el $TiO_2(AN)$. Los recuadros muestran la distribución de tamaños de poro calculadas a partir de la rama de desorción de las isotermas utilizando el método BJH. Las isotermas correspondientes a MCF y $TiO_2(NT)$ están reportadas en [15] y [75], respectivamente. **54**

Figura 4.3. Curvas de actividad específica de diferentes biocatalizadores para la reacción de epoxidación del estireno llevadas a cabo a pH 3,0 **(a)** y pH 6,0 **(b)**. Las líneas sólidas corresponden al ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Hill utilizada como modelo. Condiciones de la reacción: buffer fosfatos 60 mmol L^{-1} , 18 U de biocatalizador, 15 %(v/v) de 2M2P como co-solvente, peróxido de hidrógeno ($0,2 \mu\text{mol min}^{-1}$), 293 K, 400 rpm y 5 min de reacción. **60**

Figura 4.4. (a) Distribución del potencial superficial electrostático Poisson-Boltzmann de la CPO calculado en GRASP a pH 7 (el azul representa áreas de carga positiva, y el rojo, áreas de carga negativa), y **(b)** carga calculada sobre la CPO en función del pH (figuras tomadas de la referencia [112]). **63**

- Figura 4.5.** Accesos al sitio activo en la estructura tridimensional de la CPO (RCSB Protein Data Bank: 1CPO [113]). La región azul corresponde a los aminoácidos que conforman el canal de acceso al grupo hemo. Las lisinas superficiales están señaladas como referencia. **65**
- Figura 4.6.** Efecto del contenido de 2M2P como co-solvente sobre la estabilidad operacional de la CPO en términos del NRT, para los diferentes biocatalizadores en la reacción de epoxidación de estireno, evaluado a **(a)** pH 3,0 y **(b)** pH 6,0. **67**
- Figura 4.7.** Número de recambio total (NRT) para la CPO libre e inmovilizada, en la reacción de epoxidación a pH 6 del estireno (STYR), 3-cloroestireno (3-Cl) y 3-nitroestireno (3-NO₂), utilizando 15 %(v/v) de 2M2P como co-solvente, 1,5 μmol min⁻¹ de H₂O₂ (flujo continuo) y 20 °C. **69**
- Figura 4.8.** Esquema de la ionización de los estirenos m-sustituidos, considerado para el cálculo de la energía de ionización (*E_I*). **73**
- Figura 4.9.** Correlación entre los valores experimentales y los calculados a partir del modelo 2 para el Log(*k_X/k_H*), correspondientes a la CPO libre. **76**
- Figura 5.1.** Micrografías TEM de los materiales magnéticos NP_Y-Fe₂O₃ (izquierda) y NT_{Fe₃O₄} (derecha). **80**
- Figura 5.2.** Curva de magnetización obtenida para las NP_Y-Fe₂O₃ utilizando un VSM a 298 K. **81**
- Figura 5.3.** Esquema simplificado de la inmovilización covalente de CPO a los materiales magnéticos, utilizando CPTMS como agente de acoplamiento. **84**
- Figura 5.4.** Ubicación de los grupos ε-amino de las lisinas superficiales en la estructura tridimensional de la cloroperoxidasa obtenida a partir de difracción de rayos X (RCSB Protein Data Bank: 1CPO [113]). **85**

Figura 5.5. Posible efecto de la inmovilización multipunto sobre la estructura tridimensional de la CPO. **86**

Figura 5.6. Curvas de actividad específica de la CPO libre y de biocatalizadores magnéticos para la reacción de epoxidación de 3-aminoestireno a pH 6,0. Las líneas sólidas corresponden al ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Hill utilizada como modelo. Condiciones de la reacción: buffer fosfatos pH 6,0 60 mmol L⁻¹, 2 U de biocatalizador, 15 %(v/v) de 2M2P como co-solvente, peróxido de hidrógeno (0,2 μmol min⁻¹), 293 K, 400 rpm y 5 min de reacción. **88**

Figura 5.7. Cambio de conformación de la enzima aproximándose al soporte – efecto de la naturaleza química del soporte sobre las moléculas de enzima (tomado de [110]). **89**



Lista de tablas

- Tabla 3.1.** Algunas propiedades fisicoquímicas de los solventes utilizados como co-solventes en las reacciones de epoxidación y la fracción molar de estireno en el medio de reacción con 15 %(v/v) de co-solvente. **42**
- Tabla 3.2.** Parámetros cinéticos de las reacciones de epoxidación del estireno catalizadas por CPO, utilizando 15 %(v/v) de co-solvente orgánico en el medio de reacción y una $R_{H_2O_2}/CPO$ de 1250^a. **45**
- Tabla 3.3.** Parámetros catalíticos y estabilidad operacional de la CPO libre en las reacciones de epoxidación del estireno y de algunos derivados m-sustituidos, utilizando 15 %(v/v) de 2M2P como co-solvente, $0,2 \mu\text{mol min}^{-1}$ de H_2O_2 , una $R_{H_2O_2}/CPO$ de 1250 al final de la reacción. **49**
- Tabla 4.1.** Caracterización de los materiales nanoestructurados utilizados como soporte para la inmovilización de CPO. **53**
- Tabla 4.2.** Caracterización biocatalítica de los biocatalizadores obtenidos utilizando materiales nanoestructurados. **57**
- Tabla 4.3.** Parámetros catalíticos obtenidos para los biocatalizadores de CPO a partir de la ecuación de Hill para dos valores de pH, en la epoxidación de estireno. **61**
- Tabla 4.4.** Parámetros catalíticos y estabilidad operacional del biocatalizador CPO/ $TiO_2(NT)$ y de la CPO libre, en las reacciones de epoxidación del

estireno y de algunos derivados m-sustituidos, utilizando 15 %(v/v) de 2M2P como co-solvente, $0,2 \mu\text{mol min}^{-1}$ de H_2O_2 , una $R_{\text{H}_2\text{O}_2}/\text{CPO}$ de 1250 al final de la reacción. **71**

Tabla 4.6. Datos utilizados para los análisis de regresión múltiple. **74**

Tabla 5.1. Caracterización de los materiales magnéticos seleccionados para la inmovilización de CPO. **80**

Tabla 5.2. Caracterización biocatalítica de los biocatalizadores de CPO obtenidos a partir de estrategias de inmovilización diferentes y dos nanomateriales magnéticos de óxidos de hierro. **82**

Tabla 5.3. Parámetros catalíticos obtenidos para los biocatalizadores magnéticos de CPO a partir de la ecuación de Hill, para la reacción de epoxidación de 3-aminoestireno a pH 6,0. **88**

Tabla 5.4. Estabilidad operacional para diferentes biocatalizadores de CPO medidos a pH 6,0, utilizando 3-aminoestireno como sustrato y dos nanomateriales magnéticos de óxidos de hierro como soportes. **91**

Resumen

Las reacciones de epoxidación catalizadas por cloroperoxidasa (CPO) de *Caldariomyces fumago* se presentan como una aproximación biocatalítica interesante para la obtención de epóxidos. Sin embargo, su implementación a gran escala presenta dos limitaciones importantes: la baja solubilidad de sustratos hidrofóbicos en el medio acuoso donde se llevan a cabo estas reacciones, y la baja estabilidad operacional de la CPO frente a concentraciones catalíticas del peróxido de hidrógeno debido a su inactivación suicida. Para contrarrestar estas limitaciones se han desarrollado diferentes estrategias, como el uso de co-solvente orgánico en el medio de reacción, la dosificación del H₂O₂ y la inmovilización de enzimas. Por esta razón, en el presente trabajo se propuso mejorar la estabilidad operacional de la CPO en la biocatálisis de las reacciones de epoxidación del estireno y algunos derivados *m*-sustituidos, mediante su inmovilización en soportes nanoestructurados no magnéticos de sílice (MCF y MSU-F) y titania (anatasa y nanotubos), y en nanomateriales magnéticos de óxidos de hierro (nanopartículas y nanotubos). También se procedió al ajuste de algunas condiciones de la reacción relacionadas con el uso de un co-solvente orgánico y la dosificación de peróxido de hidrógeno.

El establecimiento de los parámetros de operación evaluados permitió el mejoramiento de la eficiencia catalítica y de la estabilidad operacional de la enzima libre. Por otra parte, las preparaciones de CPO inmovilizada en materiales mesoporosos nanoestructurados no magnéticos presentaron un mejoramiento significativo de la eficiencia catalítica y de la estabilidad operacional con respecto a CPO libre. Los mejores resultados se obtuvieron con el sistema CPO/TiO₂(NT) el cual presentó un número de recambio total (NRT) de 273040 utilizando 3-aminoestireno como sustrato, esto representó un aumento de 15 veces en la estabilidad operacional con respecto a la enzima libre. En cuanto a los biocatalizadores obtenidos con los soportes nanoestructurados magnéticos, la CPO presentó un leve incremento en la estabilidad operacional, mientras que las eficiencias catalíticas fueron similares o inferiores a las de la enzima libre.

Abstract

Epoxidation reactions catalyzed by chloroperoxidase (CPO) from *Caldariomyces fumago* are presented as an interesting biocatalytic approach for obtaining epoxides. However, its large-scale implementation has two important limitations: the low solubility of hydrophobic substrates in aqueous medium where these reactions are carried out, and the low CPO operational stability to catalytic concentrations of hydrogen peroxide due to its suicide inactivation. To counter these drawbacks different strategies have been developed, such as the use of organic co-solvent in the reaction medium, the dosage of H₂O₂ and enzyme immobilization. Therefore, in this work was proposed to improve the operational stability of CPO in epoxidation reaction biocatalysis of styrene and some of its m-substituted derivatives by its immobilization on silica (MCF and MSU-F) and titania (anatase and nanotubes) non-magnetic nanostructured supports, and iron oxides (nanoparticles and nanotubes) magnetic nanomaterials. The adjustment of some reaction conditions related to organic co-solvent use and hydrogen peroxide dosage also it was performed.

Setting of evaluated operating parameters allowed improving the catalytic efficiency and operational stability of the free enzyme. Moreover, CPO preparations immobilized on non-magnetic nanostructured mesoporous materials showed a significant improvement in catalytic efficiency and operational stability with respect to free CPO. The best results were obtained with CPO/TiO₂(NT) system, which presented a total turnover number (TTN) value of 273040 using 3-aminostyrene as substrate, representing a 15-fold increase in operational stability with respect to free enzyme. Regarding to biocatalysts obtained with magnetic nanostructured supports, CPO showed a slight increase in operational stability, while catalytic efficiencies were similar or lower than free enzyme.

CAPÍTULO 1

Introducción

Los epóxidos y los dioles vecinales en sus formas enantiopuras son intermediarios sintéticos importantes para la obtención de compuestos farmacéuticos, compuestos con actividad biológica o de reactivos quirales. La versatilidad sintética de los epóxidos se debe a la facilidad con que la función oxirano puede abrirse por el ataque de diversos nucleófilos generando una variedad de intermediarios con gran importancia sintética [1]. Aunque en la actualidad existen diferentes métodos de síntesis enantioselectiva de estos compuestos [2], las alternativas biocatalíticas se presentan como las más interesantes por diversas razones: generalmente presentan altas estereoselectividades y regioselectividades, logran el mejor desempeño bajo condiciones de reacción suaves (a temperatura ambiente y presión atmosférica), y el nivel de contaminación es mínimo si se compara con un gran número de procesos quimio-catalíticos [1].

Una aproximación biocatalítica para la obtención de epóxidos es el uso de la enzima cloroperoxidasa (abreviada CPO; E.C. 1.11.1.10), la cual es obtenida a partir del hongo marino *Caldariomyces fumago*. Esta enzima cataliza la epoxidación asimétrica de una amplia variedad de sustratos olefínicos con altos excesos enantioméricos (ee) y rendimientos [3–6]. Entre los subproductos principales de esta reacción con CPO se encuentran los dioles vecinales generados por la hidrólisis de los epóxidos en medio acuoso, los cuales conservan

su centro estereogénico manteniendo su importancia sintética como sintones quirales. Las reacciones de epoxidación biocatalíticas mediadas por CPO presentan varias ventajas debido a que esta enzima es la peroxidasa más rápida conocida hasta ahora, no necesita cofactores y el aceptor final de electrones, el peróxido de hidrógeno, es un compuesto ambientalmente amigable. Además, la enzima puede producirse en grandes cantidades y es relativamente estable bajo condiciones de almacenamiento no oxidantes [7,8]. A esto, se suma la facilidad del proceso de purificación de los productos de interés debido a la generación mínima de subproductos, reduciendo a su vez el impacto ambiental de estas reacciones comparadas con otros métodos de síntesis. Sin embargo, existen dos limitaciones principales para la implementación a gran escala de la producción biocatalítica de epóxidos utilizando CPO. La primera, la solubilidad de los sustratos hidrofóbicos es muy baja en el medio acuoso en el que se llevan a cabo estas reacciones y, además, los epóxidos generados sufren hidrólisis en este medio. En segundo lugar, y como ocurre con todas las peroxidases, la CPO presenta una estabilidad muy baja frente a concentraciones catalíticas del peróxido de hidrógeno debido a su inactivación suicida [9,10], lo cual da lugar a una reducción considerable de su estabilidad operacional, siendo esto un problema limitante clave para su eficiencia biocatalítica [11]. Además, esta es una de las razones más importantes por las cuales en la actualidad no se encuentran ejemplos de la aplicación industrial de la CPO en síntesis orgánica, por lo que se hace imperativo el mejoramiento de la estabilidad operacional de la enzima. La importancia de este parámetro radica en que su valor, expresado como el número de recambio total (NRT), es un indicador de la productividad de las aplicaciones industriales a gran escala, ya que expresa la cantidad total de producto generado por mol de enzima o por gramo de peso seco de células [11]. Entre más estable sea biocatalizador (mayor NRT) menor será su costo para el proceso, con lo cual se generan mayores posibilidades de comercialización del mismo.

Todo lo anterior ha generado el desarrollo de diferentes estrategias que permiten contrarrestar las limitaciones operacionales que presentan las enzimas en general. Una de ellas consiste en la adición de un co-solvente orgánico en la

mezcla de reacción para aumentar la solubilidad de sustratos hidrofóbicos, con lo cual se logran minimizar los problemas difusionales asociados con el sustrato, estabilizar los productos de reacción y suprimir parcialmente las reacciones colaterales que son favorecidas en medio acuoso [12,13]. Entre los co-solventes orgánicos más ampliamente ensayados en biocatálisis se encuentran el acetonitrilo, el 2-metil-2-propanol, el 2-metil-2-butanol, entre otros [5,14–21]. Además de los solventes orgánicos, los líquidos iónicos también han sido estudiados como co-solventes para el mejoramiento de la actividad, estabilidad y enantioselectividad enzimática, así como para el aumento de la solubilidad del sustrato [22–28]. Por otra parte, la dosificación de peróxido de hidrógeno es un método efectivo para minimizar la inactivación de la CPO debida a este compuesto, ya que se garantiza una concentración baja del mismo gracias a su adición controlada en el medio de reacción, y además, se favorece la actividad de epoxidación sobre la actividad catalasa de la enzima (estas dos actividades siempre están presentes bajo las condiciones en que se llevan a cabo las reacciones de epoxidación) [9,11]. Otra estrategia de gran interés que permite mejorar la estabilidad operacional de las enzimas es su inmovilización, debido a que incrementa la estabilidad mecánica y térmica de la enzima, facilita el reciclaje del biocatalizador (la enzima pasa a ser insoluble) y, en ciertos casos, las preparaciones de enzima inmovilizada pueden ser utilizadas en medios con altos contenidos de co-solvente orgánico [29,30].

Existen una gran variedad de métodos de inmovilización de enzimas (ver **figura 1.1**), sin embargo las tres estrategias más utilizadas son la adsorción física, la unión covalente y el entrecruzamiento de moléculas de enzima [31]. La adsorción de enzimas es uno de los métodos más sencillos de inmovilización, el cual involucra interacciones físicas superficiales de tipo enlace de hidrógeno, fuerzas electrostáticas e interacciones hidrofóbicas entre el soporte y la enzima. Generalmente, estas interacciones físicas por si solas no son lo suficientemente fuertes para evitar que la enzima se desprenda del soporte durante la catálisis. Para evitar la ocurrencia de este fenómeno debe garantizarse una correspondencia de tamaños entre los poros del soporte y la enzima, puesto que

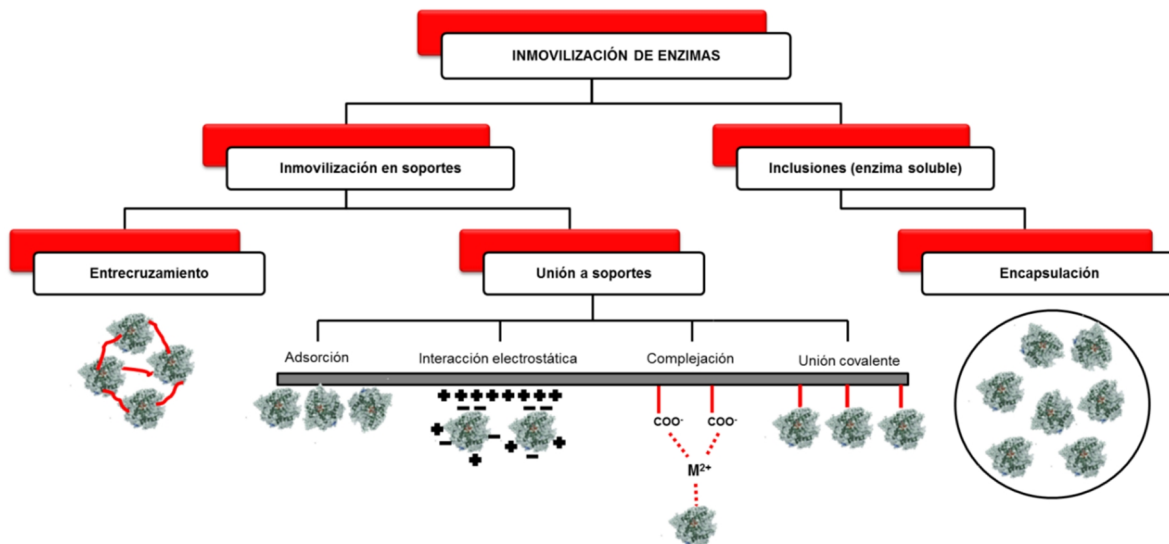


Figura 1.1. Métodos de inmovilización de enzimas más utilizados (tomado de [32]).

si el tamaño de esta última es igual o más grande que el diámetro de poro del soporte se tendrá como resultado una carga baja de enzima y simplemente ésta se adsorberá en la superficie externa del soporte, mientras que si su tamaño es mucho más pequeño que el diámetro de poro del material la enzima se desprenderá libremente desde el interior del mismo. El encapsulamiento es un método alternativo que reduce el “*leaching*” y la desnaturalización excesiva de la enzima, ya que esta queda confinada físicamente en el interior de un soporte que actúa como hospedador. Otra estrategia de inmovilización es la unión covalente, la cual involucra el enlace de residuos de las cadenas laterales de aminoácidos de la enzima ($-\text{NH}_2$, $-\text{CO}_2^-$, $-\text{SH}$) a la matriz del soporte. Este método es conocido por requerir soportes con superficie específica alta y diámetros de poro grandes, donde el sustrato y el producto puedan difundir libremente sin la desventaja de sufrir desprendimiento de enzima. Desafortunadamente, esta estrategia disminuye la actividad de la enzima en la mayoría de las ocasiones [33]. Para la selección de uno u otro método deben considerarse diferentes factores, como por ejemplo, la compatibilidad entre las condiciones de inmovilización y la enzima, y las propiedades físico-químicas tanto de la enzima como del soporte, por ejemplo, sus

puntos isoeléctricos, el tipo y la disponibilidad de grupos funcionales en la superficie, tamaño de la enzima, diámetros de poro de los materiales, etc [34].

En términos generales, para la inmovilización de enzimas se han ensayado diversos materiales como soportes con estructuras y características químicas diferentes que incluyen polímeros orgánicos, quitosano, hidrogeles, geles de sílice, zeolitas, nanomateriales y materiales mesoporosos [35,36]. En el caso particular de la CPO se han reportado diferentes métodos de inmovilización, entre ellos la adsorción y la interacción electrostática, ya sea sobre sólidos microporosos como la celita y el talco [37,38], o en sólidos mesoporosos de tipo MCF-150, MCM-48, SBA-15 y SBA-16 [15,39,40]. La CPO también ha sido inmovilizada por unión covalente a soportes de diferente naturaleza química, como sílice, espumas de poliuretano, nanotubos de carbono de pared múltiple, esferas y nanopartículas magnéticas de óxidos de hierro, entre otros [41–48]. Otras estrategias de inmovilización de CPO son la encapsulación en diferentes tipos de matrices poliméricas orgánicas o inorgánicas (por ejemplo, biocompósitos híbridos de sílice y polisacárido, matrices de sílice dopadas con polietilenglicol 200 y nanoreactores de polimerosomas [49–51]), y el entrecruzamiento de enzimas (CLEs), ya sea como cristales (CLECs), o como agregados de la misma (CLEAs), utilizando glutaraldehído como agente entrecruzante [52,53].

Ahora bien, los materiales mesoporosos son excelentes candidatos para la inmovilización de enzimas debido a que el tamaño de sus poros (2 – 50 nm) coincide con el tamaño de las enzimas. Particularmente, los materiales de sílice mesoporosa han probado ser soportes promisorios para la inmovilización de enzimas debido a su superficie específica alta, estructura de poro especial, estabilidad térmica y biocompatibilidad [54]. Las espumas mesocelulares (abreviada MCF de su sigla en inglés) y la sílice de la *Michigan State University* (MSU-F) están entre los materiales mesoporosos silíceos más promisorios para la inmovilización de enzimas, incluyendo la CPO [15,39,55,56]. Adicionalmente, estos materiales mesoporosos son atractivos por su robustez, estabilidad hidrotermal, estructura de poro bien definida e interconectada, y por sus tamaños

de poro ultra largos (24-42 nm) que facilitan la difusión del sustrato. Sin embargo, es importante resaltar que los materiales tipo MSU-F han sido poco empleados como soporte para este propósito, a pesar de poseer propiedades químicas y físicas similares al MCF.

Otro material adecuado para la inmovilización de enzimas es la titania anatasa ($\text{TiO}_2(\text{AN})$), la cual también presenta estructura mesoporosa, buenas propiedades mecánicas y químicas, estabilidad térmica, biocompatibilidad, segura ambientalmente y ampliamente utilizada en aplicaciones catalíticas [32,57]. Sin embargo, hasta la fecha la información disponible sobre inmovilización de enzimas en titania mesoporosa es bastante limitada, incluso en los materiales nanoestructurados de TiO_2 . Recientemente, nanopartículas de TiO_2 fueron empleadas para la inmovilización de lacasa por adsorción física [58], y nanotubos de titanato para la inmovilización covalente de catalasa, previa funcionalización de los grupos carboxilato de la superficie de la enzima [59]. En otro trabajo se evaluó la relación entre la topografía geométrica de los mesoporos en el TiO_2 y la adsorción de algunas proteínas en su punto isoeléctrico, como la albúmina de suero bovino, la mioglobina y la lisozima [60]. En contraste con las pocas aplicaciones biocatalíticas, este óxido ha sido ampliamente utilizado en otro tipo de aplicaciones, entre ellas como soporte en catalizadores de Au para catálisis heterogénea de epoxidación de alquenos [61] y como modificador de electrodos para la inmovilización de peroxidasa de rábano (HRP) en biosensores electroquímicos [62–66].

Los nanomateriales magnéticos (NMM) por su parte, también han sido probados exitosamente como soportes para la inmovilización de enzimas [32,35,67]. Entre las características más importantes de estos materiales están su baja toxicidad y buena biocompatibilidad, presentan una relación superficie volumen alta en el caso de las nanopartículas, mínimos problemas difusionales externos (en este caso la difusión externa se refiere a la difusión de cualquier compuesto desde el seno de la solución hasta la superficie del material) y permiten una separación fácil del medio de reacción mediante la aplicación de un

campo magnético externo [67–70]. Sin embargo, son pocos los reportes encontrados en la literatura relacionados con la inmovilización de CPO en este tipo de materiales. Bayramoğlu y colaboradores [46] inmovilizaron covalentemente esta enzima sobre esferas magnéticas basadas en acrilato (con tamaños entre los 100 y 150 μm de diámetro) y evaluaron el efecto de las condiciones de la inmovilización sobre la actividad de la CPO. En un trabajo posterior se reporta un nuevo método para la obtención de un nanobiocatalizador, que consiste en nanopartículas magnéticas (NPM) con núcleo de óxido de hierro y una capa polimérica a la cual se unió covalentemente la CPO [48], el cual fue utilizado en la reacción de sulfoxidación enantioselectiva de tioanisol. Recientemente, Cui y colaboradores reportaron una estrategia para la inmovilización de la CPO en NPM de manera eficiente obteniendo buenos resultados de inmovilización [47].

Lo descrito anteriormente pone de manifiesto una excelente oportunidad para el desarrollo de nuevos sistemas biocatalíticos basados en CPO inmovilizada sobre sílice de tipo MSU-F, titanía mesoporosa y nanoestructurada, y nanomateriales de óxidos de hierro, con el fin de explorar sus posibles potencialidades como biocatalizadores en reacciones que sean de interés para la química fina o para la industria farmacéutica.

Por lo tanto, en la presente investigación se evaluaron los parámetros operacionales de la epoxidación biocatalítica utilizando CPO libre e inmovilizada, con el fin de obtener una mayor actividad catalítica de la enzima durante la evaluación de los parámetros catalíticos con los diferentes sustratos. Además, se determinó el efecto del co-solvente orgánico en el medio de reacción sobre la actividad catalítica y la estabilidad operacional de la CPO. Tanto la enzima libre como las preparaciones de biocatalizador fueron ensayadas en combinación con la adición controlada de peróxido de hidrógeno con el propósito de aumentar la estabilidad operacional de la CPO, la cual fue caracterizada en términos del número de recambio total (NRT). Los sistemas inmovilizados fueron obtenidos por interacción electrostática en los materiales no magnéticos y magnéticos, y por unión covalente únicamente en los soportes magnéticos. Para este estudio se

utilizaron el estireno y cuatro derivados *m*-sustituidos, con grupos donadores y sustractores de densidad electrónica. Con los valores de k_{cat} obtenidos para la enzima libre y para uno de los biocatalizadores de CPO inmovilizada se intentará establecer una posible relación cuantitativa entre la actividad catalítica y algunas propiedades fisicoquímicas de los sustratos evaluados. Los epóxidos generados a partir de estos estirenos son utilizados como materiales de partida para la obtención de moléculas biológicamente activas, tales como SR 58611A, AJ-9677 y FR165914 (agonistas de los receptores β 3-adrenérgicos), CL 316,243 (agente antidiabético y antiobesidad) y fármacos de tipo (R)-feniletanolaminas en general [5,71–73]. Finalmente, se compararon los dos tipos de inmovilizaciones realizadas en los materiales magnéticos y se analizó el efecto de su morfología sobre la actividad catalítica y la estabilidad operacional de los sistemas inmovilizados.

Con base en lo expuesto anteriormente, en este trabajo se plantearon las siguientes hipótesis:

i) Los materiales basados en titanía son soportes adecuados para la inmovilización de la CPO de *C. fumago*, dadas sus características físicas y químicas (morfología, características texturales, punto isoeléctrico, etc), generando biocatalizadores eficientes y estables operacionalmente.

ii) La inmovilización covalente de la CPO en soportes magnéticos nanoestructurados de óxidos de hierro permitirá la obtención de biocatalizadores con una estabilidad operacional elevada en comparación con los sistemas inmovilizados por interacción electrostática, tanto en materiales magnéticos como no magnéticos.

1.1 Objetivo general

Mejorar la estabilidad operacional de la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* en la biocatálisis de las reacciones de epoxidación de derivados del estireno, mediante su inmovilización en soportes nanoestructurados no

magnéticos y magnéticos, y el ajuste de algunos parámetros operacionales de la reacción.

1.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de diferentes condiciones operacionales de la reacción sobre la actividad catalítica de la CPO libre, con el fin de establecer un conjunto de condiciones de operación que permitan obtener una mayor actividad catalítica de la enzima durante la realización de los experimentos de estabilidad operacional.
2. Establecer los parámetros catalíticos (k_{cat} , K' , k_{cat}/K') y la estabilidad operacional de la CPO libre para las reacciones de epoxidación del estireno y sus derivados, llevadas a cabo a temperatura ambiente (20 °C).
3. Inmovilizar la CPO en los diferentes soportes nanoestructurados propuestos: MCF, MSU-F, $TiO_2(AN)$, $TiO_2(NT)$, nanopartículas de maghemita ($NP_{\gamma-Fe_2O_3}$) y nanotubos de magnetita ($NT_{Fe_3O_4}$), y llevar a cabo su correspondiente caracterización físico-química, con el fin de determinar la actividad catalítica de los biocatalizadores obtenidos.
4. Determinar los parámetros catalíticos (k_{cat} , K' , k_{cat}/K') y la estabilidad operacional de las diferentes preparaciones inmovilizadas de CPO para las reacciones de epoxidación del estireno y sus derivados, llevadas a cabo a temperatura ambiente (20 °C).
5. Comparar los parámetros catalíticos y los números de recambio total obtenidos para la CPO libre e inmovilizada, con el fin de evaluar si hay un mejoramiento en la biocatálisis de las reacciones de epoxidación y en la estabilidad operacional de la enzima.

CAPÍTULO 2

Metodología

2.1 Reactivos químicos

Las siguientes sustancias químicas fueron adquiridas a través de Merck KGaA (Darmstadt, Germany): solución de peróxido de hidrógeno al 30 % (m/m), 2-metil-2-propanol (2M2P) y 2-metil-2-butanol (2M2B), ácido acético glacial y acetato de sodio. La titania (99,7 %, anatasa) fue adquirida de Alfa Aesar® y la sílice mesoporosa MSU-F fue obtenida de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). La espuma mesocelular (MCF), así como los nanotubos de titania (TiO₂(NT)) y de magnetita (NTFe₃O₄) se obtuvieron tal como fue reportado previamente [15,74,75]. La cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* fue obtenida y purificada de acuerdo con la metodología reportada por Pickard y colaboradores [7]. La preparación de enzima utilizada contenía 6530 U mL⁻¹ (actividad halogenasa), con un R_Z=1,0 y una concentración de enzima de 289 μmol L⁻¹. Todas las demás sustancias químicas utilizadas en este trabajo fueron suministradas por Sigma-Aldrich, a menos que se indique lo contrario.

2.2 Caracterización de los soportes nanoestructurados

Los valores de superficie específica se obtuvieron a partir de las isothermas de adsorción de nitrógeno a 77 K, realizados en un equipo automático

Micromeritics modelo ASAP 2010 en el rango de presión relativa de 0,05 – 0,30. Se utilizó el método de Barrett-Emmett-Teller (BET) para calcular las superficies específicas utilizando la parte lineal del gráfico BET de acuerdo con las recomendaciones de la IUPAC. El volumen de poro y las distribuciones de tamaño de poro fueron calculados a partir de las ramas de desorción de las isothermas, utilizando el método de Barrett-Joyner-Halenda (BJH). En el caso de las nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ($\text{NP}_{\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3}$), el área superficial específica expresada en $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ se calculó matemáticamente a partir del diámetro promedio de partícula (medido a partir de las micrografías TEM), la densidad del material ($\rho = 4,87 \text{ g cm}^{-3}$ [76]) y calculando el volumen ($v = (4/3)\pi r^3$), la masa ($m = \rho \times V$) y el área superficial de una NP ($A = 4\pi r^2$), haciendo la aproximación que la forma de las NPs corresponde a la de una esfera.

Las mediciones de potencial zeta se llevaron a cabo en un equipo Zetameter 3, empleando 20 mg de muestra dispersada en 200 mL de una solución de KCl 1 mmol L^{-1} . El pH se ajustó con soluciones de KOH o HCl 1 mmol L^{-1} . El punto isoeléctrico (pI) fue tomado a velocidad de migración cero.

Las curvas de magnetización de las suspensiones acuosas (100 μL) se llevaron a cabo en un magnetómetro de muestra vibrante (VSM; MLVSM9 MagLab 9 T, Oxford Instrument).

2.3 Actividad enzimática

Para las mediciones de actividad de la CPO se emplearon dos ensayos estándar: la actividad peroxidasa y la actividad halogenasa.

La actividad peroxidasa se utilizó para llevar a cabo la caracterización completa de los biocatalizadores y de las soluciones de CPO que fueron usadas durante la inmovilización, ya que la biocatálisis de esta reacción tiene una velocidad comparable con la biocatálisis de la reacción de epoxidación. Esta actividad se determinó espectrofotométricamente usando guaiacol como sustrato a

pH 6,0 y midiendo el incremento en la absorbancia a 470 nm. La velocidad de transformación se estimó utilizando un coeficiente de extinción molar de $26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, correspondiente al producto de la reacción, el tetraguaiacol [77].

Por otra parte, la actividad halogenasa fue utilizada para verificar la actividad inicial y final de la CPO en todos los experimentos de NRT, debido a su mayor sensibilidad a las concentraciones bajas de esta enzima. Esta actividad de la CPO se determinó por medio del ensayo estándar de la monoclorodimedona (MCD) [78], el cual se realizó en *buffer* acetatos pH 3,0, conteniendo KCl (20 mM) y H_2O_2 (1,0 mM). La cloración de la MCD es seguida por la disminución de la absorbancia a 278 nm ($\epsilon = 12,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

En ambos casos, una unidad de actividad (U) se define como la cantidad de enzima requerida para catalizar la conversión de 1 μmol de sustrato por minuto.

2.4 Determinación de los parámetros catalíticos de la CPO.

Para determinar los parámetros catalíticos de la enzima libre e inmovilizada se utilizó la ecuación de Hill (Ec. 1) como modelo de ajuste de los datos experimentales [79]:

$$\frac{v}{E_t} = k_{cat} \left(\frac{[S]^n}{K' + [S]^n} \right) \quad \text{Ec. (1)}$$

donde v es la velocidad de la reacción calculada como la concentración total de epóxidos y dioles producidos por minuto, E_t es la concentración total de enzima y k_{cat} representa la constante de velocidad catalítica. La concentración inicial de sustrato está definida por $[S]$, n corresponde a la cooperatividad del sustrato hacia la enzima y K' es una constante que incluye diferentes factores de interacción y la constante de disociación intrínseca K_S del complejo enzima–sustrato. La actividad específica de la CPO (U_{SP}) está definida como la relación v/E_t , expresada en min^{-1} .

Los parámetros catalíticos fueron evaluados en las reacciones de epoxidación, las cuales se llevaron a cabo en *buffer* fosfatos 60 mM, pH 3,0 y pH 6,0, a 20,0 °C y 300 rpm, conteniendo sustrato (0,05 a 10 mM), 15 %(v/v) de co-solvente y 800 nM de concentración final de CPO. La reacción fue iniciada por la adición de una solución de peróxido de hidrógeno (40 mM) a un flujo de 0,2 $\mu\text{mol min}^{-1}$, hasta alcanzar una concentración final de 1,0 mM (concentración de saturación). Las reacciones fueron detenidas después de 5 minutos por la adición de 1 mL de acetonitrilo y el enfriamiento rápido en un baño de agua/hielo. Cada punto de las cinéticas fue realizado por triplicado y para cada uno de ellos se hicieron los respectivos controles sin enzima. Posteriormente, las mezclas de reacción fueron analizadas en un cromatógrafo líquido de alta eficiencia (HPLC) marca *Knauer*, equipado con un detector de arreglo de fotodiodos (PDA) *Smartline 2850* (HPLC-PDA). La elución fue realizada con una fase móvil de acetonitrilo-agua en relación 65:35 (v/v), con un flujo de 1,0 mL min^{-1} , utilizando una columna C_{18} en fase reversa *Eurospher 100-5* (250 mm x 4,6 mm x 5 μm). Las longitudes de onda de detección fueron ajustadas a 207 nm y 216 nm para medir los dioles y los epóxidos generados, respectivamente. Todos los extractos obtenidos de los diferentes experimentos fueron filtrados a través de filtros de nylon de 0,22 μm (*Membrane Solutions*), previo a su análisis por HPLC. Las curvas de calibración para cada sustrato y sus correspondientes epóxidos y dioles fueron realizadas de manera previa a los experimentos catalíticos.

La dosificación continua de peróxido de hidrógeno se realizó mediante una bomba de HPLC *Metering Series I* (*Scientific Systems, Inc.*). Los ensayos de actividad enzimática y otros experimentos de UV-VIS fueron realizados con un espectrofotómetro UV-VIS UV2310II (Techcomp). El control de temperatura y agitación de todos los experimentos se hizo por medio de una placa de calentamiento-agitación MR *Hei-standard* (Heidolph), equipada con un control electrónico de temperatura EKT *Hei-Con* (Heidolph).

2.5 Evaluación del co-solvente orgánico sobre la actividad catalítica de la CPO

Inicialmente, se evaluaron tres co-solventes a una concentración del 15 % (v/v) en el medio de reacción, acetonitrilo (ACN), 2-metil-2-propanol (2M2P) y 2-metil-2-butanol (2M2B). En este caso, se utilizó estireno como sustrato en una concentración que varió de 0,1 a 3,0 mM. Posteriormente, para el co-solvente que presentó la mejor actividad catalítica (2M2P), se evaluaron diferentes concentraciones de solvente: 5, 15, 30, 60 y 90 % (v/v), esto se realizó para tres sustratos seleccionados. En todos los experimentos el peróxido de hidrógeno (40 mM) se dosificó a un flujo de $0,2 \mu\text{mol min}^{-1}$ hasta alcanzar una concentración final 1,0 mM. El tiempo de reacción fue 5 minutos.

2.6 Síntesis de las nanopartículas magnéticas ($\text{NP}\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) por co-precipitación.

Para llevar a cabo esta síntesis se siguió la metodología descrita por Massart [80], realizando algunas modificaciones. Se añadieron, con agitación vigorosa, 43 mL de una disolución de FeCl_3 (27 %, Aldrich) sobre 400 mL de agua miliQ en un vaso de precipitados de un litro de capacidad y provisto de agitador magnético. A continuación se añadieron 10,8 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ previamente disueltos en 45 mL de agua, con lo cual se obtuvo una disolución de color naranja. Posteriormente, se añadieron 75 mL de NH_4OH al 25 % de forma rápida, la mezcla de reacción se tornó de color negro inmediatamente, con mucho sólido en suspensión. Se dejó con agitación durante 5 minutos. Pasado ese tiempo se puso la mezcla sobre un imán potente y se dejó que el sólido decantara. Se separó la fase acuosa y el sólido negro de nanopartículas se lavó con agua miliQ 3 veces más con 500 mL cada vez. Se añadieron 300 mL de una disolución de HNO_3 2M, se agitó durante 15 minutos y luego se separó y desechó el líquido con ayuda del imán. A continuación, se añadieron 75 mL de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 1M y 130 mL de agua y se calentó

hasta ebullición. Tras 30 minutos se dejó enfriar la mezcla hasta temperatura ambiente y se volvió a separar la fase acuosa con ayuda del imán. Se añadieron otros 300 mL de HNO₃ 2M y se agitó nuevamente durante 15 minutos. El sólido se separó de la fase acuosa y se lavó 3 veces con acetona (250 mL) utilizando el imán para su separación. Finalmente, el sólido se secó en una estufa a 60 °C con vacío durante 8 horas para eliminar la acetona residual.

2.7 Inmovilización de CPO en soportes nanoestructurados por interacción electrostática.

La inmovilización de la CPO fue llevada a cabo en *buffer* fosfatos 60 mM, a pH 3,0 para MSU-F y MCF, a pH 5,0 para TiO₂(AN) y TiO₂(NT), y a pH 6,0 para NP_γ-Fe₂O₃ y NTFe₃O₄. A cada soporte (100,0 mg) se adicionó una solución 30 μM de CPO preparada en el *buffer* correspondiente, se agitó a 400 rpm y se incubó a 4 °C por 8 horas (las suspensiones con materiales magnéticos se agitaron orbitalmente a 180 rpm). A continuación, las suspensiones se centrifugaron a 6000 rpm por 4 minutos y se removió el sobrenadante. Luego, los biocatalizadores sólidos fueron lavados varias veces con 1 mL de su respectivo *buffer* hasta que el lixiviado de CPO en los lavados fue menor al 0,1 % de la actividad peroxidasa inicial de la enzima. Los biocatalizadores resultantes se resuspendieron en *buffer* fresco y se almacenaron a 4 °C hasta su uso. En cada caso, tanto el sobrenadante como los lavados fueron conservados para la medición de sus actividades y para la cuantificación de enzima correspondiente.

También se llevaron a cabo varios experimentos de control (blancos): experimentos sin soporte para compensar la desactivación de la enzima libre bajo las condiciones de inmovilización; experimentos sin enzima, para comprobar que no había oxidación del sustrato por parte del peróxido; y experimentos en los que se utilizaron los soportes sin enzima para evidenciar adsorción del sustrato en estos materiales, o algún tipo de reacción del soporte bajo las condiciones de las reacciones de epoxidación.

La cantidad de CPO inmovilizada en los diferentes materiales fue estimada midiendo la diferencia de absorbancia a 398 nm (CPO $\epsilon = 85000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) entre la solución inicial de CPO y los sobrenadantes después de la inmovilización, incluyendo todos los lavados.

Con el fin de determinar la efectividad de las inmovilizaciones de CPO se calculó la eficiencia de inmovilización (E_I), de acuerdo con Sheldon y van Pelt [81]. Este parámetro describe el porcentaje de actividad de enzima que es observada en el biocatalizador:

$$E_I (\%) = \left(\frac{U_{biocat}}{U_0 - U_{S+L}} \right) \times 100\% \quad \text{Ec. (2)}$$

donde U_0 es la actividad inicial total de la solución de CPO, U_{S+L} es la actividad de enzima residual total que permanece en la solución de enzima después de la inmovilización (sobrenadante y lavados) y U_{biocat} es la actividad medida para el biocatalizador.

2.8 Inmovilización de CPO sobre nanopartículas ($NP_{\gamma}\text{-Fe}_2\text{O}_3$) y nanotubos magnéticos ($NT\text{Fe}_3\text{O}_4$) por unión covalente.

Inicialmente, se llevó a cabo la funcionalización de la superficie de los dos materiales con un agente de acoplamiento, el 3-(cloropropil)-trimetoxi-silano (CPTMS), el cual permite la unión covalente de la enzima con el soporte. En los dos casos, 100,0 mg de soporte se dejaron reaccionar con CPTMS (6,0 mmol) en tolueno seco a temperatura de reflujo por 72 horas. A continuación, esta suspensión se dejó enfriar y el material magnético funcionalizado (CPTMS- $NP_{\gamma}\text{-Fe}_2\text{O}_3$ y CPTMS- $NT\text{Fe}_3\text{O}_4$) fue separado de la solución con ayuda de un imán para descartar posteriormente el sobrenadante. El sólido se lavó varias veces con 20 mL de acetona y, posteriormente, se dejó secar en la estufa a 60 °C con vacío por 8 horas.

Para la inmovilización de la CPO se adicionó a cada soporte funcionalizado (50,0 mg) una solución 5 μM de CPO preparada en *buffer* fosfatos 60 mM pH 6,0 y se incubó a 4 °C por 48 horas con agitación orbital (180 rpm). Durante la incubación se hizo seguimiento del avance de la reacción de inmovilización midiendo la disminución de la actividad enzimática en el sobrenadante hasta que su valor fue constante, de esta forma se estableció el tiempo de inmovilización. A continuación, el sólido resultante (biocatalizador) se separó de la solución con ayuda de un imán y se removió el sobrenadante de enzima. Luego, cada biocatalizador fue lavado varias veces con 1 mL de *buffer* hasta que el lixiviado de CPO en los lavados fue menor a 0,1 % de la actividad peroxidasa inicial de la enzima. Los biocatalizadores (CPO-CPTMS-NP γ -Fe $_2$ O $_3$ y CPO-CPTMS-NTFe $_3$ O $_4$) se resuspendieron en *buffer* fresco y se almacenaron a 4 °C hasta su uso. En cada caso, tanto el sobrenadante como los lavados fueron conservados para la medición de sus actividades y para la cuantificación de enzima correspondiente.

Para la determinación de la cantidad de CPO inmovilizada y la efectividad de las inmovilizaciones se procedió de la forma descrita en el **numeral 2.7**.

2.9 Determinación de la estabilidad operacional de la CPO libre e inmovilizada

El número de recambio total (NRT) está relacionado con la estabilidad operacional de la enzima. Los valores de NRT se determinaron cuantificando el número de moles de producto (como epóxidos y dioles) que fueron generados por un mol de enzima hasta que ocurre su inactivación. Los productos fueron seguidos y cuantificados por HPLC-PAD a 207 nm (dioles) y 216 nm (epóxidos), previa calibración. Durante el experimento se garantizó un exceso de sustrato y el peróxido de hidrógeno se adicionó a un flujo continuo de 25 nmol s $^{-1}$. Para verificar la inactivación de la enzima, se midió periódicamente la actividad halogenasa de la CPO en el medio de reacción hasta que no hubo actividad detectable.

CAPÍTULO 3

Evaluación de parámetros operacionales de las reacciones de epoxidación con CPO libre

La eficiencia biocatalítica de la CPO está limitada por algunos factores que afectan su estabilidad operacional. Uno de ellos está relacionado con el peróxido de hidrógeno. De acuerdo con antecedentes previos, se sabe que concentraciones elevadas de este compuesto desactivan la CPO por degradación oxidativa del grupo hemo [9,82], por lo que se hace necesario su adición regulada durante las reacciones catalizadas por CPO [30]. Otro factor importante que afecta en general la estabilidad de las enzimas es el uso de co-solvente orgánico en el medio de reacción [13,83], el cual permite la utilización de compuestos orgánicos poco solubles en agua como sustratos para las enzimas. Existen varios reportes del uso de la CPO en mezclas acuosas con co-solvente [3,15,17,18,84,85], siendo algunos de ellos promisorios para su aplicación en biocatálisis. Águila y colaboradores [15] obtuvieron altos números de recambio para la CPO inmovilizada en MCF en reacciones de oxidación de estireno utilizando hasta un 60 %v/v de ACN como co-solvente, mientras que van Deurzen y colaboradores [17] encontraron que el uso de 30 %(v/v) de 2M2P como co-solvente mejoró la eficiencia catalítica de la CPO para las reacciones de oxidación. Por esta razón, se debe hacer una selección adecuada del co-solvente, así como de la proporción en el medio para evitar la desnaturalización de la enzima. En este caso se evaluó el

uso de diferentes co-solventes con el fin de mejorar la eficiencia catalítica de la enzima con el uso de sustratos hidrofóbicos como el estireno y sus derivados.

La selección de las condiciones operacionales de la reacción, además de mejorar la estabilidad operacional de la enzima, permitió obtener los parámetros adecuados para llevar a cabo la epoxidación de derivados del estireno como el 3-cloroestireno y el 3-nitroestireno, los cuales, reaccionaron lentamente con la CPO (presentaron una V_{max} baja) en condiciones de reacción no mejoradas. A continuación, se describen las etapas seguidas para la evaluación de las condiciones de reacción que permitieron finalmente el mejoramiento de la eficiencia catalítica y de la estabilidad operacional de la CPO libre utilizando los sustratos antes mencionados. Inicialmente, se evaluaron las variables más relevantes asociadas con el uso del peróxido de hidrógeno en la biocatálisis de las reacciones de epoxidación.

3.1 Efecto de la concentración del peróxido de hidrógeno

En este experimento se evaluó el efecto de la concentración del peróxido de hidrógeno sobre la actividad específica de la CPO. Se utilizaron concentraciones de peróxido entre 0,5 y 40 mmol L⁻¹, las cuales fueron expresadas en términos de la relación $R_{H_2O_2/CPO}$. En todos los experimentos el peróxido se adicionó en un solo paso y se mantuvieron constantes las concentraciones de CPO (800 nmol L⁻¹) y de estireno (3,0 mmol L⁻¹).

Tal como se observa en la **figura 3.1**, la actividad específica de la CPO aumenta en la medida que la relación $R_{H_2O_2/CPO}$ incrementa, alcanzando su valor máximo entre 12500 y 25000. Para relaciones superiores a esta, la actividad de la enzima cae drásticamente alcanzando un valor cercano a cero para una $R_{H_2O_2/CPO}$ de 10⁵ (la concentración de peróxido en este punto es 40 mmol L⁻¹). El comportamiento inicial de la actividad puede explicarse si se considera el ciclo catalítico de la cloroperoxidasa (ver **figura 3.2**). A partir de este ciclo, se puede

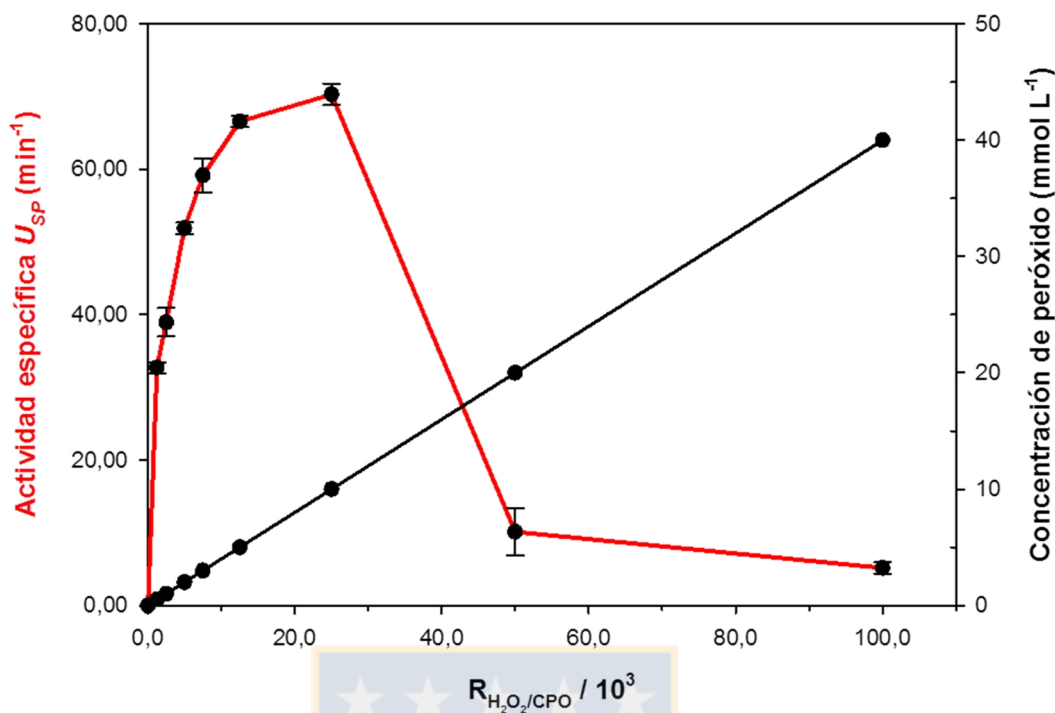


Figura 3.1. Efecto de la relación $R_{H_2O_2}/CPO$ sobre la actividad catalítica de la CPO en la reacción de epoxidación, utilizando estireno $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$ como sustrato y 5 % (v/v) de acetonitrilo como co-solvente en el medio de reacción.

afirmar que la adición de soluciones de peróxido de hidrógeno cada vez más concentradas hace que aumente progresivamente la concentración del compuesto (I) de la CPO, el cual a su vez da lugar al compuesto (II), siendo esta especie la que finalmente reacciona con el estireno para formar el epóxido. A mayor concentración de compuesto II, mayor producción de epóxido y por tanto, mayor actividad [9]. La caída drástica que experimenta la actividad catalítica de la CPO a relaciones $R_{H_2O_2}/CPO$ superiores a 25000 se debe a la desactivación de la enzima por el peróxido, como se mencionó inicialmente. *Manoj y Hager* [9] reportaron este comportamiento de desactivación de la CPO para concentraciones de peróxido superiores a 10 mmol L^{-1} , a un pH de 6,5. En su trabajo utilizaron peróxido de hidrógeno como sustrato y la actividad catalítica máxima se obtuvo para la relación $R_{H_2O_2}/CPO$ de 28500.

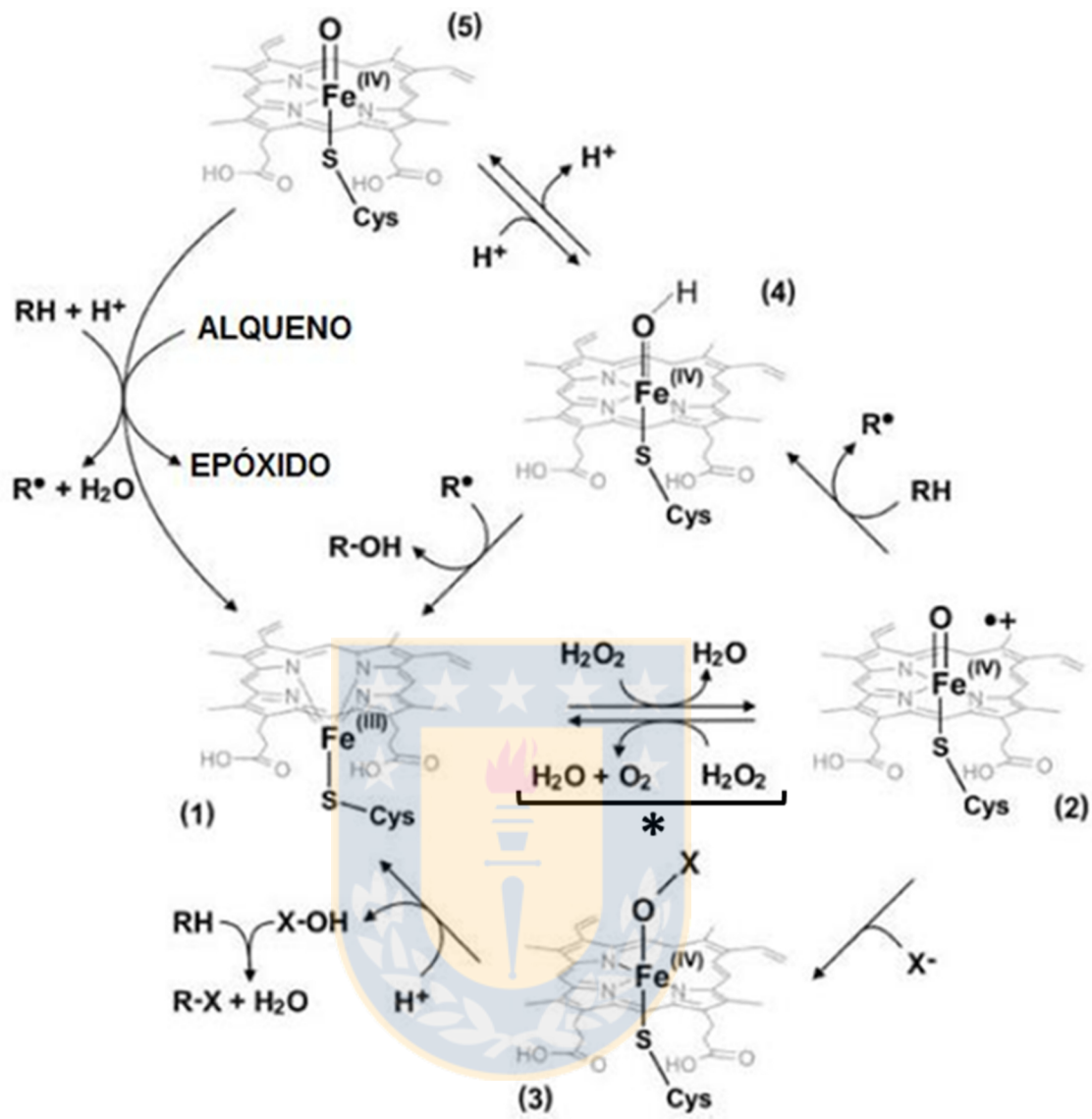


Figura 3.2. Ciclo catalítico de una hemo-tiolato haloperoxidasa. Compuestos y especies intermediarias: (1) enzima férrica en reposo; (2) compuesto I de CPO; (3) compuesto X que libera ácido hipohaloso, HOX; (4) compuesto II protonado; (5) compuesto II de CPO (Tomado de [86], con modificaciones).

A partir de estos resultados se seleccionó una $R_{H_2O_2/CPO}$ de 12500 para los experimentos posteriores. Esta relación permite obtener una actividad enzimática lo suficientemente alta, sin llegar a exponer la enzima a condiciones de peróxido que resulten en su desactivación.

Una vez establecida esta condición, se hizo su evaluación sobre la epoxidación de los sustratos 3-cloroestireno y 3-nitroestireno (datos no mostrados), obteniendo solo ligeras mejoras en la reacción con el derivado halogenado, mientras que con el 3-nitroestireno la cantidad de epóxido obtenido fue apenas detectable. Esto hizo necesario continuar con la evaluación de otros parámetros de la reacción.

3.2 Efecto de la dosificación del peróxido de hidrógeno

Es sabido que la dosificación del peróxido de hidrógeno en las reacciones catalizadas por CPO favorece la generación de productos, y a su vez, reduce el efecto desactivante que ejerce el peróxido sobre la enzima [17,30]. Por esta razón, se decidió ensayar la dosificación del peróxido de hidrógeno correspondiente a la relación $R_{H_2O_2/CPO}$ 12500. Para cada sustrato se evaluó la dosificación del peróxido a diferentes tiempos de reacción (5, 10, 20, 30, 40 y 60 minutos). En todos los casos se mantuvo constante el volumen de solución de peróxido adicionado, mientras que los flujos se ajustaron de acuerdo con el tiempo de reacción a evaluar: 3,0, 1,5, 0,75, 0,50, 0,38 y 0,25 $\mu\text{mol min}^{-1}$, respectivamente. Al completar el periodo de tiempo respectivo, se garantizó que la concentración total de peróxido adicionada fuera 10,0 mmol L^{-1} en el volumen total de reacción, ya que la concentración de sustrato utilizada para las reacciones fue 10,0 mmol L^{-1} . Estos experimentos fueron diseñados de forma tal que la velocidad de dosificación del peróxido de hidrógeno disminuye a medida que se incrementan los tiempos de la reacción.

De acuerdo con los resultados presentados en la **figura 3.3**, se observa que para los tres sustratos evaluados la producción de epóxido aumenta progresivamente con la disminución en la velocidad de dosificación del peróxido (incremento en el tiempo de reacción). Es decir, la adición dosificada y lenta del peróxido de hidrógeno favoreció la formación del epóxido inclusive para aquellos sustratos cuya velocidad de reacción es muy lenta, como el 3-cloroestireno y el

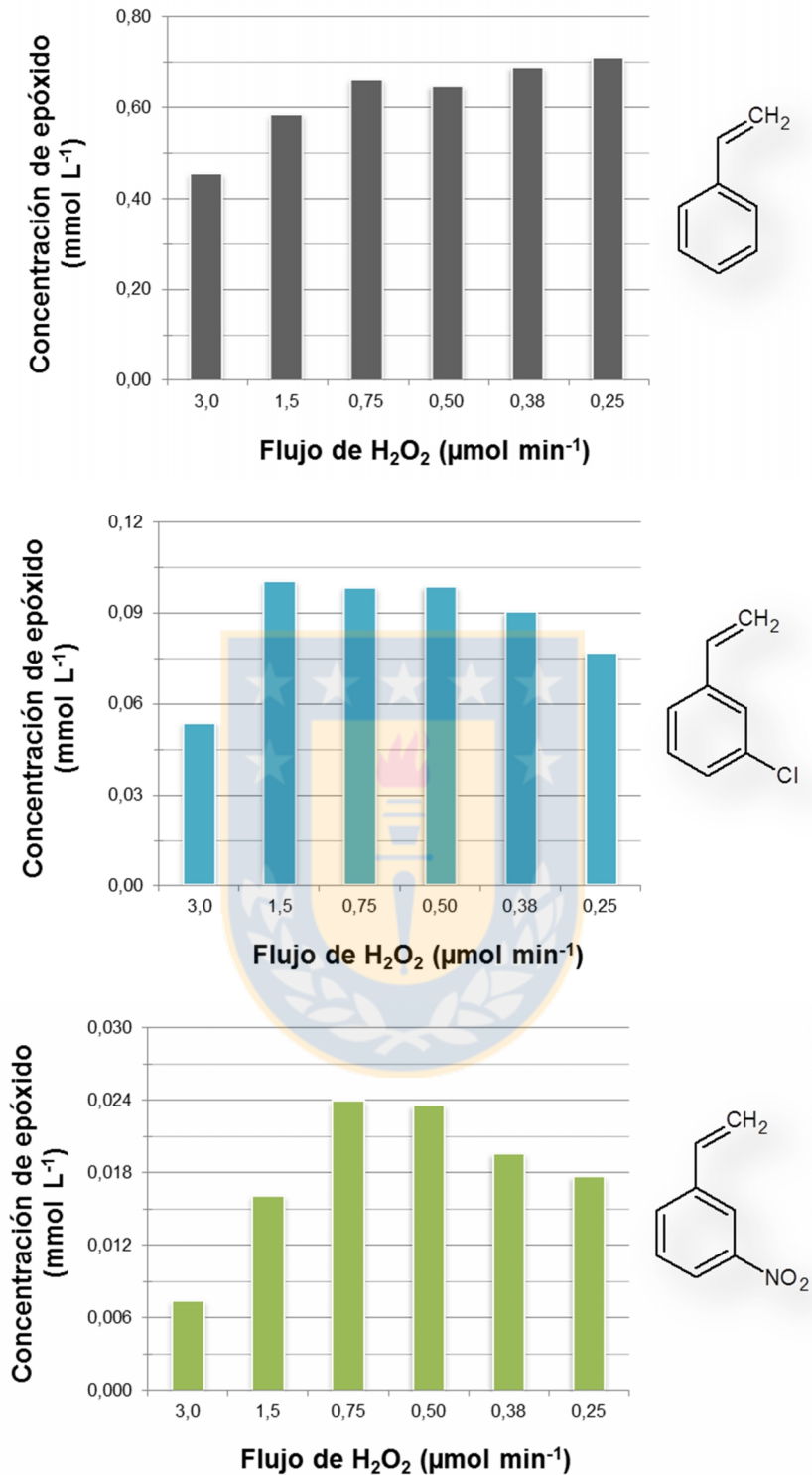


Figura 3.3. Efecto de la velocidad de adición del peróxido de hidrógeno sobre la producción de epóxido a partir de la CPO ($R_{H_2O_2}/CPO = 12500$).

3-nitroestireno, en los experimentos usando una sola adición de peróxido. La estabilización de la concentración de epóxido en el caso del estireno a partir de la reacción de 20 minutos sugiere que para este sustrato la adición de peróxido a $0,75 \mu\text{mol}_{\text{H}_2\text{O}_2} \text{min}^{-1}$ da lugar a la mayor cantidad de epóxido. En el caso del 3-nitroestireno y 3-cloroestireno, esta velocidad fue de $0,75$ y $1,5 \mu\text{mol}_{\text{H}_2\text{O}_2} \text{min}^{-1}$, respectivamente. De acuerdo con estos resultados, se estableció que la dosificación de H_2O_2 debe realizarse a una velocidad que no supere los $1,5 \mu\text{mol}_{\text{H}_2\text{O}_2} \text{min}^{-1}$.

La ventaja que tiene la dosificación del peróxido en el tiempo de reacción sobre su adición en una sola dosis es que se desfavorece la reacción de descomposición de H_2O_2 por la CPO (acción catalasa) y se favorece la reacción de epoxidación [87]. Para ilustrar mejor este fenómeno consideremos el ciclo catalítico de las hemo-tiolato haloperoxidasas, aplicable a la cloroperoxidasa (**figura 3.2**). Inicialmente, la enzima reacciona con el peróxido de hidrógeno para formar el compuesto (I) de la CPO; si hay H_2O_2 en exceso, este reaccionará con el compuesto (I) vía acción catalasa, de acuerdo con la reacción señalada con asterisco en esta figura, con lo cual se disminuye la disponibilidad del compuesto (I) para continuar en la vía de formación de los epóxidos. Cuando la concentración de H_2O_2 en el medio es baja, el compuesto (I) de la CPO formado inicialmente, estará disponible para continuar hacia la formación del compuesto (II), que es la especie que finalmente reacciona con el sustrato para dar la reacción de epoxidación [9]. Lo anterior explica el hecho importante de que solo bajo estas condiciones es posible la obtención de cantidades cuantificables del epóxido correspondiente al 3-nitroestireno, ya que esto no es posible lograrlo en condiciones donde la concentración efectiva de H_2O_2 es elevada. Cuando se tienen cantidades bajas de H_2O_2 se desfavorece la acción catalasa de la CPO y aumenta la probabilidad de formación del compuesto (II), con lo cual se favorece la ruta de la reacción de este compuesto (II) con el 3-nitroestireno.

Una vez controladas las variables asociadas al peróxido de hidrógeno, se procedió a seleccionar un co-solvente que favoreciera la biocatálisis de las

reacciones de epoxidación del estireno y de sus derivados 3-cloroestireno y 3-nitroestireno.

3.3 Efecto del tipo y contenido de co-solvente

Los solventes seleccionados para la realización de estos experimentos fueron acetonitrilo (ACN), 2-metil-2-propanol (2M2P) y 2-metil-2-butanol (2M2B). El ACN [15,18] y el 2M2P [17,88] se han utilizado previamente en reacciones enzimáticas catalizadas por CPO, mientras que el solvente 2M2B ha sido utilizado en aplicaciones biocatalíticas con diferentes enzimas, entre las que se incluyen lipasas [19,89,90], beta-galactosidasa [20] y diferentes hidrolasas [21]. Por otra parte, estos solventes presentan diferencias en su hidrofiliidad y en su polaridad, las cuales podrían tener efectos marcados sobre la estabilidad y la actividad de la enzima [13].

Algunos ensayos preliminares realizados con ACN y 2M2P (**figura 3.4**) mostraron que la actividad específica de la CPO fue muy similar en los dos casos para un contenido de co-solvente de 5 %(v/v). Sin embargo, el aumento en el contenido de co-solvente de 5 a 15 %(v/v) redujo en 66 % la actividad específica de la enzima para el caso del ACN, mientras que con 2M2P la actividad aumentó en casi 50 %. Este efecto podría estar relacionado con la diferencia de polaridades entre estos solventes. La estructura nativa de las proteínas es mantenida por un balance complejo de interacciones no covalentes, tales como enlaces de hidrógeno e interacciones iónicas, van der Waals e hidrofóbicas, en las cuales el agua juega un papel importante para promover muchas de estas interacciones. Por lo tanto, el desplazamiento de las moléculas de agua por la presencia de solventes orgánicos pueden interrumpir este balance de fuerzas, conduciendo al desdoblamiento de la proteína [91]. Particularmente, aquellos solventes polares que pueden penetrar en la proteína son capaces de inducir más cambios en su estructura secundaria y terciaria en comparación con los solventes apolares, los cuales carecen de la habilidad de particionarse a través de la esfera externa polar

de una proteína [92,93]. Debido a esto, a menudo se observa una mayor actividad catalítica en los solventes no polares. Esta paradoja puede ser un resultado parcial de la explicación anterior, en la cual los solventes polares son capaces de penetrar en la estructura tridimensional de la proteína, dando como resultado su perturbación estructural [93]. Este fenómeno fue evidenciado por Yang y colaboradores [94], quienes a través de simulaciones de dinámica molecular evaluaron el efecto de diferentes moléculas de solventes orgánicos (octanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano) sobre la hidratación de la subtilisina BPN' y sobre el enlazamiento del solvente en el sitio activo. Sus experimentos mostraron una dependencia inversa entre la actividad enzimática y la polaridad del medio orgánico empleado. Considerando lo anterior, se podría afirmar que posiblemente la mayor polaridad del ACN hace que este solvente interaccione de forma más íntima con la enzima, afectando aquellas moléculas de agua que son importantes para la conservación de su estructura tridimensional, especialmente la del sitio activo de la enzima. En cambio, el 2M2P mucho menos polar y más hidrofóbico que el ACN (ver **tabla 3.1**), podría interactuar principalmente con la superficie de la enzima sin llegar a desplazar las moléculas de agua que intervienen en el balance de fuerzas que estabilizan la estructura tridimensional del sitio activo, sin

Tabla 3.1. Algunas propiedades fisicoquímicas de los solventes utilizados como co-solventes en las reacciones de epoxidación y la fracción molar de estireno en el medio de reacción con 15 %(v/v) de co-solvente.

Co-solvente	Coefficiente de Partición, $\text{Log } P$ [95]	Constante dieléctrica, ϵ [96]	Fracción molar X_{estireno} (20 °C)*
ACN	-0,34	36,6 (20 °C)	0,623
2M2P	0,80	12,5 (25 °C)	0,459
2M2B	1,4	5,8 (25 °C)	0,111

* Medidas realizadas por HPLC.

afectar de manera importante su actividad catalítica. Por otra parte, los contenidos muy bajos de estos co-solventes (inferiores al 5 %(v/v)) tendrían un efecto similar sobre la estructura tridimensional de la enzima y de su sitio activo, lo cual se refleja en los valores de actividad catalítica tan cercanos que presentó la enzima con estos dos solventes bajo esta condición.

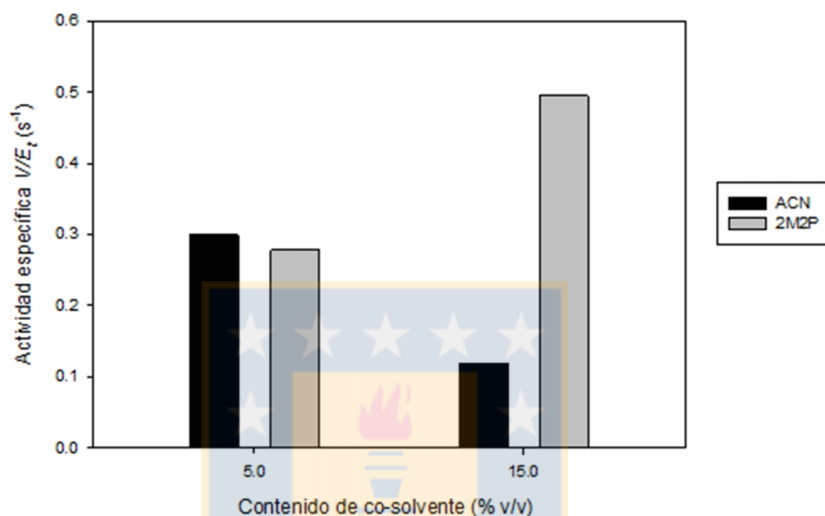


Figura 3.4. Efecto del contenido de co-solvente (ACN y 2M2P) sobre la actividad específica de la CPO. Se utilizó estireno $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ y una $R_{H_2O_2}/CPO$ de 1250.

Con base en estos resultados, y pensando en mejorar la solubilidad del estireno y sus derivados en el medio de reacción, se decidió incrementar el contenido de co-solvente a 15 %(v/v). Bajo esta nueva condición de reacción, se procedió a evaluar el efecto del tipo de co-solvente (ACN, 2M2P y 2M2B) sobre la actividad catalítica de la CPO, por medio de la determinación de los parámetros catalíticos correspondientes.

La **figura 3.5** presenta la epoxidación del estireno en un medio que contiene 15 %(v/v) de diferentes co-solventes orgánicos. Aquí se observa claramente que el 2M2P favorece la actividad catalítica de la CPO para la reacción de epoxidación, mientras que con ACN la enzima mostró la actividad más baja. Los datos cinéticos

obtenidos fueron ajustados a la ecuación de Hill para poder estimar los parámetros catalíticos k_{cat} y K' de la CPO (ver **tabla 3.2**). El 2M2P mostró la constante catalítica más alta y el K' más bajo para el estireno. Por otra parte, los valores de K' para el 2M2P y el 2M2B fueron similares, mientras que con ACN su valor fue al menos 4 veces más grande que el presentado en estos dos solventes. Ahora bien, podría considerarse que los valores de K' son equivalentes a la constante de Michaelis K_m debido a que los valores de n son muy cercanos a 1 para los modelos cinéticos obtenidos de los tres solventes. De esta forma, los valores de K' en los primeros dos solventes pueden indicar una afinidad más grande del complejo enzima-sustrato en comparación con el ACN. Adicionalmente, los valores de k_{cat}/K' indican la especificidad de la enzima por el sustrato, la cual, para los casos en los que se utilizó 2M2P y 2M2B, fue 6,2 y 3,0 veces más grande, respectivamente, que para el caso donde se utilizó ACN.

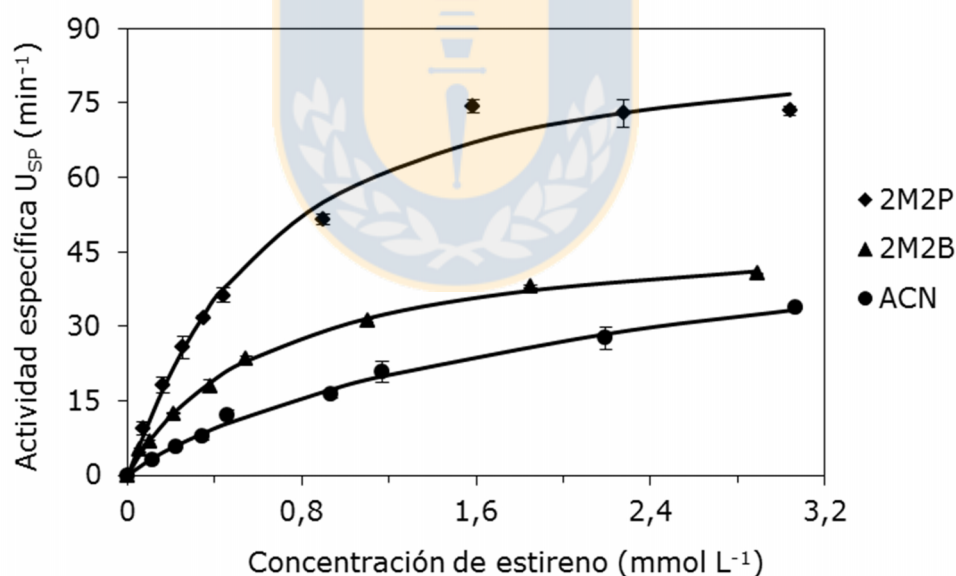


Figura 3.5. Efecto del tipo de co-solvente sobre las curvas de actividad específica de la CPO para la reacción de epoxidación del estireno: acetonitrilo (ACN), 2-metil-2-butanol (2M2B) y 2-metil-2-propanol (2M2P). Se utilizó un contenido de co-solvente de 15 % (v/v) y una $R_{H_2O_2}/CPO$ de 1250.

Tabla 3.2. Parámetros cinéticos de las reacciones de epoxidación del estireno catalizadas por CPO, utilizando 15 %(v/v) de co-solvente orgánico en el medio de reacción y una $R_{H_2O_2}/CPO$ de 1250^a.

Co-solvente	k_{cat} (min^{-1})	K' ($\text{mmol}^n \text{L}^{-n}$)	(k_{cat}/K')	n	Ajuste del modelo (R^2)
ACN	66 ± 1	$2,7 \pm 0,1$	24	$0,9 \pm 0,1$	0,986
2M2B	51 ± 3	$0,7 \pm 0,1$	73	$1,0 \pm 0,1$	0,992
2M2P	89 ± 3	$0,6 \pm 0,1$	148	$1,1 \pm 0,1$	0,987

^a Para las condiciones experimentales ver la sección 2.5.

El comportamiento anterior puede explicarse considerando la capacidad que tiene el solvente de estabilizar o desestabilizar al complejo [E:S] con respecto a los reactantes E+S, y al estado de transición [E:S][‡] con respecto a [E:S]. La diferencia de energía entre los estados E+S y [E:S] (energía libre de estabilización ΔG_C) define a K_m , mientras que la diferencia de energía entre [E:S] y [E:S][‡] (energía libre de activación ΔG_{cat}^\ddagger) está relacionado con k_{cat} . Entre más pequeños sean ΔG_C y ΔG_{cat}^\ddagger , más grandes serán K_m y k_{cat} , respectivamente (**figura 3.6**) [83].

Considerando el análisis anterior, en conjunto con los parámetros catalíticos observados en la **tabla 3.2** y la miscibilidad del estireno en el medio con los diferentes co-solventes utilizados (ver **tabla 3.1**), se puede decir que: i) tanto el 2M2P como el 2M2B estabilizan más al complejo [E:S] comparados con el ACN, ya que en estos dos solventes se obtuvieron los valores de K' más bajos (mayor ΔG_C) y, por otra parte, el estireno presentó una mayor miscibilidad en el medio que contiene ACN, lo que explicaría el mayor valor de K' en este medio; y ii) el 2M2P estabiliza más al estado de transición [E:S][‡] en comparación con el 2M2B y el ACN, debido a la mayor actividad catalítica (k_{cat}) mostrada por la enzima en este medio (implica una menor ΔG_{cat}^\ddagger).

Con el análisis anterior sería posible tener una idea de la hidrofobicidad y polaridad de las especies que se están considerando (intermediarios y estados de

transición), con base en las propiedades de los solventes que los estabilizan (ver **tabla 3.1**).

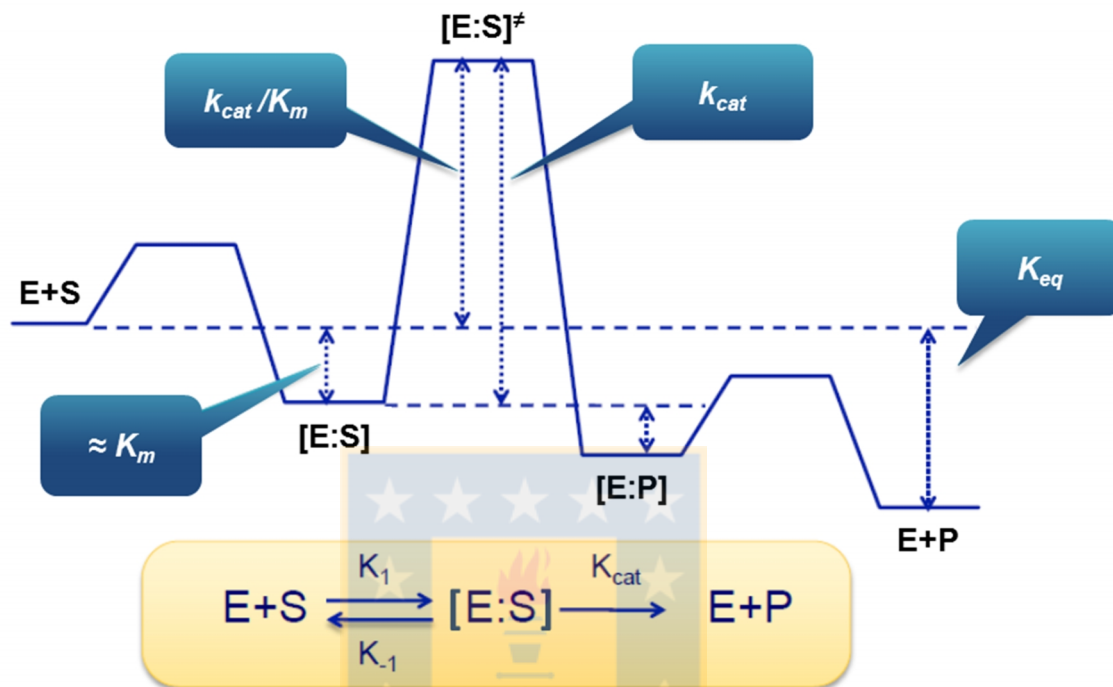


Figura 3.6. Relación entre los parámetros catalíticos de una reacción enzimática y las energías libres de Gibbs.

Subsecuentemente se evaluaron diferentes concentraciones de 2M2P en el medio de reacción con el fin de reducir las limitaciones por transferencia de masa de los sustratos insolubles en medio acuoso (**Figura 3.7**). Además, es bien sabido que la presencia de co-solventes orgánicos en la mezcla de reacción es un factor importante que afecta la estabilidad general de las enzimas [13]. El efecto del contenido de co-solvente se evaluó para tres sustratos: estireno, 3-cloroestireno y 3-nitroestireno. La actividad enzimática de la CPO aumentó para todos los sustratos con el incremento en la concentración de 2M2P desde 5 a 15 %v/v, encontrándose las actividades máximas entre 10 y 15 %v/v de co-solvente. Los resultados también mostraron claramente que la enzima se inactivó a

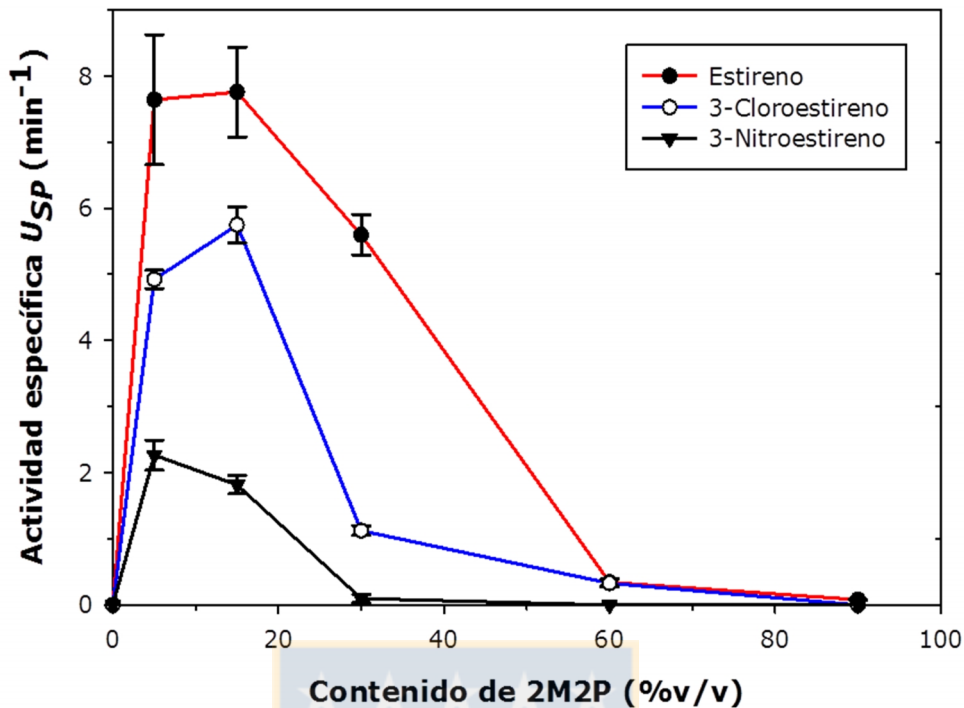


Figura 3.7. Efecto del contenido de 2M2P sobre la actividad específica de la CPO para la reacción de epoxidación llevada a cabo a pH 6,0. Condiciones de la reacción: 0,2 mM de sustrato, 0,2 $\mu\text{mol min}^{-1}$ de H_2O_2 (1 μmol total adicionado), una $R_{\text{H}_2\text{O}_2}/\text{CPO}$ de 1250, 20 °C, 400 rpm y 5 minutos de reacción.

concentraciones de co-solvente superiores a 20 %(v/v), presumiblemente por la alteración conformacional del sitio activo [97]. Aunque existen algunos reportes relacionados con el uso de mezclas de co-solvente acuosas en reacciones catalizadas por la CPO [3,15,17,18], la elección racional de co-solventes orgánicos no ha sido fácil, incluso se han reportado algunas aproximaciones para establecer su elección racional termodinámica [19–21,89,90,98].

Con base en los resultados obtenidos en esta sección se eligió el 2M2P como co-solvente en una proporción del 15 %(v/v) debido a la mayor eficiencia catalítica que mostró la CPO bajo estas condiciones.

3.4 Parámetros catalíticos y estabilidad operacional de la CPO libre

Una vez establecidas todas las condiciones operacionales de la reacción de epoxidación se procedió a llevar a cabo la determinación de los parámetros catalíticos y la estabilidad operacional de la CPO libre con el estireno y cuatro estirenos *m*-sustituídos, dos de ellos con grupos sustituyentes sustractores de densidad electrónica (grupos $-\text{Cl}$ y $-\text{NO}_2$) y otros dos con grupos dadores de densidad electrónica (grupos $-\text{CH}_3$ y $-\text{NH}_2$), con el fin de observar posibles efectos electrónicos sobre la biocatálisis de las reacciones de epoxidación. Las condiciones establecidas fueron: relación peróxido/enzima ($R_{\text{H}_2\text{O}_2/\text{CPO}}$) de 1250 al final de la reacción, una adición controlada de H_2O_2 a $0,2 \mu\text{mol min}^{-1}$, 15 % (v/v) de 2M2P como co-solvente, una temperatura de $20 \text{ }^\circ\text{C}$ y un tiempo de reacción de 5 minutos. La estabilidad operacional fue expresada en términos del número de recambio total (NRT), calculado como las moles totales de producto (epóxidos y dioles) generados por mol de enzima hasta su inactivación completa. Para la determinación de este parámetro, los tiempos de reacción fueron superiores a 150 minutos.

En la **tabla 3.3** se registran los parámetros catalíticos k_{cat} y K' de la CPO para los diferentes sustratos, así como los valores del número de recambio total (NRT). Los parámetros catalíticos fueron obtenidos a partir del ajuste de los datos cinéticos a la ecuación de Hill. De acuerdo con los valores de k_{cat} , se evidencia claramente la mayor actividad catalítica de la CPO con el 3-aminoestireno (3869 min^{-1}), siendo 43 veces más rápida en comparación con el estireno (90 min^{-1}) y casi 300 veces más rápida que en la reacción con el 3-nitroestireno (13 min^{-1}) donde la enzima presentó su menor actividad. En cambio, las actividades enzimáticas en los casos del 3-metilestireno (58 min^{-1}) y del 3-cloroestireno (25 min^{-1}) fueron solo 4,5 y 2 veces superiores a la presentada con el nitro derivado, respectivamente, e inferiores a la actividad mostrada con el estireno. De esta manera, se establece un orden de actividad catalítica de la CPO basado en las

Tabla 3.3. Parámetros catalíticos y estabilidad operacional de la CPO libre en las reacciones de epoxidación del estireno y de algunos derivados *m*-sustituídos, utilizando 15 %(v/v) de 2M2P como co-solvente, 0,2 $\mu\text{mol min}^{-1}$ de H_2O_2 , una $\text{RH}_2\text{O}_2/\text{CPO}$ de 1250 al final de la reacción.

Sustrato*	k_{cat} (min^{-1})	K' ($\text{mmol}^n \text{L}^{-n}$)	k_{cat}/K'	n	Ajuste del modelo (R^2)	NRT
STR	90 ± 6	$0,73 \pm 0,19$	123	$1,1 \pm 0,1$	0,999	6700
3-Cl	25 ± 1	$0,39 \pm 0,04$	64	$1,2 \pm 0,2$	0,980	1920
3- NO_2	13 ± 2	$6,7 \pm 1,2$	1,9	$1,2 \pm 0,2$	0,994	690
3- CH_3	58 ± 1	$0,26 \pm 0,03$	223	$2,0 \pm 0,2$	0,985	1360
3- NH_2	3869 ± 309	$0,42 \pm 0,08$	9212	$0,9 \pm 0,1$	0,992	18510

* STR: estireno, 3-Cl: 3-cloroestireno; 3- NO_2 : 3-nitroestireno; 3- CH_3 : 3-metilestireno; 3- NH_2 : 3-aminoestireno.

constantes catalíticas obtenidas con cada uno de los sustratos evaluados:

3-aminoestireno \gg estireno $>$ 3-metilestireno $>$ 3-cloroestireno $>$ 3-nitroestireno

En esta oportunidad también se encontró que en la mayoría de los casos (excepto para el 3-metilestireno) el valor de n es cercano a 1,0 en la ecuación de Hill, y por tanto, K' será igual a la constante de Michaelis K_m . En este sentido, se puede decir que las mayores afinidades del complejo [E:S] se dieron en los casos del estireno, 3-aminoestireno y 3-cloroestireno, cuyos valores fueron similares, mientras que la afinidad más baja se presentó con el 3-nitroestireno. En relación con los valores de especificidad (k_{cat}/K') de la enzima por el sustrato, se encontró que para el 3-aminoestireno y el estireno estas constantes fueron 4850 y 65 veces más altas, respectivamente, que la presentada para el 3-nitroestireno. La mayor especificidad presentada hacia el 3-aminoestireno estuvo determinada por su alto k_{cat} (3869 min^{-1}), y por el bajo K' ($0,42 \text{ mmol L}^{-1}$), lo cual, en términos de los diagramas de energía de la reacción, sería indicativo de una energía de activación

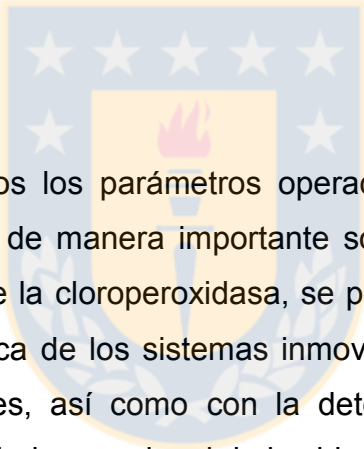
pequeña (ΔG_{cat}^*) y de una alta energía libre de estabilización (ΔG_C), mientras que la baja especificidad para el 3-nitroestireno estuvo determinada por su menor k_{cat} (13 min^{-1}) y en buena parte por su alto valor de K' ($6,7 \text{ mmol L}^{-1}$), lo que estaría asociado a una ΔG_{cat}^* alta y una ΔG_C baja (ver **figura 3.7**).

En lo relacionado con la estabilidad operacional de la CPO libre, se observa que la enzima presentó el valor de NRT más alto con el 3-aminoestireno (NRT=18510), mientras que el valor más bajo se obtuvo con el 3-nitroestireno (NRT=690). La tendencia general observada para este parámetro es: 3-aminoestireno > estireno > 3-cloroestireno > 3-metilestireno > 3-nitroestireno. Considerando los parámetros catalíticos y los datos de estabilidad operacional de la CPO (**tabla 3.3**), se observa que existe una correlación directa entre los valores de NRT y la actividad catalítica (k_{cat}), excepto en el caso del 3-metilestireno. Esta correlación explicaría la tendencia observada en los valores de NRT de la CPO con los diferentes sustratos.

Finalmente, es importante resaltar que el valor obtenido de NRT para el estireno de 6700 es aproximadamente 4,5 veces más grande que el valor reportado por Zaks y Dodds para este mismo compuesto (NRT = 1500) [99], el cual fue medido a pH 5, con flujo continuo de H_2O_2 y en ausencia de co-solvente. Lo anterior indica que los ajustes realizados a las condiciones de la reacción mejoraron en buena medida la eficiencia catalítica y la estabilidad operacional de la CPO.

CAPÍTULO 4

Biocatálisis de las reacciones de epoxidación utilizando CPO inmovilizada en materiales nanoestructurados no magnéticos de sílice y titanía



Una vez establecidos los parámetros operacionales de las reacciones de epoxidación que influyen de manera importante sobre la actividad catalítica y la estabilidad operacional de la cloroperoxidasa, se procedió con la preparación y la caracterización biocatalítica de los sistemas inmovilizados, previa caracterización de los diferentes soportes, así como con la determinación de los parámetros catalíticos y de la estabilidad operacional de los biocatalizadores.

4.1 Caracterización de los soportes

Los materiales nanoestructurados no magnéticos utilizados como soportes para la inmovilización de la CPO fueron el MCF, el MSU-F, el $\text{TiO}_2(\text{AN})$ y el $\text{TiO}_2(\text{NT})$. Los dos primeros materiales son espumas celulares mesoestructuradas silíceas, los cuales poseen estructuras mesoporosas de poros ultra-grandes continuos, con celdas esféricas grandes interconectadas por ventanas uniformes [100]. A pesar de que estos dos soportes tienen características fisicoquímicas similares, únicamente el MCF ha sido utilizado ampliamente para la inmovilización

de enzimas [15,39,40]; no hay en la literatura reportes del uso de MSU-F para este propósito, ni del uso como soporte para otro tipo de biomoléculas. Por otra parte, el $\text{TiO}_2(\text{AN})$ y el $\text{TiO}_2(\text{NT})$ son también materiales mesoporosos con estructura cristalina definida, pero que se diferencian en su morfología, el primero tiene forma de partículas prismáticas y el segundo de nanotubos [75]. Aunque la aplicación del TiO_2 como soporte en catálisis heterogénea es abundante, sus aplicaciones en biocatálisis son bastante escasas. En la **figura 4.1** se presentan las micrografías TEM obtenidas para el MSU-F y el $\text{TiO}_2(\text{AN})$, donde se puede observar su morfología.

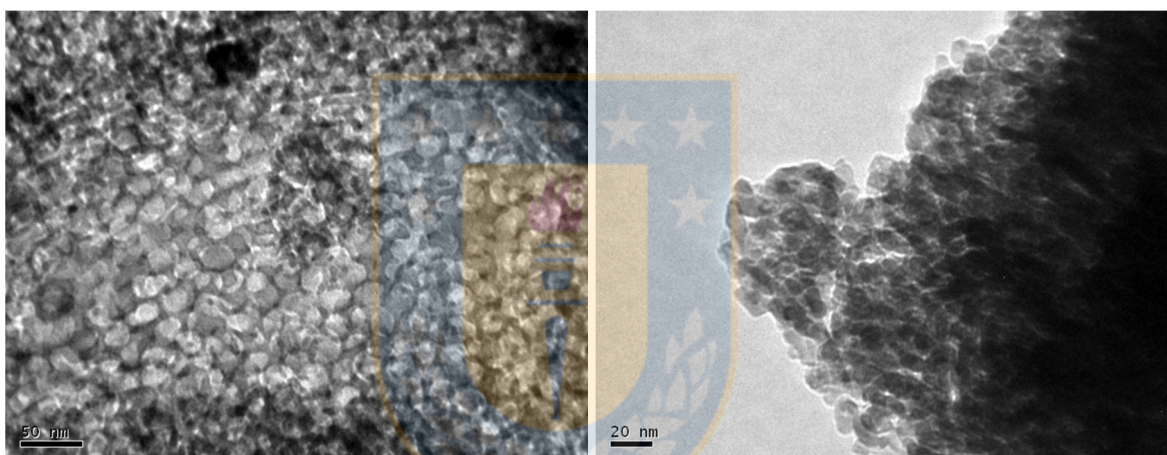


Figura 4.1. Micrografías TEM del MSU-F (izquierda) y del $\text{TiO}_2(\text{NT})$ (derecha).

En la **tabla 4.1** se resumen las principales características texturales de los materiales utilizados, así como sus puntos isoeléctricos (PI). A partir de los diámetros de poro se puede decir que todos los materiales son candidatos adecuados para la inmovilización de CPO, ya que las dimensiones de la enzima (5,3 nm x 4,6 nm x 6,0 nm) son más pequeñas que los diámetros de poro de estos soportes permitiendo la difusión de la enzima hacia los poros [40,101]. Además, la CPO tiene un PI cercano a 4,0 [102] que difiere del PI de cada uno de los materiales empleados, lo que permite llevar a cabo la inmovilización de la enzima por interacción electrostática con solo ajustar el pH del medio a un valor

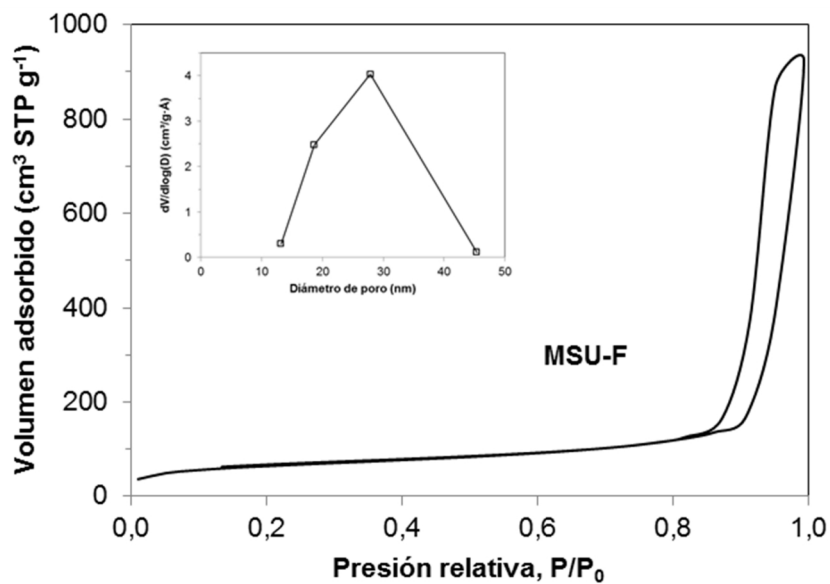
Tabla 4.1. Caracterización de los materiales nanoestructurados utilizados como soporte para la inmovilización de CPO.

Soporte	Superficie específica ^a BET (m ² g ⁻¹)	Volumen total de poro ^b (cm ³ g ⁻¹)	$D_{P(BJH)}^c$ (nm)	PI
MCF	588	2,00	12,1	2,3
MSU-F	225	1,50	29,9	2,2
TiO ₂ (AN)	146	0,30	8,3*	5,8
TiO ₂ (NT)	313	0,66	10,2	5,2

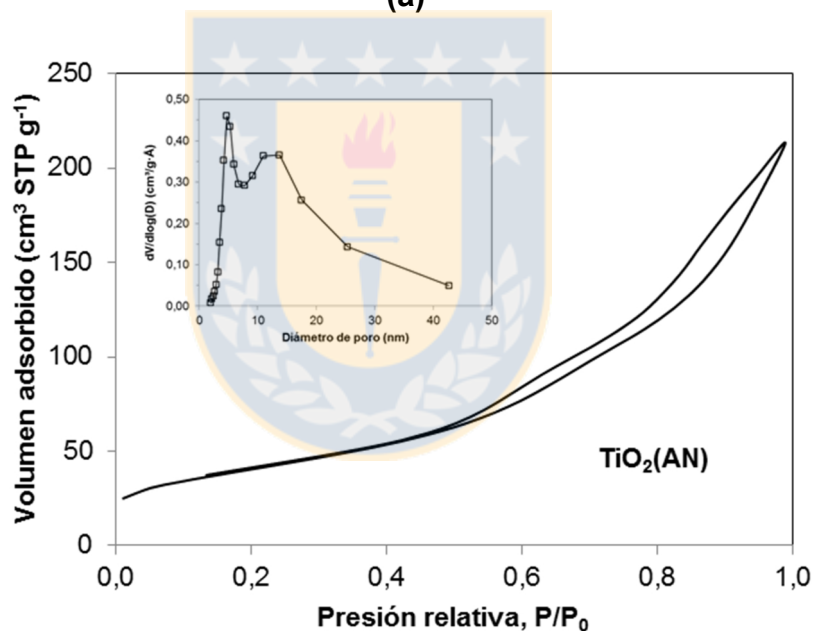
^a Calculada utilizando el método Brunauer-Emmett-Teller BET.
^b Calculado utilizando el método Barrett-Joyner-Halenda BJH.
^c Diámetro de poro, D_P , determinado a partir de la rama de desorción.
* Distribución bimodal de poros (4,8 y 12,4 nm, respectivamente).

intermedio entre los puntos isoelectrónicos de la enzima y del soporte correspondiente.

De acuerdo con las isotermas de adsorción/desorción de N₂ a 77 K obtenidas para estos materiales (**figura 4.2**) y según la clasificación de isotermas de la IUPAC [103], todos los materiales mostraron isotermas de adsorción tipo IV, aunque con diferentes ciclos de histéresis. Tanto el MCF como el MSU-F presentaron ciclos de histéresis tipo H1 en un rango de presiones relativas de 0,5 a 1,0 y 0,8 a 1,0, respectivamente, indicando que poseen aglomerados de poros esféricos compactados con diámetros uniformes, típicos de las espumas mesocelulares [56,104]. Estos dos materiales presentaron una distribución de diámetros de poros ancha (unimodal) con valores máximos en torno a 12 y 30 nm, respectivamente. Por otra parte, el TiO₂(AN) mostró un ciclo de histéresis tipo H3 que corresponde a un sistema mesoporoso desordenado. Su distribución de diámetros de poro fue bimodal con un valor promedio de 8,3 nm, mostrando una distribución estrecha con un valor máximo en 4,8 nm, y otra distribución bastante amplia (se extiende desde los 8 hasta los 40 nm, aproximadamente) con un valor



(a)



(b)

Figura 4.2. Isothermas de adsorción/desorción de nitrógeno para el MSU-F (a) y el $\text{TiO}_2(\text{AN})$ (b). Los recuadros muestran la distribución de tamaños de poro calculadas a partir de la rama de desorción de las isothermas utilizando el método BJH. Las isothermas correspondientes a MCF y $\text{TiO}_2(\text{NT})$ están reportadas en [15] y [75], respectivamente.

máximo en 12,4 nm (ver recuadro de la **figura 4.2 (b)**). Dada la distribución de tamaños de poro observada para este material, podría sugerirse que sus poros presentan forma de “embudo”, presentando diámetros de poro mayores a 8 nm por un extremo y valores menores a este por el otro extremo. En el caso del TiO₂(NT), se reportó que este material presenta un ciclo de histéresis intermedio entre H1 y H3, correspondiente a poros estrechos tipo canal, lo cual concuerda con la morfología observada en las micrografías TEM de estos nanotubos [75]. Este soporte presentó una distribución de tamaños de poro estrecha (unimodal) en torno a 10,2 nm.

Las diferentes características texturales y morfologías que presentaron estos materiales podrían generar algún efecto sobre la actividad específica de la CPO inmovilizada y también en su estabilidad operacional [34,105]. Estos aspectos serán analizados y discutidos en las secciones siguientes.

4.2 Inmovilización de la CPO en materiales nanoestructurados no magnéticos

La inmovilización de proteínas sobre la superficie de sílice involucra interacciones débiles, tales como enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas y atracciones de van der Waals [106]. Si existe interacción electrostática entre las cargas opuestas de los residuos de aminoácidos superficiales de las moléculas de enzima y la superficie de material, se logra mejorar la adsorción de la enzima y minimizar su desprendimiento. La carga total en la superficie de la enzima y en la superficie del material se puede controlar variando el pH de la solución. Una interacción atractiva entre la enzima y el soporte se obtiene a un valor de pH entre el punto de carga cero del material y el punto isoeléctrico de la enzima específica.

La cloroperoxidasa fue inmovilizada por interacción electrostática en estos materiales nanoestructurados aprovechando la diferencia entre los puntos

isoelectrónicos de los materiales y el *PI* de la enzima. En el caso de los soportes basados en sílice, la inmovilización de la CPO se llevó a cabo a pH 3,0, garantizando bajo estas condiciones que la carga neta global de la enzima es positiva y la de los materiales negativa (el *PI* tanto del MSU-F como del MCF es ~ 2,0). Por otro lado, la inmovilización de CPO en los materiales basados en titania se realizó a pH 5,0, de tal forma que la carga neta global de la enzima es negativa, mientras que la de los materiales es positiva (*PI* ~ 5,8 para el TiO₂(AN) y ~ 5,2 para el TiO₂(NT)).

Una vez obtenidos los sistemas inmovilizados, se procedió a su caracterización biocatalítica y a la determinación de algunos parámetros que describen la eficacia del proceso de inmovilización en cada caso. Estos resultados fueron condensados en la **tabla 4.2**. Allí se observa que, en términos generales, los soportes basados en sílice presentan cargas de enzima más altas con respecto a los materiales de titania, lo cual estaría directamente asociado con las propiedades texturales que presentan las espumas mesocelulares. En el caso particular de los silicatos mesoporosos no se observa ninguna relación entre la carga de CPO y propiedades texturales tales como la superficie específica y el volumen total de poro. Sin embargo, se observa que la carga enzimática aumenta con el correspondiente aumento en el diámetro de poro entre el MCF y el MSU-F. Este hecho podría estar relacionado con la formación de agregados de CPO al interior de los poros, cuyos tamaños dependerán del diámetro de las cavidades (ver **tabla 4.1**). Según Jung y colaboradores [39], las enzimas se agregan naturalmente en las cavidades de los silicatos tipo espumas mesocelulares por el proceso de adsorción y a continuación los agregados crecen de forma controlada según el tamaño de las cavidades, lo cual estuvo de acuerdo con la mayor carga observada en el material con un mayor diámetro de poro (MSU-F).

Con respecto a las inmovilizaciones realizadas en los materiales de titania, tampoco se observó correlación alguna entre la carga de enzima y las diferentes propiedades texturales de estos soportes. A pesar que el TiO₂(NT) presenta mayor superficie específica, mayor volumen total de poro y mayor diámetro de poro en

Tabla 4.2. Caracterización biocatalítica de los biocatalizadores obtenidos utilizando materiales nanoestructurados.

Biocatalizador	Carga ($\text{nmol}_{\text{CPO}} \text{g}^{-1}_{\text{SOP}}$)	Actividad específica ^a ($\text{U g}^{-1}_{\text{SOP}}$)	E_I (%)
CPO/MCF	3184	1301	9
CPO/MSU-F	6807	6406	18
CPO/TiO ₂ (AN)	1781	260	3
CPO/TiO ₂ (NT)	169	258	26

^a Calculada como actividad peroxidasa. Las unidades reportadas para actividad específica son equivalentes a $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}_{\text{SOP}}$.

comparación con el TiO₂(AN), su carga de enzima fue casi 10 veces menor ($169 \text{ nmol}_{\text{CPO}} \text{g}^{-1}_{\text{SOP}}$) a la carga observada en la titania anatasa ($1781 \text{ nmol}_{\text{CPO}} \text{g}^{-1}_{\text{SOP}}$). Existen dos factores que podrían estar relacionados con la tendencia observada para la carga de enzima en estos dos materiales. Uno de ellos es la cercanía entre el *PI* del TiO₂(NT) y el pH de inmovilización (pH 5,0), lo cual pudo generar una superficie del sólido casi neutra, lo que daría lugar a interacciones electrostáticas más débiles con la CPO, y por consiguiente, una carga baja de enzima. Para el caso del TiO₂(AN) ocurre lo contrario, la diferencia entre su *PI* y el pH de inmovilización es mayor, lo que podría conducir a una carga neta más positiva en la superficie del soporte e interacciones electrostáticas más fuertes con la enzima, lo que garantizaría una mayor cantidad de enzima inmovilizada. El otro factor que tendría relación con la carga de enzima observada en los soportes basados en titania es la diferencia de morfologías entre los dos materiales, ya que se sabe que algunas características como la estructura tridimensional de los poros y la interconectividad entre ellos pueden facilitar o evitar la pérdida de enzima durante el proceso de lavado de los biocatalizadores con los *buffers* respectivos [107]. Los poros con forma de embudo que presentaría el TiO₂(AN) (véase **sección 4.1**) tendrían la capacidad de retener mayor cantidad de enzima en comparación con

los nanotubos de TiO_2 (poros tipo canal), ya que uno de los extremos de los poros presenta diámetros inferiores a las dimensiones de la CPO lo que evitaría la pérdida de enzima durante los lavados del biocatalizador, dando como resultado una carga de CPO más alta.

Por otra parte, se encontró que la actividad específica de las preparaciones obtenidas en las espumas mesocelulares está correlacionada con la carga de enzima, tal como era de esperarse en todos los casos (ver **tabla 4.2**). Sin embargo, lo anterior no ocurrió para las inmobilizaciones realizadas en los materiales basados en titania, ya que a pesar de que el sistema $\text{CPO}/\text{TiO}_2(\text{AN})$ tuvo aproximadamente 10 veces más enzima inmobilizada que el $\text{CPO}/\text{TiO}_2(\text{NT})$, sus actividades específicas fueron prácticamente iguales (260 y $258 \text{ U g}^{-1}_{\text{SOP}}$, respectivamente). En el caso de los biocatalizadores basados en sílice se observa que el $\text{CPO}/\text{MSU-F}$ tuvo 2,1 veces más enzima inmobilizada que el CPO/MCF ($6807 \text{ nmol}_{\text{CPO}} \text{ g}^{-1}_{\text{SOP}}$ y $3184 \text{ nmol}_{\text{CPO}} \text{ g}^{-1}_{\text{SOP}}$, respectivamente), mientras que su actividad fue 4,9 veces superior ($6406 \text{ U g}^{-1}_{\text{SOP}}$ contra $1301 \text{ U g}^{-1}_{\text{SOP}}$). Estos resultados son ejemplos claros de que la actividad específica de un biocatalizador no solo se encuentra relacionada con la cantidad de enzima inmobilizada, sino que también existen otros factores que la pueden influenciar, tales como la orientación adecuada del sitio activo de la enzima, la formación de agregados de enzima y las limitaciones por transferencia de masa, entre otras [40,108]. La influencia de estos factores sobre la actividad específica se puede evidenciar analizando los valores de eficiencia de inmobilización (E_i) reportados en la **tabla 4.2**. Este parámetro muestra la fracción de enzima inmobilizada que está activa en el biocatalizador. En todos los biocatalizadores, el valor E_i fue pequeño indicando que solamente una pequeña fracción de la CPO inmobilizada es accesible al sustrato, es decir, tiene una orientación adecuada del sitio activo. Es importante señalar que hay una correlación directa entre el parámetro E_i y el diámetro de poro de los materiales, indicando que a mayor diámetro de poro mayor es la fracción de enzima expuesta y accesible al sustrato. Esta afirmación se aplica principalmente a los silicatos tipo espumas mesocelulares, ya que su red de poros tridimensionales permite que el

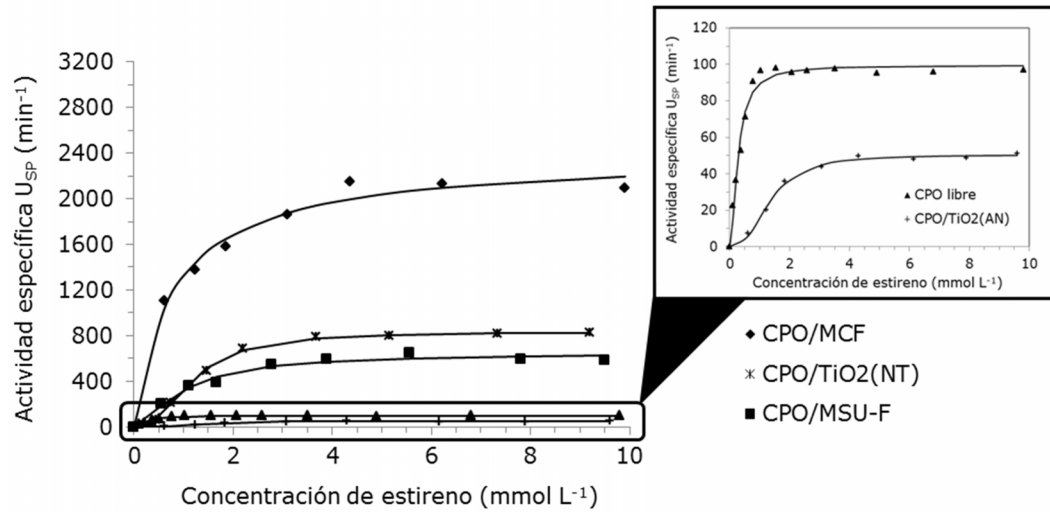
sustrato acceda fácilmente a la enzima que está más expuesta y orientada de manera adecuada en el interior de las cavidades de los poros [52].

Adicionalmente, es importante destacar que la actividad específica de los biocatalizadores obtenidos es comparable o incluso superior a la actividad reportada en estudios previos de CPO inmovilizada en materiales mesoporosos. Aburto y colaboradores [40] inmovilizaron CPO en silicatos tipo SBA-16, tanto por adsorción física como por unión covalente, logrando una actividad específica máxima de $313 \text{ U g}^{-1}_{\text{SOP}}$. Por otra parte, Jung y colaboradores [52] inmovilizaron CPO en MCF, tanto por fisisorción como por formación de agregados de enzimas entrecruzadas (estrategia abreviada como CLEA) en el interior de los poros de este material, obteniendo actividades específicas de $1848 \text{ U g}^{-1}_{\text{SOP}}$ y $9073 \text{ U g}^{-1}_{\text{SOP}}$ para los sistemas CPO/MCF y CPO-CLEA/MCF, respectivamente. Por lo tanto, es posible decir que se logró obtener un biocatalizador (CPO/MSU-F) con una actividad específica alta en un material silíceo que no había sido aplicado antes para la inmovilización de CPO.

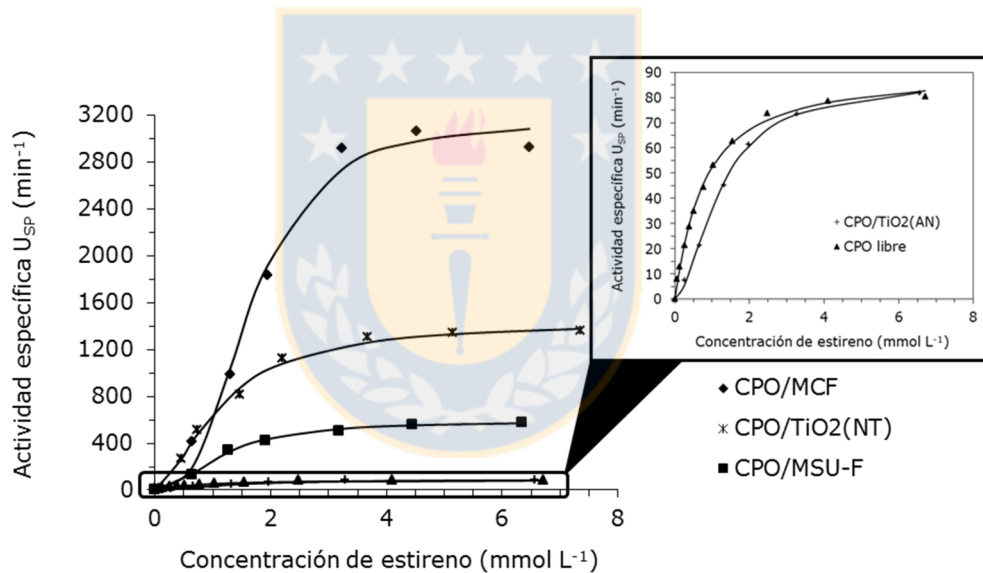
Una vez caracterizados, los sistemas inmovilizados fueron ensayados en la biocatálisis de las reacciones de epoxidación del estireno, bajo las condiciones de dosificación continua de peróxido de hidrógeno y el uso de 2M2P como co-solvente, establecidas previamente para la CPO libre (ver **capítulo 3**), con el propósito de evaluar la eficiencia catalítica y la estabilidad operacional de la enzima inmovilizada.

4.3 Eficiencia catalítica y estabilidad operacional de los biocatalizadores no magnéticos

Inicialmente, se evaluó la eficiencia catalítica de los diferentes biocatalizadores para la oxidación de estireno a dos valores de pH, 3,0 y 6,0 (ver **figura 4.3**). Estos dos pH fueron seleccionados considerando estudios previos que reportaron un pH óptimo ácido de $\sim 3,0$ para reacciones de peroxidación asistidas



(a)



(b)

Figura 4.3. Curvas de actividad específica de diferentes biocatalizadores para la reacción de epoxidación del estireno llevadas a cabo a pH 3,0 (a) y pH 6,0 (b). Las líneas sólidas corresponden al ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Hill utilizada como modelo. Condiciones de la reacción: buffer fosfatos 60 mmol L^{-1} , 18 U de biocatalizador, 15 % (v/v) de 2M2P como co-solvente, peróxido de hidrógeno ($0,2 \mu\text{mol min}^{-1}$), 293 K, 400 rpm y 5 min de reacción.

por el ión cloruro, y otro pH óptimo de ~ 6,0 para peroxidaciones llevadas a cabo en la ausencia de ión cloruro [109]. La actividad específica se determinó monitoreando los epóxidos y los dioles bajo las dos condiciones de pH ensayadas. Los epóxidos producidos pueden estar parcialmente hidrolizados a pH 6,0 o casi completamente hidrolizados a pH 3,0. En la mayoría de los casos, los datos cinéticos se ajustaron a un comportamiento sigmoideo, y por tanto se utilizó la ecuación de Hill para determinar las constantes catalíticas (ver **tabla 4.3**). En todas las preparaciones, la actividad catalítica (k_{cat}) a pH 6,0 fue ligeramente más alta que aquella encontrada a pH 3,0. Lo anterior estaría relacionado con el hecho que la CPO es más activa para la actividad halogenasa a pH bajos, y que su actividad peroxidasa es favorecida a pH más altos [109]. Otro aspecto interesante que se debe resaltar es la mayor actividad catalítica que presentaron casi todas las preparaciones de enzima inmovilizadas con respecto a la enzima libre,

Tabla 4.3. Parámetros catalíticos obtenidos para los biocatalizadores de CPO a partir de la ecuación de Hill para dos valores de pH, en la epoxidación de estireno.

pH	Biocatalizador	k_{cat} (min^{-1})	K' ($\text{mmol}^n \text{L}^{-n}$)	n	Ajuste del modelo (R^2)
3,0	CPO libre	99 ± 6	0,11 ± 0,04	1,7 ± 0,3	0,972
	CPO/MCF	2395 ± 240	0,8 ± 0,2	1,0 ± 0,3	0,966
	CPO/MSU-F	646 ± 120	1,0 ± 0,6	1,5 ± 0,2	0,987
	CPO/TiO ₂ (AN)	50 ± 6	2,2 ± 0,1	2,5 ± 0,4	0,991
	CPO/TiO ₂ (NT)	831 ± 15	1,6 ± 0,1	2,4 ± 0,3	0,997
6,0	CPO libre	90 ± 6	0,7 ± 0,2	1,1 ± 0,1	0,999
	CPO/MCF	3146 ± 180	4,3 ± 0,1	2,9 ± 0,7	0,982
	CPO/MSU-F	590 ± 18	1,3 ± 0,1	2,0 ± 0,2	0,994
	CPO/TiO ₂ (AN)	87 ± 6	1,4 ± 0,1	1,7 ± 0,1	0,999
	CPO/TiO ₂ (NT)	1441 ± 70	1,2 ± 0,1	1,6 ± 0,3	0,983

exceptuando la CPO/TiO₂(AN). La tendencia general para los valores de k_{cat} de los sistemas ensayados, en las dos condiciones de pH evaluadas, fue la siguiente:

$$\text{CPO/MCF} > \text{CPO/TiO}_2(\text{NT}) > \text{CPO/MSU-F} > \text{CPO libre} \geq \text{CPO/TiO}_2(\text{AN})$$

El sistema CPO/MCF mostró la actividad catalítica (k_{cat}) más alta a los dos valores de pH ensayados, alcanzando actividades que fueron 24 y 35 veces más elevadas que las obtenidas con la enzima libre a pH 3,0 y 6,0, respectivamente. El biocatalizador CPO/TiO₂(NT) fue 8 y 16 veces más activa que la CPO libre, mientras que la CPO/MSU-F incrementó su actividad catalítica en 6,5 veces para los dos valores de pH. En cambio, el biocatalizador CPO/TiO₂(AN) mostró la eficiencia más baja en las dos condiciones de pH evaluadas, alcanzando solamente una actividad catalítica similar a la de la CPO libre a pH 6,0, y la mitad de la actividad a pH 3,0 (ver recuadros en la **figura 4.3**). El aumento considerable de la actividad catalítica (k_{cat}) en los sistemas inmovilizados con respecto a la enzima libre podría explicarse en términos de la pérdida de grados de libertad que presentan las moléculas de enzima por efecto de la inmovilización y al confinamiento tanto de la enzima como del sustrato en el interior de los poros, facilitando de esta manera que el sustrato encuentre el acceso al sitio activo de la enzima [29,110]. Estos efectos sobre la actividad catalítica de la CPO inmovilizada en materiales mesoporosos ya han sido reportados previamente [15,40]. Por otra parte, las diferencias en las constantes catalíticas de los diferentes biocatalizadores podrían estar asociadas principalmente a orientaciones definidas de las moléculas de enzima en el interior de los poros de cada soporte [110], las cuales podrían facilitar u obstaculizar el acceso del sustrato al sitio activo de la CPO. Las orientaciones adoptadas por la enzima estarán dadas por el pH del medio en el que se realice la inmovilización, ya que este define las cargas superficiales tanto del soporte como de la enzima. Para comprender mejor este fenómeno, en la **figura 4.4 (a)** se presenta un ejemplo de la distribución de la densidad de carga en la superficie de la CPO a pH 7, y en la **figura 4.4 (b)** una curva donde se describe el comportamiento de la carga superficial de la enzima con respecto al pH [111]. Considerando los valores de pH de inmovilización, a pH

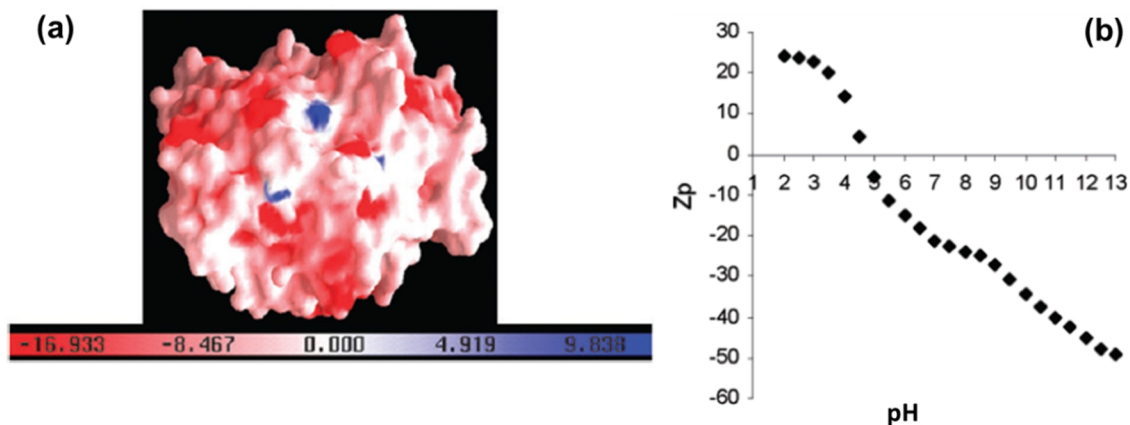


Figura 4.4. (a) Distribución del potencial superficial electrostático Poisson-Boltzmann de la CPO calculado en GRASP a pH 7 (el azul representa áreas de carga positiva, y el rojo, áreas de carga negativa), y (b) carga calculada sobre la CPO en función del pH (figuras tomadas de la referencia [112]).

5 la enzima tendría una carga superficial de ~ -5 unidades, lo cual indicaría que las zonas de carga negativa en la superficie de la CPO (color rojo) disminuirían con respecto a las presentadas a pH 7 (carga ~ -20 unidades), y las zonas de carga positiva (color azul) aumentarían su proporción, conservando el balance global de carga negativa. Esta distribución de cargas daría orientaciones bastante definidas de la enzima al interactuar con los soportes de $\text{TiO}_2(\text{AN})$, cargado positivamente a pH 5 ($PI \sim 5,8$). Por otra parte, a pH 3 la carga superficial de la CPO sería ~ 20 unidades, lo cual indicaría que las zonas de carga positiva (color azul) cubrirían la mayor parte de la superficie de la enzima (sería el caso opuesto al observado a pH 7 en la **figura 4.4 (a)**). Esta distribución de cargas daría lugar a orientaciones prácticamente aleatorias al adsorberse la enzima en la superficie de los soportes de sílice cargados negativamente a pH 3 ($PI \sim 2,0$). La orientación aleatoria de la enzima en los biocatalizadores CPO/MCF y CPO/MSU-F podría dar lugar a orientaciones que permiten que el acceso al sitio activo esté menos impedido, lo que generó posiblemente los altos valores de k_{cat} observados aquí. En el material basado en $\text{TiO}_2(\text{AN})$, la CPO adquiere orientaciones más definidas, las cuales estarían dificultando el acceso del sustrato al sitio activo, si se

considera que el sistema CPO/TiO₂(AN) presentó la menor actividad catalítica (k_{cat}) de todos los biocatalizadores. En el caso del biocatalizador CPO/TiO₂(NT), la morfología del soporte podría haber influido en el aumento sorpresivo de la actividad catalítica de este biocatalizador en comparación con la CPO/TiO₂(AN) y la CPO/MSU-F. Sin embargo, aún no es clara la manera en que la morfología del material podría afectar la actividad en este caso.

A pesar de la mayor actividad observada para la CPO inmovilizada comparada con la CPO libre, no es posible decir que se generó un aumento en la especificidad por el sustrato. De acuerdo con la estructura de la cloroperoxidasa [113], la superficie del grupo hemo no está fácilmente disponible para interactuar con el sustrato, existe una pequeña apertura arriba del grupo hemo la cual permite el acceso del sustrato al centro Fe⁺⁴=O del compuesto I. Así, el sitio activo en la CPO (el grupo hemo) está localizado profundamente en el interior de la molécula de proteína (ver **figura 4.5**). Por esto, el proceso de inmovilización solamente alteraría la conformación de la superficie de la CPO, sin afectar el sitio activo propiamente. El proceso de inmovilización aumentó la actividad catalítica de la CPO inmovilizada [114], posiblemente debido a los siguientes factores [29,110]: i) un aumento de la concentración del sustrato en la proximidad del soporte debido a una mayor afinidad de este por el soporte que por el medio de reacción, lo cual genera un microambiente al interior de los poros que favorece la difusión del sustrato a través de los mismos, y ii) la movilidad restringida de la enzima por su interacción electrostática con el soporte al interior de los poros, lo cual facilita el acceso del sustrato al sitio activo.

En la **tabla 4.3** también se muestran otros parámetros, como la cooperatividad del sustrato hacia la enzima (n) y la “afinidad por el sustrato” (K'). En los casos donde n fue igual a 1,0, la ecuación de Hill se convierte en la ecuación de una hipérbola rectangular, y por consiguiente, K' es igual a la constante de Michaelis-Menten (K_m) cuyo valor corresponde a la concentración de sustrato que genera la mitad de la velocidad máxima. Esta situación se presentó en dos casos específicos: la CPO libre a pH 6,0 y el biocatalizador CPO/MCF a pH

3,0. La inmovilización de la enzima incrementó significativamente el valor de K' en comparación con la enzima libre, lo cual sugiere la presencia de limitaciones de transferencia de masa del sustrato para alcanzar el sitio activo de la enzima cuando esta se encuentra inmovilizada.

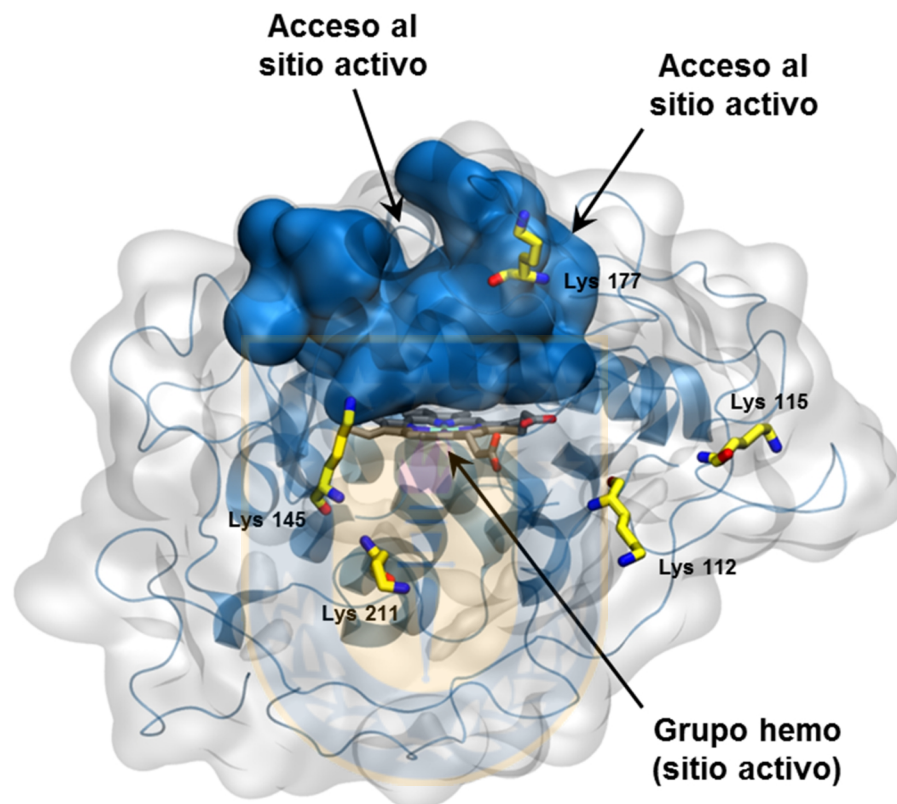


Figura 4.5. Accesos al sitio activo en la estructura tridimensional de la CPO (RCSB Protein Data Bank: 1CPO [113]). La región azul corresponde a los aminoácidos que conforman el canal de acceso al grupo hemo. Las lisinas superficiales están señaladas como referencia.

Con respecto a la estabilidad operacional de la cloroperoxidasa, los bajos valores que se obtienen para este parámetro son el cuello de botella para la generación de una posible aplicación industrial de esta enzima. Con el fin de evaluar esta propiedad, se determinó el número de recambio total (NRT) de las

preparaciones de enzima libre e inmovilizada para la oxidación del estireno a pH 3,0 y 6,0, empleando 2M2P como co-solvente en diferentes concentraciones (ver **figura 4.6**). Para contenidos de 2M2P de 15 %(v/v), los biocatalizadores CPO/TiO₂(NT) y CPO/TiO₂(AN) presentaron los valores máximos del NRT a pH 6,0 (NRT = 11300 y NRT = 10100, respectivamente), representando un incremento de la estabilidad operacional del 69% y 51% en cada caso, con respecto a la enzima libre (NRT = 6700). Sorpresivamente, el biocatalizador CPO/TiO₂(AN) mostró un NRT alto a pesar de que su actividad catalítica fue la más baja a pH 6. Todo lo contrario se observó a pH 3,0, donde los mejores biocatalizadores fueron el CPO/MSU-F (NRT = 8280) y el CPO/MCF (NRT = 7060), con un incremento en el NRT del 86% y 59%, respectivamente, en relación con la CPO libre (NRT = 4440). En términos generales, al incrementar el contenido de co-solvente a 30 %(v/v) los valores de NRT disminuyeron entre 30 y 60 % a las dos condiciones de pH evaluados, sin embargo, todos los soportes continuaron ofreciendo mayor estabilidad operacional a la CPO inmovilizada en comparación con la enzima libre. Finalmente, cuando se trabajó con 60 %(v/v) de co-solvente, los valores de NRT de todos los biocatalizadores fueron bastante similares a los presentados por la CPO libre, indicando que a estas concentraciones de co-solvente la estabilidad que ofrecen los diferentes soportes a la enzima es muy baja o prácticamente nula. La disminución de la estabilidad operacional de la enzima inmovilizada con el aumento gradual en el contenido de 2M2P está relacionado con el efecto desnaturalizante que ejerce el solvente orgánico sobre las enzimas [13,97], el cual fue discutido ampliamente en la **sección 3.3**.

El aumento en la estabilidad enzimática gracias a la inmovilización es debida a que la interacción entre el soporte y la superficie de la proteína podría estabilizar la estructura tridimensional de la enzima, lo cual se traduce en una mayor estabilidad operacional, como fue reportado por Mozhaev y Melik-Nubarov [115]. Otro aspecto para resaltar es que, aunque los biocatalizadores CPO/TiO₂(AN) y CPO/TiO₂(NT) presentaron la mayor estabilidad operacional a pH 6,0, su comportamiento a pH 3,0 fue completamente contrario, mostrando una estabilidad operacional más baja que la presentada por el CPO/MSU-F y la CPO/MCF, y sus

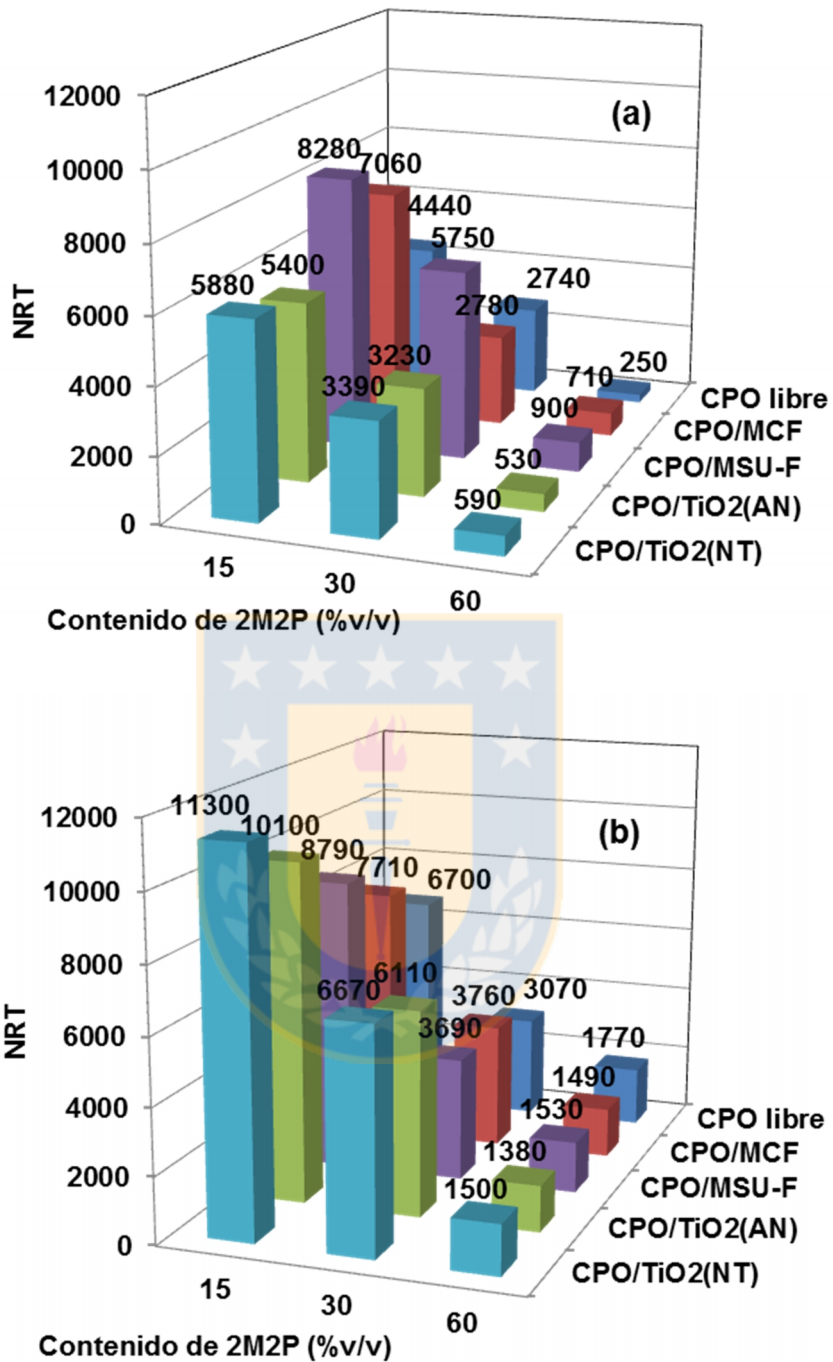


Figura 4.6. Efecto del contenido de 2M2P como co-solvente sobre la estabilidad operacional de la CPO en términos del NRT, para los diferentes biocatalizadores en la reacción de epoxidación de estireno, evaluado a **(a)** pH 3,0 y **(b)** pH 6,0.

valores fueron muy cercanos al registrado por la enzima libre. Este comportamiento podría explicarse si se considera que las interacciones electrostáticas, previamente establecidas entre la enzima y los soportes de TiO_2 durante la inmovilización a pH 5, son interrumpidas cuando los biocatalizadores son sometidos a un pH por debajo de los correspondientes puntos isoeléctricos, generando interacciones repulsivas que producen el desprendimiento de la enzima.

El valor menor del NRT a pH 3 comparado con el valor a pH 6 está relacionado con la mayor capacidad que presenta la CPO de generar radicales hidroxilo a pH 3. El mecanismo de transformación peroxidasa de la CPO está mediado por la producción de radicales libres y son estos radicales libres producidos los responsables de su inactivación auto-oxidativa. Entre más rápido se produzcan los radicales libres, más rápida será la inactivación peroxidasa [116,117]. Debido a que la CPO es más activa a pH 3 que a pH 6, la inactivación de la enzima por radicales libres a pH 3 sería más alta, mientras que a pH 6 esta debería minimizarse [118]. Lo anterior también es consistente con los valores altos del NRT obtenidos a pH 6.

Los altos valores de NRT obtenidos a pH 6,0 con la enzima inmovilizada en $\text{TiO}_2(\text{AN})$ y $\text{TiO}_2(\text{NT})$ podrían deberse a varios factores: i) menor actividad peroxidasa, lo que se traduce en una producción de radicales libres más lenta reduciendo la auto-inactivación e incrementando el tiempo de vida de la enzima, y ii) el tamaño de poro de los dos soportes, el cual es comparable con el diámetro de la enzima, lo que genera una interacción estrecha entre el soporte y las moléculas de enzima al pH de inmovilización, estabilizando su estructura [115]. La importancia del tamaño del poro fue demostrada por Na y colaboradores con la inmovilización de catalasa en MCF, encontrándose que la estabilidad de almacenamiento y la estabilidad térmica aumentan cuando los diámetros de poro coinciden con el diámetro de la molécula de enzima [54]. En el caso de los biocatalizadores de CPO/MCF y CPO/MSU-F, el tamaño de poro ejerció un menor efecto estabilizante sobre la estructura de la CPO, ya que los diámetros de poro

de estos dos materiales fueron 2 y 5 veces más grandes comparados con el diámetro de la enzima, respectivamente.

En el caso del estireno, los valores más altos del NRT se obtuvieron a pH 6,0 y utilizando 15 %(v/v) de 2M2P como co-solvente. También se determinaron los NRT bajo estas condiciones para dos derivados del estireno, el 3-cloroestireno y el 3-nitroestireno (ver **figura 4.7**). La tendencia seguida por los valores del NRT obtenidos fue: estireno > 3-cloroestireno > 3-nitroestireno, tanto para la enzima libre como inmovilizada. El NRT máximo para el 3-cloroestireno se obtuvo con el biocatalizador CPO/TiO₂(NT) (NRT = 5810), logrando un incremento en este valor del 203 % comparado con la enzima libre (NRT = 1920), mientras que para el

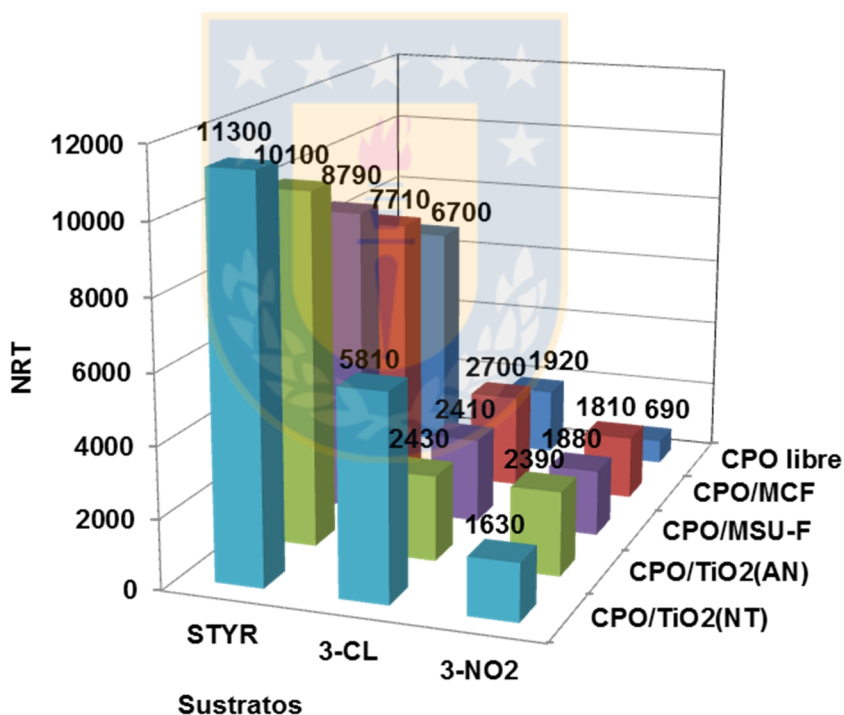


Figura 4.7. Número de recambio total (NRT) para la CPO libre e inmovilizada, en la reacción de epoxidación a pH 6 del estireno (STYR), 3-cloroestireno (3-Cl) y 3-nitroestireno (3-NO₂), utilizando 15 %(v/v) de 2M2P como co-solvente, 1,5 $\mu\text{mol min}^{-1}$ de H₂O₂ (flujo continuo) y 20 °C.

3-nitroestireno el mejor biocatalizador fue el CPO/TiO₂(AN) (NRT = 2390) proporcionando un incremento del 246 % en relación con la CPO libre (NRT = 690).

4.4 Relación estructura - actividad

Finalmente, se evaluaron los parámetros catalíticos del biocatalizador CPO/TiO₂(NT) en la epoxidación del estireno y cuatro de sus derivados *m*-sustituidos (ver **tabla 4.4**), con el propósito de identificar si existe alguna relación entre la actividad catalítica de la enzima y algunas propiedades de los sustratos cuyos grupos sustituyentes son sustractores o donadores de densidad electrónica. El sistema CPO/TiO₂(NT) se escogió debido a que presentó las mejores eficiencias catalíticas de todos los biocatalizadores evaluados anteriormente. Los parámetros catalíticos fueron obtenidos a partir del ajuste de los datos cinéticos a la ecuación de Hill. Adicionalmente, se midió la estabilidad operacional para este biocatalizador con el 3-metilestireno y el 3-aminoestireno.

En la **tabla 4.4** se observa que, para la enzima inmovilizada, las constantes catalíticas más bajas comparadas con la obtenida para el estireno se obtuvieron con los sustratos cuyos grupos sustituyentes son sustractores de densidad electrónica, mientras que la constante catalítica más alta se presentó con el grupo amino, dador de densidad electrónica. El caso del 3-metilestireno es particular, ya que la constante catalítica obtenida con este compuesto es menor a la obtenida con el estireno, a pesar de que el grupo metilo es dador de electrones. Estos comportamientos podrían estar relacionados con efectos electrónicos que estabilizan los estados de transición, en el caso de grupos sustituyentes dadores de densidad electrónica.

Comparando los valores de k_{cat} con aquellos obtenidos para la CPO libre (ver **tabla 4.4**) se encontró que en todos los casos la actividad catalítica de la CPO/TiO₂(NT) mejoró sustancialmente, dado que para el 3-cloroestireno el incremento fue de 8 veces, con el 3-nitroestireno 42 veces, en el caso del estireno

Tabla 4.4. Parámetros catalíticos y estabilidad operacional del biocatalizador CPO/TiO₂(NT) y de la CPO libre, en las reacciones de epoxidación del estireno y de algunos derivados m-sustituídos, utilizando 15 %(v/v) de 2M2P como co-solvente, 0,2 μmol min⁻¹ de H₂O₂, una R_{H₂O₂/CPO} de 1250 al final de la reacción.

Sustrato ^a	CPO ^b	k_{cat} (min ⁻¹)	K' (mmol ⁿ L ⁻ⁿ)	n	Ajuste del modelo (R^2)	NRT
STR	L	90 ± 6	0,73 ± 0,19	1,1 ± 0,1	0,999	6700
	I	1441 ± 70	1,2 ± 0,1	1,6 ± 0,3	0,983	11300
3-Cl	L	25 ± 1	0,39 ± 0,04	1,2 ± 0,2	0,980	1920
	I	199 ± 6	0,21 ± 0,15	2,3 ± 1,3	0,981	5810
3-NO ₂	L	13 ± 2	6,7 ± 1,2	1,2 ± 0,2	0,994	690
	I	541 ± 51	43 ± 5	1,1 ± 0,2	0,993	1630
3-CH ₃	L	58 ± 1	0,26 ± 0,03	2,0 ± 0,2	0,985	1360
	I	779 ± 19	0,39 ± 0,03	1,7 ± 0,2	0,992	25990
3-NH ₂	L	3869 ± 309	0,42 ± 0,08	0,9 ± 0,1	0,992	18510
	I	9347 ± 166	0,0064 ± 0,0066	2,6 ± 0,3	0,991	273040

^a STR: estireno, 3-Cl: 3-cloroestireno; 3-NO₂: 3-nitroestireno; 3-CH₃: 3-metilestireno; 3-NH₂: 3-aminoestireno.

^b L: Datos correspondientes a la CPO libre. I: Datos correspondientes a la CPO inmovilizada (biocatalizador CPO/TiO₂(NT)).

16 veces, con el 3-metilestireno 13 veces y con el 3-aminoestireno aumentó 2,4 veces. Este comportamiento confirmaría que existe un efecto asociado al soporte.

Por otra parte, los valores de NRT para la enzima inmovilizada presentan un comportamiento similar al descrito por las constantes catalíticas con respecto a la naturaleza dadora o sustractora de densidad electrónica de los grupos sustituyentes. Por un lado, la CPO/TiO₂(NT) incrementó su estabilidad operacional con respecto a la enzima libre en 15 y 19 veces en los casos del 3-aminoestireno y

del 3-metilestireno, respectivamente. Este comportamiento podría asociarse presumiblemente con las diferencias en la actividad catalítica (k_{cat}) presentada por la enzima.

Los valores de k_{cat} obtenidos con el biocatalizador CPO/TiO₂(NT) y la CPO libre serán empleados para establecer una posible correlación cuantitativa entre estos valores y algunas propiedades fisicoquímicas de los sustratos evaluados.

De este modo, se estudió la posible relación cuantitativa entre algunas propiedades fisicoquímicas de los sustratos, tales como el potencial de ionización (EI) y la constante de hidrofobicidad (π) de los grupos sustituyentes, y las constantes catalíticas (k_{cat}) de la CPO para las reacciones de epoxidación, tanto para la enzima libre como para el biocatalizador CPO/TiO₂(NT). Para este estudio se realizó un análisis de regresión lineal múltiple utilizando el software STATGRAPHICS Centurion XVI.I. Los valores de EI y π utilizados en el análisis estadístico fueron normalizados previamente, con el fin de obtener modelos cuyos coeficientes de las variables puedan ser comparables entre sí, y de esta forma, poder establecer el peso relativo de estos en el modelo correspondiente.

Las propiedades utilizadas como variables independientes en este estudio fueron seleccionadas considerando algunos trabajos previos en los que se han relacionado propiedades de los sustratos con las constantes catalíticas en reacciones de epoxidación catalizadas por sistemas artificiales análogos al sitio activo de la CPO. Por ejemplo, algunos estudios experimentales realizados por Collman y colaboradores [119] mostraron que la naturaleza de los sustratos olefínicos determinaba las constantes de velocidad obtenidas para la epoxidación de olefinas, utilizando como catalizador un compuesto metaloporfirínico modelo, análogo a la especie oxidante activa de los citocromos P450. Por otra parte, Kumar y colaboradores [120] realizaron un estudio computacional por DFT sobre la epoxidación de sustratos a partir del compuesto I de citocromos P450 para establecer los factores fundamentales que gobiernan las reacciones de epoxidación catalizadas por estas enzimas, encontrando por primera vez que la constante de velocidad para la epoxidación de alquenos estaba correlacionada

con el potencial de ionización de los sustratos. En un trabajo posterior, Sainna y colaboradores [121] sintetizaron compuestos tipo complejos catión radical hierro(IV) – oxo porfirina, análogos al sitio activo de la Citocromo P450 y de la CPO, y estudiaron su reactividad en fase gas con varias olefinas para la reacción de epoxidación, encontrando que las velocidades de reacción correlacionaron linealmente con el potencial de ionización de los sustratos olefínicos utilizados.

En el presente trabajo se quiso encontrar esta correlación a partir de las constantes catalíticas experimentales obtenidas para la epoxidación de estirenos *m*-sustituídos catalizadas directamente por la CPO, y no por modelos biomiméticos. Para establecer las correlaciones cuantitativas entre la actividad catalítica y propiedades físico-químicas de los sustratos, se emplearon dos parámetros, la energía de ionización de los sustratos y la constante de hidrofobicidad de los grupos sustituyentes. La determinación de las energías de ionización (*E_I*) de los sustratos se realizó por medio de cálculos DFT (*Density Functional Theory*) con un nivel de teoría UB3LYP/6-311+G*, haciendo la diferencia de energía entre el compuesto neutro y el respectivo catión radical, mediante el esquema presentado en la **figura 4.8**.

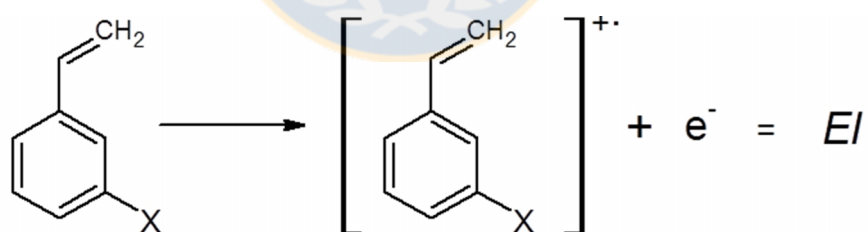


Figura 4.8. Esquema de la ionización de los estirenos *m*-sustituídos, considerado para el cálculo de la energía de ionización (*E_I*).

Por su parte, los valores de las constantes de hidrofobicidad (π) de los sustituyentes fueron tomados de la literatura [122]. En la **tabla 4.6** se presentan los valores de *E_I*, π y sus respectivos valores normalizados *E_{I,NORMAL}* y π_{NORMAL} utilizados en los análisis estadísticos, así como el logaritmo de las constantes

catalíticas relativas de la CPO libre e inmovilizada, las cuales fueron obtenidas en este trabajo y reportadas en la **sección 4.4**.

Tabla 4.6. Datos utilizados para los análisis de regresión múltiple.

X^a	CPO libre		CPO/TiO ₂ (NT)		EI (eV)	EI_{NORMAL}	π	π_{NORMAL}
	k_X^b	$Log(k_X/k_H)$	k_X^b	$Log(k_X/k_H)$				
H	90	0,0	1441	0,000	8,149	0,1481	0,00	-0,0062
NO ₂	13	-0,84	541	-0,425	8,762	1,1589	-0,28	-0,37
Cl	25	-0,56	199	-0,860	8,302	0,4004	0,71	0,91
CH ₃	58	-0,19	779	-0,267	7,974	-0,1405	0,56	0,72
NH ₂	3869	1,6	9347	0,8120	7,109	-1,5668	-1,23	-1,59

^a Indica el sustituyente en el estireno *m*-sustituido.

^b Corresponde al valor de k_{cat} para cada sustrato, expresada en min⁻¹.

El análisis de regresión múltiple permitió obtener la siguiente ecuación modelo ajustada (modelo 1), a partir de los valores de $Log(k_X/k_H)$ para la CPO libre y los valores de EI_{NORMAL} y π_{NORMAL} :

$$\log\left(\frac{k_X}{k_H}\right)_{MOD1} = 0,0092 - 0,7638 \cdot EI_{NORMAL} - 0,2879 \cdot \pi_{NORMAL} \quad (Ec. Ec. 3)$$

El valor de R^2 para este modelo fue 0,9934, lo cual indica que el modelo predice en un 99,34% la variabilidad del $Log(k_X/k_H)$. En este caso, el análisis de varianza (ANOVA) arrojó un valor de P de 0,0520 para la variable π_{NORMAL} y de 0,0079 para EI_{NORMAL} . Como el valor P para el modelo fue inferior a 0,01 (valor P = 0,0066), existe una relación estadísticamente significativa entre las variables para un nivel de confianza del 99%.

Dado que el número de datos de $\text{Log}(k_X/k_H)$ es muy limitado para tener en consideración dos parámetros (EI y π), se decidió simplificar el modelo a una sola variable. Teniendo en cuenta que el valor de P para π_{NORMAL} ($P = 0,0520$) es superior a 0,01, esto indica que el término es estadísticamente significativo para un nivel de confianza del 90%, mientras que para EI_{NORMAL} ($P = 0,0079$) su valor es inferior a 0,01, siendo esta variable estadísticamente significativa para un nivel de confianza del 99%. Por lo tanto, se simplifica el modelo dejando solamente a EI como variable independiente para trabajar con el nivel de confianza más alto. Además, la EI presentó la mayor contribución sobre el modelo, de acuerdo con los coeficientes que presentaron las dos variables. En estas condiciones, se procedió nuevamente a realizar el análisis de regresión lineal múltiple obteniendo el siguiente modelo ajustado (modelo 2):

$$\log\left(\frac{k_X}{k_H}\right)_{MOD2} = 0,0092 - 0,9320 \cdot EI_{NORMAL} \quad (Ec. 4)$$

Este modelo mostró un R^2 de 0,9346, siendo este valor ligeramente más bajo que en el caso anterior, pero presentando todavía un buen grado de predicción en la variabilidad de $\text{Log}(k_X/k_H)$ (93,46%). Además, a través del ANOVA se determinó un valor P de 0,0072 para el modelo. Considerando que el valor P del modelo es menor a 0,01, se tiene que la variable EI_{NORMAL} es estadísticamente significativa para un nivel de confianza del 99%.

Con base en los resultados anteriores y considerando el número limitado de datos experimentales de k_{cat} , se seleccionó el modelo 2 (**ecuación 4**) como la expresión más adecuada para la predicción de $\text{Log}(k_X/k_H)$. La **figura 4.9** permite observar el grado de correlación entre los valores experimentales de $\text{Log}(k_X/k_H)$ y los correspondientes valores calculados a partir del modelo 2 ($R^2 = 0,9347$).

En el caso del biocatalizador CPO/TiO₂(NT), se obtuvo el modelo ajustado (modelo 3), haciendo nuevamente un análisis de regresión lineal múltiple, utilizando sus constantes catalíticas:

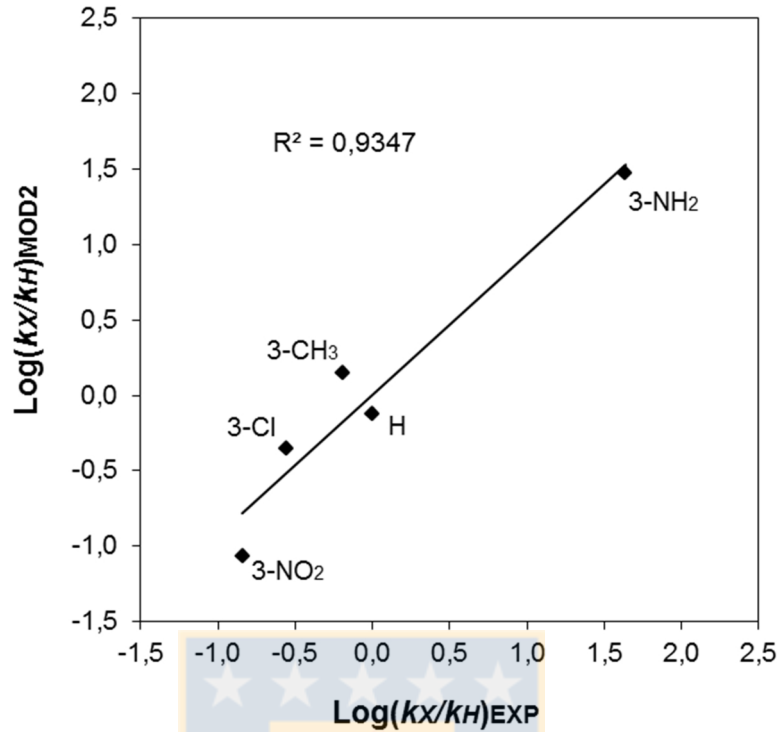


Figura 4.9. Correlación entre los valores experimentales y los calculados a partir del modelo 2 para el $\text{Log}(k_x/k_H)$, correspondientes a la CPO libre.

$$\log\left(\frac{k_X}{k_H}\right)_{MOD3} = -0,148 - 0,3065 \cdot EI_{NORMAL} - 0,3620 \cdot \pi_{NORMAL} \quad (Ec. 5)$$

En este caso el modelo presentó un R^2 de 0,9203, indicando que el modelo explica en un 92,03% la variabilidad de $\text{Log}(k_x/k_H)$. También se observa que la contribución de las dos variables al modelo es bastante parecida, siendo ligeramente menor la contribución de EI_{NORMAL} . A partir del ANOVA se obtuvo un valor P de 0,1825 para la variable EI_{NORMAL} y de 0,1412 para π_{NORMAL} . Como el valor P para el modelo fue inferior a 0,10 ($P = 0,0797$), existe una relación estadísticamente significativa entre las variables para un nivel de confianza del 90%. Aunque el nivel de confianza del modelo es adecuado, la mayor limitación radica en la relación existente entre el número de parámetros del modelo (EI y π) y el bajo número de observaciones experimentales (se evaluaron 5 sustratos) [123].

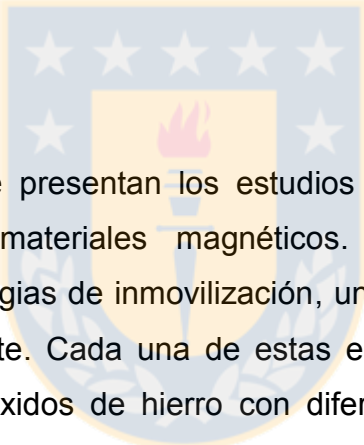
Desde este punto de vista, el anterior modelo debería ser probado con un mayor número de sustratos.

Del análisis anterior se puede decir que únicamente se estableció una correlación cuantitativa entre la energía de ionización de los sustratos y las constantes catalíticas para la enzima libre, mientras que para el sistema inmovilizado CPO/TiO₂(NT) la existencia de dos parámetros (E_I y π) que correlacionen con la actividad catalítica de la enzima, debe ser probado con un mayor número de sustratos, y de esta forma, establecer un modelo sobre bases más sólidas y estadísticamente aceptables.



CAPÍTULO 5

Biocatálisis de las reacciones de epoxidación utilizando CPO inmovilizada en materiales nanoestructurados magnéticos de óxidos de hierro



En este capítulo se presentan los estudios sobre los biocatalizadores de CPO inmovilizada en materiales magnéticos. Los biocatalizadores fueron obtenidos por dos estrategias de inmovilización, una por interacción electrostática y otra por unión covalente. Cada una de estas estrategias fue probada en dos materiales basados en óxidos de hierro con diferentes estructuras cristalinas y diferentes morfologías. Se evaluó el desempeño de los biocatalizadores obtenidos mediante la determinación de sus eficiencias catalíticas y de la estabilidad operacional en la reacción de epoxidación de 3-aminoestireno.

5.1 Caracterización de los soportes

Uno de los materiales seleccionados como soporte magnético fue la maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), con morfología de nanopartículas ($\text{NP}_{\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3}$), la cual fue obtenida por el método de co-precipitación de Fe^{2+} y Fe^{3+} . Este es un sólido no poroso cuya superficie específica varía entre 8 y 130 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$, según sea el método de síntesis [76]. Pese a su área superficial baja, la alta relación superficie:volumen

proporcionada por las nanopartículas magnéticas favorece una alta capacidad de enlazamiento y una alta especificidad catalítica para las enzimas conjugadas a este material [35]. El otro material magnético seleccionado para la inmovilización de CPO fue la magnetita (Fe_3O_4), con morfología de nanotubos ($\text{NT}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}$), el cual fue sintetizado en nuestro grupo de investigación a partir de la obtención inicial de hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) por un tratamiento hidrotérmico de FeCl_3 en presencia de algunos aditivos, y su posterior proceso de reducción a altas temperaturas. Este tipo de materiales basados en magnetita no son porosos y, en general, poseen una superficie específica muy baja que depende de la morfología (por ejemplo, las $\text{NP}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}$ alcanzan valores de $100 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ como máximo) [76]. Por otra parte, los $\text{NT}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}$ poseen diámetros lo suficientemente grandes (entre 70 y 150 nm [74]), los cuales son adecuados para la inmovilización covalente de enzimas, ya que se disminuyen las limitaciones difusionales por transferencia de masa. Al igual que los NT, las NP también pueden funcionalizarse para unir covalentemente la enzima, debido a la presencia de grupos hidroxilo en su superficie.

En la **figura 5.1** se pueden apreciar claramente la morfología y las dimensiones de los dos materiales seleccionados para este estudio. Las principales características texturales y *PI* determinados a los soportes $\text{NT}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}$ y $\text{NP}_{\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3}$ se reportan en la **tabla 5.1**. Aquí se observa que las superficies específicas medidas se corresponden con los valores encontrados en la literatura para estos materiales [76]. Por otra parte, el tamaño de partícula promedio determinado para las NP (9 nm) indicaría que estas son super-paramagnéticas, ya que este tamaño solo puede contener dominios individuales de óxido de hierro. Las propiedades super-paramagnéticas de las NP fueron confirmadas por medio de un análisis por VSM, y cuyos resultados se presentan en la **figura 5.2**. En esta figura se observa que el ciclo de magnetización para este material es cerrado, y por tanto no presenta magnetización remanente en ausencia de campo aplicado. Gracias al tamaño pequeño de las NP, estas mostraron una superficie específica dos veces mayor a la de los NT. Por otra parte, tanto la maghemita como la magnetita poseen puntos isoeléctricos superiores al de la CPO ($PI \sim 4,0$). Incluso, sus *PI* están por encima del pH en el que se realizan las reacciones de

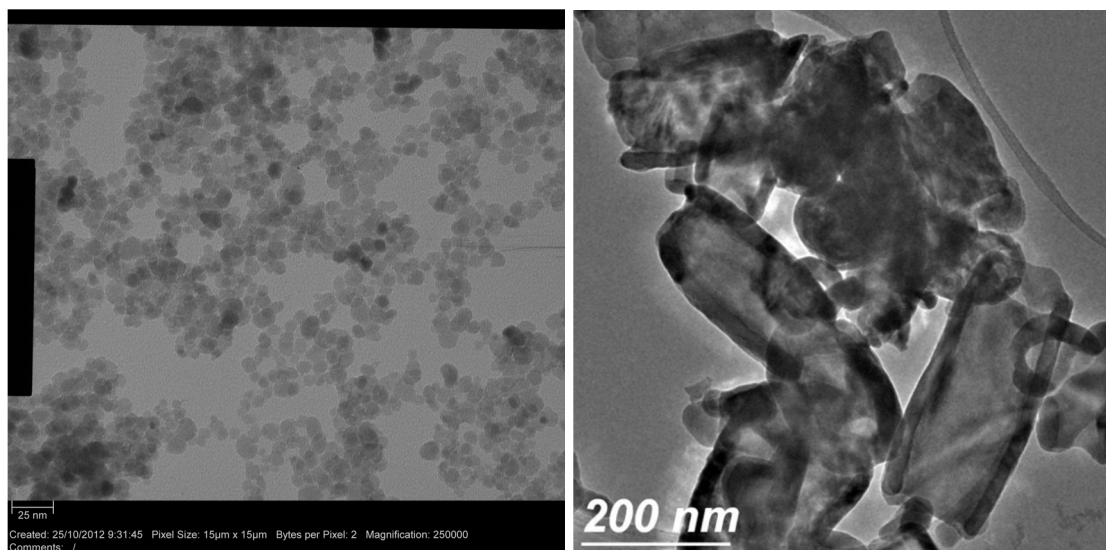


Figura 5.1. Micrografías TEM de los materiales magnéticos $NP_{\gamma-Fe_2O_3}$ (izquierda) y $NT_{Fe_3O_4}$ (derecha).

epoxidación (pH 6,0), siendo esta condición la que permitió que el pH seleccionado para la inmovilización de la CPO en los materiales magnéticos fuera 6,0. En este sentido, los dos materiales cumplieron los requerimientos para llevar a cabo la inmovilización de la CPO por interacción electrostática.

Tabla 5.1. Caracterización de los materiales magnéticos seleccionados para la inmovilización de CPO.

Soporte	Superficie específica ($m^2 g^{-1}_{SOP}$)	Diámetro ^c (nm)	PI
$NT_{Fe_3O_4}$	60 ^a	96 ± 43	6,8
$NP_{\gamma-Fe_2O_3}$	137 ^b	9 ± 2	6,6

^a Parámetro determinado por el método Brunauer-Emmett-Teller BET.

^b Parámetro determinado utilizando las micrografías de TEM. La superficie específica fue calculada como se indica en la sección 2.2.

^c Corresponde al diámetro de poro para el caso de los NT, y al diámetro de partícula en el caso de las NP, ambos medidos por TEM.

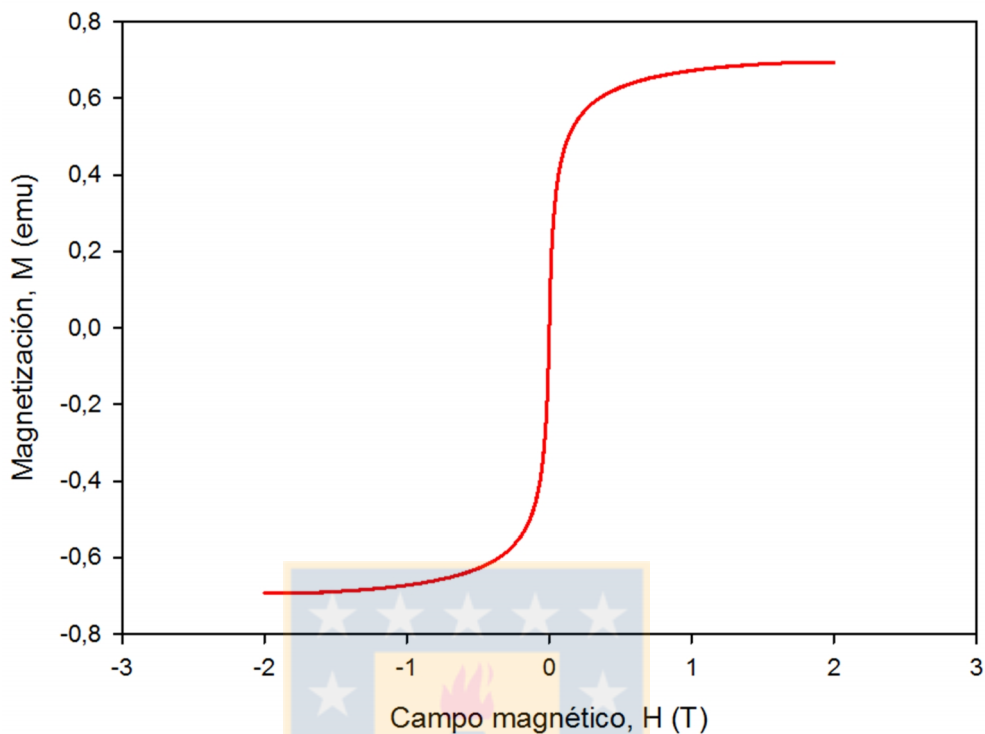


Figura 5.2. Curva de magnetización obtenida para las $NP_{\gamma}\text{-Fe}_2\text{O}_3$ utilizando un magnetómetro de muestra vibrante (VSM) a 298 K.

En la literatura se encuentran principalmente reportes de inmovilización de enzimas por unión covalente a este tipo de soportes basados en óxidos de hierro, mientras que los trabajos de inmovilización por interacción electrostática son muy limitados (no hay reportes con CPO), probablemente porque estos materiales en particular no presentan porosidad, lo cual genera varias desventajas de tipo operacional para los biocatalizadores obtenidos utilizando esta estrategia. Sin embargo, en este trabajo también se intentó la inmovilización por interacción electrostática a pH 6,0 aprovechando las capacidad de adsorción de aniones que presentan los óxidos de hierro [76], ya que a este pH la CPO presenta una carga neta negativa.

5.2 Inmovilización de CPO por interacción electrostática y por unión covalente a nanomateriales magnéticos.

Inicialmente, la cloroperoxidasa fue inmovilizada por interacción electrostática, tanto a las NP γ -Fe $_2$ O $_3$ como a los NTFe $_3$ O $_4$, aprovechando la diferencia entre los puntos isoeléctricos. En ambos casos, la inmovilización se llevó a cabo a pH 6,0, con lo que se garantiza que la carga neta global de la enzima es negativa ($PI \sim 4,0$) y la de los materiales positiva (sus PI estuvieron entre 6,6 y 6,8).

La caracterización de los biocatalizadores obtenidos se reporta en la **tabla 5.2**. Allí se observa que la cantidad de enzima inmovilizada en los NT fue mínima (0,39 nmol $_{CPO}$ g $^{-1}_{SOP}$) comparada con las NP (31 nmol $_{CPO}$ g $^{-1}_{SOP}$), dando un valor de actividad específica que apenas fue medible y parámetros de inmovilización bastante pobres que confirmaron la ineficacia del proceso de inmovilización. Estos resultados fueron originados posiblemente a la poca dispersión que presentó este material en el medio acuoso donde se llevó a cabo la inmovilización, formando agregados grandes y estables que evitaron que toda la superficie del sólido quedara expuesta a la solución de enzima. Lo anterior, sumado a la superficie

Tabla 5.2. Caracterización biocatalítica de los biocatalizadores de CPO obtenidos a partir de estrategias de inmovilización diferentes y dos nanomateriales magnéticos de óxidos de hierro.

Tipo de inmovilización	Biocatalizador	Carga (nmol $_{CPO}$ g $^{-1}_{SOP}$)	U_{SP}^a (U g $^{-1}_{SOP}$)	E_I (%)
Interacción electrostática	CPO/NTFe $_3$ O $_4$	0,39	0,18	8
	CPO/NP γ -Fe $_2$ O $_3$	31	11	7
Unión covalente	CPO-CPTMS-NTFe $_3$ O $_4$	17	8,4	9
	CPO-CPTMS-NP γ -Fe $_2$ O $_3$	21	46	40

^a Actividad específica calculada como actividad peroxidasa, utilizando guaiacol como sustrato. Las unidades reportadas para la actividad específica son equivalentes a nmol min $^{-1}$ mg $^{-1}_{SOP}$.

específica baja de la magnetita, serían los responsables de los malos resultados observados.

Por otra parte, la inmovilización de CPO estuvo más favorecida en el caso de las $\text{NP}_{\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3}$, ya que este material no formaba agregados durante el proceso de inmovilización, permaneciendo disperso en la solución por más tiempo. Aquí se logró obtener una carga de $31 \text{ nmol}_{\text{CPO}} \text{ g}^{-1}_{\text{SOP}}$ y una actividad específica de $11 \text{ U g}^{-1}_{\text{SOP}}$. Si se comparan estos valores con los obtenidos para los sistemas inmovilizados en materiales no magnéticos (ver **tabla 4.3**), se concluye que las propiedades biocatalíticas del sistema $\text{CPO}/\text{NP}_{\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3}$ son bastante bajas. Por otra parte, el valor bajo de la eficiencia de inmovilización (E_i) indica la presencia de efectos que reducen significativamente la actividad de la CPO, dentro de los que podrían citarse la orientación inadecuada de la enzima y posibles cambios conformacionales de la enzima por la interacción con el soporte [110].

Dadas las deficientes propiedades biocatalíticas de las preparaciones de enzima obtenidas por interacción electrostática en los $\text{NT}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}$ y en las $\text{NP}_{\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3}$, se decidió ensayar la inmovilización de la CPO por unión covalente, y de esta forma establecer con cuál de las dos estrategias se obtiene el mejor biocatalizador en este tipo de nanomateriales magnéticos.

Para la inmovilización de CPO por unión covalente a los soportes magnéticos se utilizó como agente de acoplamiento el compuesto 3-cloropropiltrimetoxisilano (CPTMS), con el que se silanizó previamente la superficie de los dos materiales. Este clorosilano proporciona un sitio reactivo (el átomo de carbono unido al cloro) como punto de anclaje de la CPO a través de sus grupos amino superficiales, y cuya reacción se dio de manera exitosa en este caso. En la **figura 5.3** se representan las etapas llevadas a cabo para la inmovilización covalente de la CPO a los materiales magnéticos.

Como se puede observar en la **tabla 5.2** con respecto a los sistemas inmovilizados por unión covalente, la carga de enzima obtenida en los dos casos fue prácticamente la misma, a pesar de que las NP presentan el doble de la

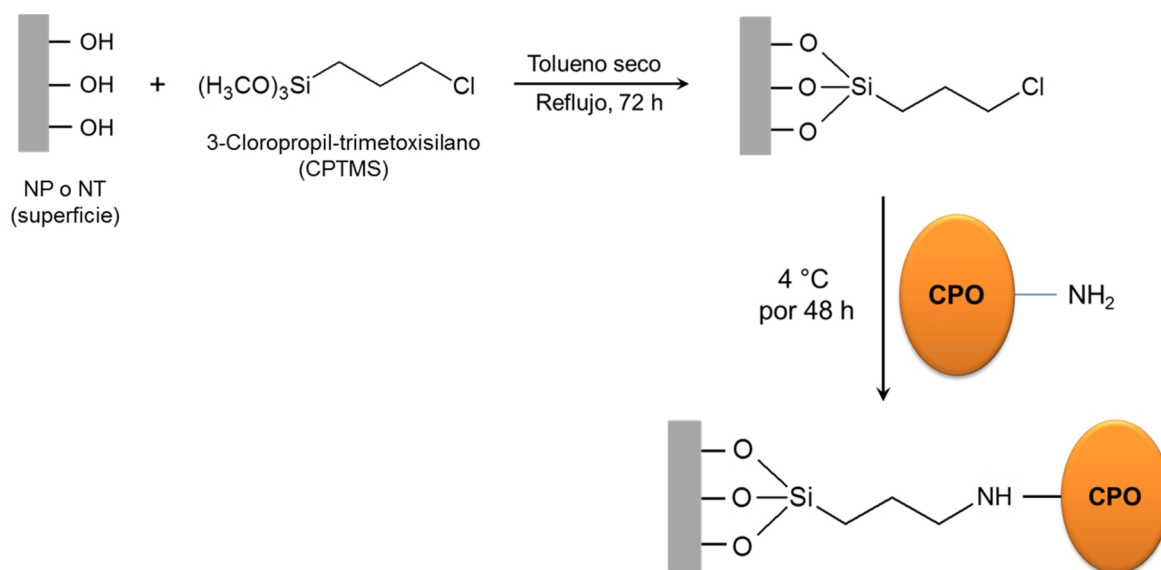


Figura 5.3. Esquema simplificado de la inmovilización covalente de CPO a los materiales magnéticos, utilizando CPTMS como agente de acoplamiento.

superficie específica de los NT. Lo anterior podría indicar que los NT presentaron un mayor grado de funcionalización de la superficie con el CPTMS, compensando así la diferencia marcada en superficie específica entre estos dos materiales. Ahora bien, la actividad catalítica que mostró el biocatalizador de NP ($46 \text{ U g}^{-1}_{\text{SOP}}$) fue 5,5 veces más alta que la del sistema con NT ($8,4 \text{ U g}^{-1}_{\text{SOP}}$), lo cual no tiene correspondencia con las diferencias observadas en cuanto a la carga de enzima inmovilizada. Esto podría explicarse si se consideran los valores de eficiencia de inmovilización (E_i), donde se observa claramente que la fracción de enzima inmovilizada activa es 4,9 veces mayor en las NP. El valor bajo de E_i mostrado en los NT deja en evidencia la presencia de algunos factores que están reduciendo la actividad específica de la enzima en este sistema. Lo que podría estar ocurriendo aquí es que la enzima se une a este soporte por varios puntos, dada la superficie plana que este material presenta con respecto a la superficie de la enzima, modificando su estructura terciaria y alterando la estructura tridimensional del sitio activo. Analizando la estructura de la CPO (**figura 5.4**), se observa que la enzima presenta 5 grupos aminos superficiales, de los cuales 3 están ubicados superficialmente por el lado opuesto al sitio activo y estarían enlazados

covalentemente al soporte. La unión multipunto ha sido reportada por varios autores y relacionada con la disminución de la actividad de la enzima por el proceso de inmovilización covalente [110]. En las NP el anclaje multipunto no sería favorecido debido a que tanto el material como la enzima presentan una forma esférica y, además, son de tamaños comparables (9 nm de diámetro para las NP y 6 nm de diámetro para la CPO). Estas dos condiciones, favorecerían la unión de la enzima preferencialmente en un solo punto. En la **figura 5.5** se ilustra este efecto.

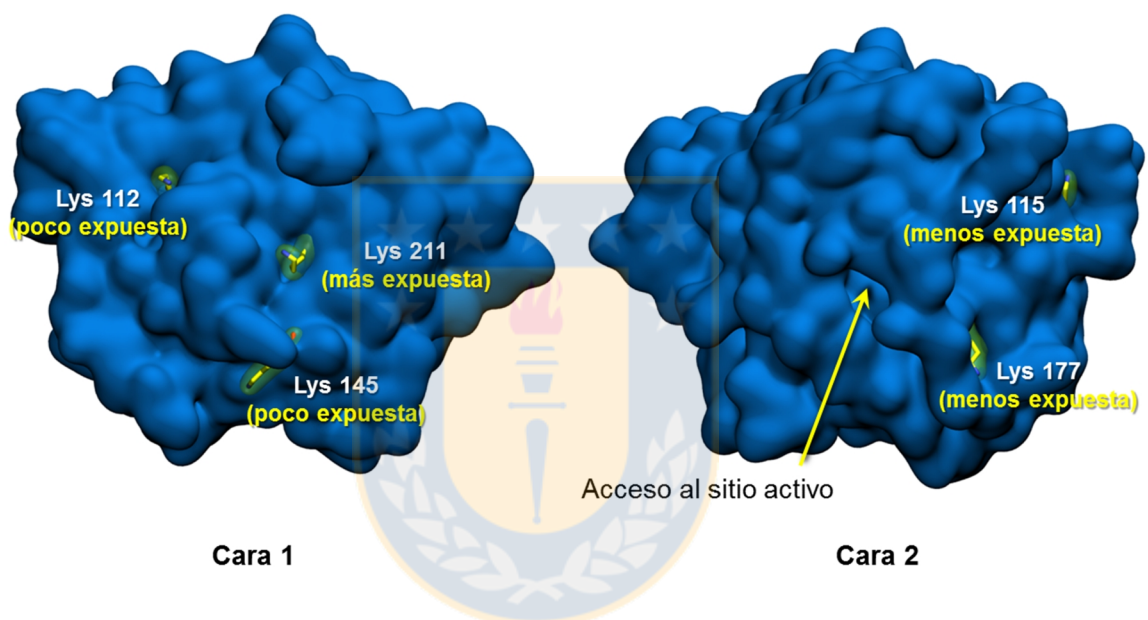


Figura 5.4. Ubicación de los grupos ϵ -amino de las lisinas superficiales en la estructura tridimensional de la cloroperoxidasa obtenida a partir de difracción de rayos X (RCSB Protein Data Bank: 1CPO [113]).

Comparando la carga de enzima obtenida por unión covalente en este trabajo con algunos reportes en la literatura, relacionados con la inmovilización covalente de CPO en materiales magnéticos, se encuentra que los valores obtenidos utilizando CPTMS como agente de acoplamiento son bastante bajos (entre 0,88 y 0,71 $\text{mg}_{\text{CPO}} \text{g}^{-1}_{\text{SOP}}$). Uno de los primeros reportes de inmovilización de CPO en materiales magnéticos fue realizado por Bayramoğlu y colaboradores [46], quienes obtuvieron una carga de 2,94 $\text{mg}_{\text{CPO}} \text{g}^{-1}_{\text{SOP}}$, uniendo la CPO a

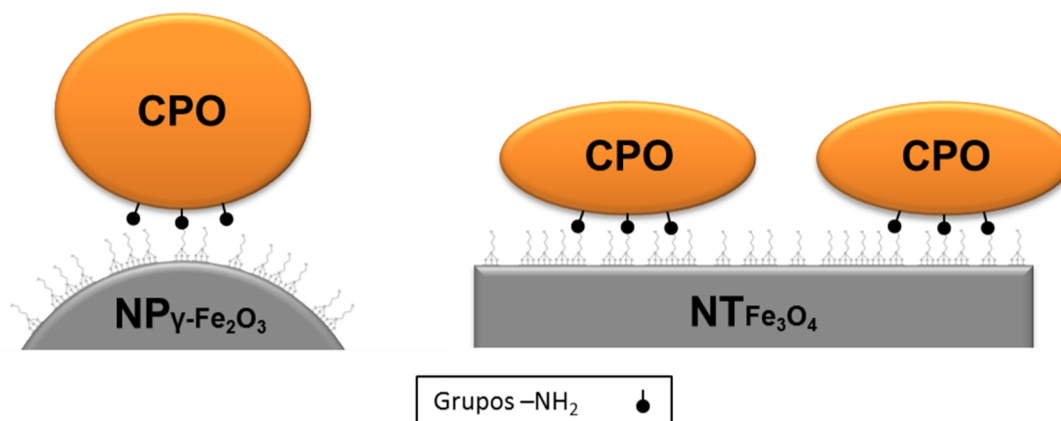


Figura 5.5. Posible efecto de la inmovilización multipunto sobre la estructura tridimensional de la CPO.

esferas magnéticas de magnetita recubiertas por una capa polimérica y utilizando glutaraldehído como agente de acoplamiento. Siguiendo una estrategia de inmovilización similar, Wang y colaboradores [48] lograron inmovilizar $16,1 \text{ mg}_{\text{CPO}} \text{ g}^{-1}_{\text{SOP}}$ en nanopartículas magnéticas (NPM) revestidas con una capa polimérica delgada. Recientemente, Cui y colaboradores [47] reportaron una estrategia bastante innovadora y específica para unir covalentemente la CPO a NPM de Fe_3O_4 , a través de un ensamble controlado capa por capa por interacciones de afinidad avidina – biotina, alcanzando una carga de $128,2 \text{ mg}_{\text{CPO}} \text{ g}^{-1}_{\text{SOP}}$. En nuestro caso, la ineficiencia del proceso de inmovilización pudo deberse a que en la etapa previa de funcionalización de los materiales, esta se llevó a cabo de manera parcial por la formación de agregados estables de estos óxidos en el medio orgánico donde se realizó este proceso.

Finalmente, al comparar las dos estrategias de inmovilización entre los sistemas que utilizaron el mismo soporte, se observa en términos generales que la inmovilización por unión covalente permitió obtener los biocatalizadores con las actividades específicas más altas, siendo 8 veces superior en el caso de los NT y 4 veces en el caso de las NP. El biocatalizador CPO-CPTMS- $\text{NP}_{\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3}$ fue el más activo con $46 \text{ U g}^{-1}_{\text{SOP}}$. Su mayor actividad específica estaría relacionada con la

minimización de las limitaciones difusionales que ofrecen las NP, y a que el acceso al sitio activo estaría menos impedido para el sustrato, gracias a la pequeña separación de la superficie que ofrece el agente de acoplamiento [110,124].

5.3 Eficiencia catalítica y estabilidad operacional de los biocatalizadores magnéticos

Se determinó la eficiencia catalítica de los biocatalizadores magnéticos evaluando su desempeño en la reacción de epoxidación del 3-aminoestireno a pH 6,0. Se escogió este sustrato para la reacción modelo debido a que con este compuesto la CPO alcanzó la actividad catalítica (k_{cat}) más alta en comparación con todos los demás sustratos evaluados hasta el momento (ver **sección 3.5**), lo que permitiría determinar de manera confiable los parámetros catalíticos de los biocatalizadores magnéticos cuyas actividades específicas fueron bastante bajas.

La actividad específica se determinó mediante el seguimiento de los epóxidos y los dioles producidos durante la reacción a pH 6,0. En cada caso, los datos cinéticos fueron ajustados a la ecuación de Hill para la obtención de los parámetros catalíticos respectivos (**figura 5.6**). En esta figura se observa que el biocatalizador CPO/NP_{Y-Fe₂O₃} presentó una actividad catalítica similar a la de la enzima libre, mientras que los dos sistemas inmovilizados covalentemente mostraron una actividad catalítica menor. Con el biocatalizador CPO/NT_{Fe₃O₄} no se pudieron obtener cantidades cuantificables de los productos dada su actividad específica tan pequeña, por lo tanto, no se reportan los parámetros catalíticos correspondientes a este sistema.

Este comportamiento queda reflejado en los valores de las constantes catalíticas (k_{cat}) obtenidas y que se reportan en la **tabla 5.3**. Las diferencias observadas para este parámetro posiblemente están asociadas con las diferencias en la naturaleza química que presenta la superficie del soporte en cada caso y su

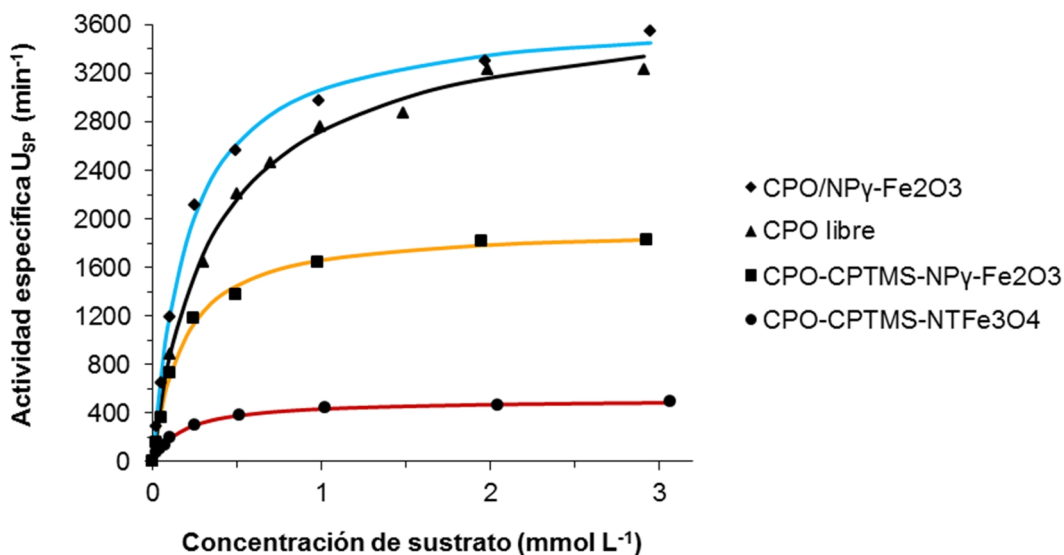


Figura 5.6. Curvas de actividad específica de la CPO libre y de biocatalizadores magnéticos para la reacción de epoxidación de 3-aminoestireno a pH 6,0. Las líneas sólidas corresponden al ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Hill utilizada como modelo. Condiciones de la reacción: buffer fosfatos pH 6,0 60 mmol L⁻¹, 2 U de biocatalizador, 15 %(v/v) de 2M2P como co-solvente, peróxido de hidrógeno (0,2 μmol min⁻¹), 293 K, 400 rpm y 5 min de reacción.

Tabla 5.3. Parámetros catalíticos obtenidos para los biocatalizadores magnéticos de CPO a partir de la ecuación de Hill, para la reacción de epoxidación de 3-aminoestireno a pH 6,0.

Biocatalizador	k_{cat} (min ⁻¹)	K' (mmol ⁿ L ⁻ⁿ)	k_{cat} / K'	n	Ajuste del modelo (R^2)
CPO libre	3869 ± 309	0,42 ± 0,08	9,2x10 ³	0,9 ± 0,1	0,992
CPO/NTFe ₃ O ₄	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.
CPO/NPγ-Fe ₂ O ₃	3681 ± 101	0,20 ± 0,02	1,8x10 ⁴	1,0 ± 0,1	0,997
CPO-CPTMS-NTFe ₃ O ₄	517 ± 28	0,19 ± 0,03	2,7x10 ³	1,0 ± 0,1	0,995
CPO-CPTMS-NPγ-Fe ₂ O ₃	1920 ± 57	0,16 ± 0,02	1,2x10 ⁴	1,1 ± 0,1	0,995

efecto sobre la estructura tridimensional de la enzima. Por un lado, las condiciones de pH utilizadas para la inmovilización electrostática en las $\text{NP}_{\gamma}\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (pH 6,0) permitieron que la enzima interaccionará directamente con la superficie del soporte sin sufrir cambios conformacionales que afectarán de manera significativa su actividad, lo que explicaría su constante catalítica similar a la de la enzima libre. Por otro lado, la funcionalización de la superficie de los soportes (tanto NP como NT) con CPTMS para la inmovilización covalente de la CPO, posiblemente cambió el microambiente, la orientación y la flexibilidad conformacional de la enzima [110] afectando su estructura tridimensional, lo cual se manifestó en las actividades catalíticas de forma negativa, presentando valores más bajos que el observado con la enzima libre (ver **figura 5.7**). El contacto cercano de la enzima con el soporte modificado en su superficie y la subsecuente interacción entre ellos, inevitablemente altera el balance de las fuerzas que mantienen la estructura de las enzimas nativas, conduciendo a la modificación de la función y estructura de la enzima, las cuales dependerán principalmente de la naturaleza química del soporte y del medio utilizado [125].

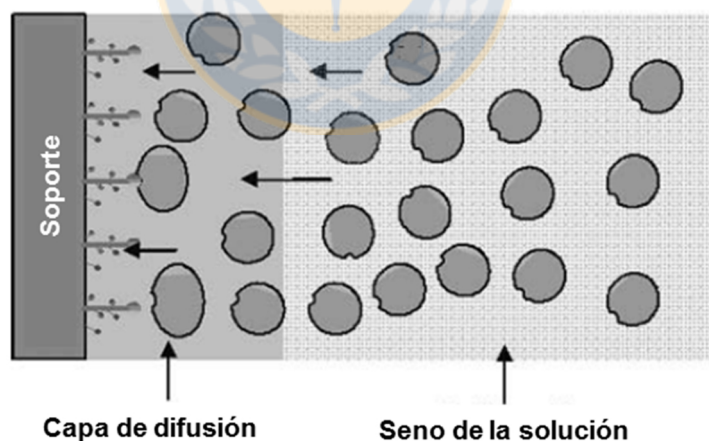


Figura 5.7. Cambio de conformación de la enzima aproximándose al soporte – efecto de la naturaleza química del soporte sobre las moléculas de enzima (tomado de [110]).

Analizando los coeficientes de cooperatividad n se observa que en todos los casos su valor fue 1,0, lo que permite aproximar el valor de K' a la constante de Michaelis K_m . Por consiguiente, a partir de los valores del parámetro K' se puede decir que en los tres biocatalizadores magnéticos la enzima presentó la misma afinidad por el sustrato, siendo esta 2 veces más alta que la presentada por la enzima libre (K' se redujo a la mitad en los sistemas inmovilizados). Lo que posiblemente ocurre aquí es que el 3-aminoestireno podría tener cierta afinidad por el soporte generando un ligero aumento de su concentración en torno a la enzima inmovilizada, manifestándose esto como un aumento en la afinidad. El anterior es un efecto del particionamiento del sustrato [29]. La afinidad del 3-aminoestireno por el soporte estaría dada por la posible formación de enlaces de hidrógeno con los grupos hidroxilos disponibles en la superficie de los dos óxidos de hierro [76]. Por otra parte, las constantes de especificidad (k_{cat}/K') de los biocatalizadores mostraron ligeros cambios con respecto a la enzima libre: los sistemas CPO/NP $_{\gamma}$ -Fe $_2$ O $_3$ y CPO-CPTMS-NP $_{\gamma}$ -Fe $_2$ O $_3$ aumentaron 2,0 y 1,3 veces, respectivamente, mientras que el biocatalizador CPO-CPTMS-NT $_{Fe_3O_4}$ se redujo en 0,3 veces. El comportamiento mostrado por este parámetro estuvo determinado principalmente por el valor de k_{cat} , puesto que el efecto de K' fue el mismo en todos los casos.

Finalmente, en la **tabla 5.4** se reportan los valores de NRT para los diferentes biocatalizadores que utilizan soportes magnéticos, excepto para el sistema CPO/NT $_{Fe_3O_4}$, el cual no arrojó resultados cuantificables en este experimento por su actividad específica muy baja. En esta tabla se observa que los sistemas CPO/NP $_{\gamma}$ -Fe $_2$ O $_3$ y CPO-CPTMS-NP $_{\gamma}$ -Fe $_2$ O $_3$ presentaron las estabilidades operacionales más altas, con valores de NRT de 30780 y 25730, respectivamente, los cuales fueron superiores al valor mostrado por la enzima libre (NRT=18510). Sin embargo, si se comparan estos valores con el obtenido para el sistema CPO/TiO $_2$ (NT) en la **sección 4.4** (NRT = 273040), se observa claramente que la estabilidad operacional ofrecida por las NP $_{\gamma}$ -Fe $_2$ O $_3$ a la CPO es mucho más baja en comparación con el TiO $_2$ (NT). Por otra parte, el biocatalizador CPO-CPTMS-NT $_{Fe_3O_4}$ fue el menos estable (NRT=9260), con un valor que es la mitad

Tabla 5.4. Estabilidad operacional para diferentes biocatalizadores de CPO medidos a pH 6,0, utilizando 3-aminoestireno como sustrato y dos nanomateriales magnéticos de óxidos de hierro como soportes.

Tipo de inmovilización	Biocatalizador	NRT	Factor de estabilidad ^a
Interacción electrostática	CPO/NT _{Fe₃O₄}	n.d.*	-
	CPO/NP _γ -Fe ₂ O ₃	30780	1,66
Unión covalente	CPO-CPTMS-NT _{Fe₃O₄}	9260	0,50
	CPO-CPTMS-NP _γ -Fe ₂ O ₃	25730	1,39

^a Calculado con respecto al valor de NRT para la CPO libre (NRT=18510).

* No determinado.

del NRT de la CPO libre. Este resultado indica claramente que la interacción entre la enzima y el soporte NT_{Fe₃O₄} modificado con CPTMS está ejerciendo un efecto adverso sobre la estabilidad operacional del biocatalizador. Lo anterior podría relacionarse con la posibilidad de formación de acoplamiento multipunto entre la enzima y el soporte, que deforman la estructura tridimensional de la CPO y que desfavorece su estabilidad operacional. Esta hipótesis también fue sugerida como explicación para la baja eficiencia de inmovilización (E_i) de este biocatalizador (ver **sección 5.2**), sin embargo, no pudo ser confirmada experimentalmente.

En términos generales, la tendencia observada en los valores de NRT está correlacionada directamente con las constantes de especificidad ($k_{cat}/K^?$) que presentaron los diferentes biocatalizadores, y por consiguiente, estarían determinados por los mismos factores que se discutieron para este parámetro. Aunque la formación de agregados de los materiales magnéticos desfavoreció la inmovilización de la enzima, los resultados obtenidos muestran claramente que la CPO soportada en las NP dio lugar a una mayor especificidad por el sustrato y mayor estabilidad operacional comparada con la enzima libre y la inmovilizada en los NT_{Fe₃O₄}.

CAPÍTULO 6

Conclusiones y perspectivas

Se lograron establecer algunos parámetros operacionales de la epoxidación de estirenos catalizadas por CPO, los cuales mejoraron la eficiencia catalítica y la estabilidad operacional de la enzima libre. El ajuste de la concentración y la dosificación del peróxido de hidrógeno, la selección de un co-solvente y su proporción adecuada en el medio de reacción, permitió el mejoramiento de los parámetros catalíticos y del NRT de la CPO con sustratos como el 3-cloroestireno, 3-nitroestireno, 3-metilestireno y 3-aminoestireno, los cuales no habían sido reportados hasta el momento. Por otra parte, se logró incrementar en 4,5 veces el valor del NRT para el estireno (NRT = 6700) con respecto al valor reportado por Zaks y Dodds utilizando CPO libre (NRT = 1500).

Se logró la inmovilización exitosa de la CPO sobre materiales como el MSU-F, titania anatasa y nanotubos de TiO₂, los cuales no habían sido utilizados antes para este fin particular. El aumento considerable de la estabilidad operacional de la enzima en estos soportes y su buen desempeño como biocatalizadores de las reacciones de epoxidación de derivados del estireno permite postular a estos materiales como potenciales soportes para la inmovilización de la CPO, si se considera una futura aplicación en química fina o para la industria farmacéutica.

La carga de enzima inmovilizada en los materiales nanoestructurados no magnéticos dependió principalmente de dos factores. El primero, de cuán grande

fue la diferencia entre el punto isoeléctrico del material y el pH de inmovilización, lo cual define la concentración de cargas en la superficie del material y condiciona la fuerza de la interacción electrostática entre la enzima y el soporte; y el segundo factor, de la morfología de los materiales, ya que los poros que forman cavidades conducen a la formación de agregados de enzima, mientras que los poros tipo canales como los nanotubos no lo permiten.

La inmovilización de la CPO sobre materiales nanoestructurados no magnéticos de tipo espumas silíceas mesocelulares y de titania mesoporosa con diferentes morfologías, permitió el mejoramiento de la actividad catalítica de la enzima (excepto en el biocatalizador CPO/TiO₂(AN)) y el aumento de la estabilidad operacional de la CPO para las reacciones de epoxidación del estireno y de los derivados considerados. En relación con la actividad catalítica a pH 6 con el estireno, el sistema CPO/MCF la incrementó en 35 veces con respecto a la CPO libre, mientras que la CPO/TiO₂(NT) lo hizo en 16 veces y la CPO/MSU-F en 6,5 veces. Por otra parte, los sistemas inmovilizados basados en TiO₂ presentaron los mayores valores de NRT con todos los sustratos evaluados, especialmente con el 3-aminoestireno, donde la estabilidad operacional de la CPO/TiO₂(NT) (NRT = 273040) incrementó aproximadamente 15 veces con respecto a la CPO libre (NRT = 18510). De todos los biocatalizadores obtenidos, el CPO/TiO₂(NT) fue el que presentó el mejor balance entre eficiencia catalítica y estabilidad operacional.

Se estableció una correlación lineal entre las energías de ionización (*E_I*) de los estirenos *m*-sustituídos determinada por cálculos DFT y las constantes catalíticas experimentales de las reacciones de epoxidación correspondientes catalizadas por la CPO libre, lo que confirmó la existencia de una relación estructura – actividad para la epoxidación de compuestos olefínicos, establecida previamente sobre modelos biomiméticos por otros investigadores.

Se logró llevar a cabo la inmovilización de CPO en dos materiales nanoestructurados magnéticos de óxidos de hierro: nanotubos de magnetita (NTFe₃O₄) y nanopartículas de maghemita (NP_γ-Fe₂O₃). Los biocatalizadores que

presentaron los mejores parámetros catalíticos y las estabilidades operacionales más altas fueron los obtenidos con $\text{NP}_{\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3}$ a partir de las dos estrategias de inmovilización ensayadas (interacción electrostática y unión covalente). Sin embargo, las actividades específicas presentadas por todos los sistemas inmovilizados en los soportes magnéticos fueron muy bajas en comparación con los sistemas obtenidos en los materiales no magnéticos, debido principalmente a las cargas de enzima extremadamente bajas.

La inmovilización de CPO por unión covalente utilizando 3-cloropropil-trimetoxi-silano (CPTMS) como agente de acoplamiento podría proponerse como una potencial estrategia para la inmovilización de enzimas sobre soportes magnéticos de óxidos de hierro, siempre y cuando se mejoren algunas condiciones de reacción para la funcionalización eficiente de estos soportes, ya que el medio apolar en el que se lleva a cabo este proceso (tolueno) favorece la formación de agregados de estos materiales (son materiales hidrofílicos), lo que reduce la eficiencia de esta etapa de funcionalización y que al final repercute sobre la cantidad de enzima que puede inmovilizarse.

Por otra parte, no se encontraron reportes en la literatura sobre el uso de CPTMS como agente de acoplamiento en la inmovilización de enzimas, por lo que sería muy importante continuar explorando su uso para la inmovilización covalente de CPO sobre otros tipos de materiales idóneos para este propósito, tales como nanopartículas de sílice o de titania.

Referencias bibliográficas

- [1] H. Lin, J.-Y. Liu, H.-B. Wang, A.A.Q. Ahmed, Z.-L. Wu, Biocatalysis as an alternative for the production of chiral epoxides: A comparative review, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 72 (2011) 77–89. doi:10.1016/j.molcatb.2011.07.012.
- [2] S.T. Oyama, ed., *Mechanisms in Homogeneous and Heterogeneous epoxidation catalysis*, Elsevier B.V., 2008.
- [3] E.J. Allain, L.P. Hager, Highly Enantioselective Epoxidation of Disubstituted Alkenes with Hydrogen Peroxide Catalyzed by Chloroperoxidase, *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 4415–4416.
- [4] F.J. Lakner, L.P. Hager, Chloroperoxidase as Enantioselective Epoxidation Catalyst: An Efficient Synthesis of (R)-(-)-Mevalonolactone, *J. Org. Chem.* 3263 (1996) 3923–3925.
- [5] L.P. Hager, F.J. Lakner, A. Basavapathruni, Chiral synthons via chloroperoxidase catalysis, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 5 (1998) 95–101.
- [6] K.M. Manoj, F.J. Lakner, L.P. Hager, Epoxidation of indene by chloroperoxidase, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 9 (2000) 107–111. doi:10.1016/S1381-1177(99)00118-6.
- [7] M. a. Pickard, T. a. Kadima, R.D. Carmichael, Chloroperoxidase, a peroxidase with potential, *J. Ind. Microbiol.* 7 (1991) 235–241. doi:10.1007/BF01577650.
- [8] M.A. Pickard, A. Hashimoto, Stability and carbohydrate composition of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* grown in a fructose-salts medium, *Can. J. Microbiol.* 34 (1988) 998–1002.
- [9] K.M. Manoj, L.P. Hager, Utilization of peroxide and its relevance in oxygen insertion reactions catalyzed by chloroperoxidase, *Biochim. Biophys. Acta.* 1547 (2001) 408–417.

- [10] M. Ayala, C. V Batista, R. Vazquez-Duhalt, Heme destruction, the main molecular event during the peroxide-mediated inactivation of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago.*, *J. Biol. Inorg. Chem.* 16 (2011) 63–68. doi:10.1007/s00775-010-0702-6.
- [11] D.J. Leak, R. a. Sheldon, J.M. Woodley, P. Adlercreutz, Biocatalysts for selective introduction of oxygen, *Biocatal. Biotransformation.* 27 (2009) 1–26. doi:10.1080/10242420802393519.
- [12] H. Ogino, H. Ishikawa, Enzymes which are stable in the presence of organic solvents., *J. Biosci. Bioeng.* 91 (2001) 109–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16232960>.
- [13] N. Doukyu, H. Ogino, Organic solvent-tolerant enzymes, *Biochem. Eng. J.* 48 (2010) 270–282. doi:10.1016/j.bej.2009.09.009.
- [14] L. Santhanam, J.S. Dordick, Chloroperoxidase-catalyzed Epoxidation of Styrene in Aqueous and Nonaqueous Media, *Biocatal. Biotransformation.* 20 (2002) 265–274. doi:10.1080/10242420290029481.
- [15] S. Águila, R. Vazquez-Duhalt, C. Covarrubias, G. Pecchi, J.B. Alderete, Enhancing oxidation activity and stability of iso-1-cytochrome c and chloroperoxidase by immobilization in nanostructured supports, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 70 (2011) 81–87. doi:10.1016/j.molcatb.2011.02.008.
- [16] E. Terrés, M. Montiel, S. Le Borgne, E. Torres, Immobilization of chloroperoxidase on mesoporous materials for the oxidation of 4,6-dimethyldibenzothiophene, a recalcitrant organic sulfur compound present in petroleum fractions., *Biotechnol. Lett.* 30 (2008) 173–9. doi:10.1007/s10529-007-9512-5.
- [17] M.P.J. van Deurzen, I.J. Remkes, F. van Rantwijk, R.A. Sheldon, Chloroperoxidase catalyzed oxidations in t-butyl alcohol / water mixtures, *J. Mol. Catal. A Chem.* 117 (1997) 329–337.
- [18] W.A. Loughlin, D.B. Hawkes, Effect of organic solvents on a chloroperoxidase biotransformation, *Bioresour. Technol.* 71 (2000) 167–172.
- [19] M.K. Walsh, R. a. Bombyk, A. Wagh, A. Bingham, L.M. Berreau, Synthesis of lactose monolaurate as influenced by various lipases and solvents, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 60 (2009) 171–177. doi:10.1016/j.molcatb.2009.05.003.
- [20] N. Bridiau, N. Issaoui, T. Maugard, The effects of organic solvents on the efficiency and regioselectivity of N-acetyl-lactosamine synthesis, using the β -galactosidase from *Bacillus circulans* in hydro-organic media., *Biotechnol. Prog.* 26 (2010) 1278–89. doi:10.1002/btpr.445.

- [21] J.-M. Xu, F. Zhang, Q. Wu, Q.-Y. Zhang, X.-F. Lin, Hydrolase-catalyzed Michael addition of 1,3-dicarbonyl compounds to α,β -unsaturated compounds in organic solvent, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 49 (2007) 50–54. doi:10.1016/j.molcatb.2007.08.004.
- [22] M. Naushad, Z.A. Alothman, A.B. Khan, M. Ali, Effect of ionic liquid on activity, stability, and structure of enzymes: a review., *Int. J. Biol. Macromol.* 51 (2012) 555–60. doi:10.1016/j.ijbiomac.2012.06.020.
- [23] J. Gorke, F. Sreenc, R. Kazlauskas, Toward advanced ionic liquids. Polar, enzyme-friendly solvents for biocatalysis, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 15 (2010) 40–53. doi:10.1007/s12257-009-3079-z.
- [24] M. Goldfeder, A. Fishman, Modulating enzyme activity using ionic liquids or surfactants., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98 (2014) 545–54. doi:10.1007/s00253-013-5395-7.
- [25] S. V. Muginova, a. Z. Galimova, a. E. Polyakov, T.N. Shekhovtsova, Ionic liquids in enzymatic catalysis and biochemical methods of analysis: Capabilities and prospects, *J. Anal. Chem.* 65 (2010) 331–351. doi:10.1134/S1061934810040027.
- [26] C. Sanfilippo, N. D'Antona, G. Nicolosi, Chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* is active in the presence of an ionic liquid as co-solvent., *Biotechnol. Lett.* 26 (2004) 1815–9. doi:10.1007/s10529-004-5087-6.
- [27] C. Chiappe, L. Neri, D. Pieraccini, Application of hydrophilic ionic liquids as co-solvents in chloroperoxidase catalyzed oxidations, *Tetrahedron Lett.* 47 (2006) 5089–5093. doi:10.1016/j.tetlet.2006.05.072.
- [28] R.J. Lichtenecker, W. Schmid, Application of various ionic liquids as cosolvents for chloroperoxidase-catalysed biotransformations, *Monatshefte Für Chemie - Chem. Mon.* 140 (2008) 509–512. doi:10.1007/s00706-008-0081-7.
- [29] R.C. Rodrigues, C. Ortiz, Á. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. Fernández-Lafuente, Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization., *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6290–307. doi:10.1039/c2cs35231a.
- [30] K. Seelbach, M.P. van Deurzen, F. van Rantwijk, R. a Sheldon, U. Kragl, Improvement of the total turnover number and space-time yield for chloroperoxidase catalyzed oxidation., *Biotechnol. Bioeng.* 55 (1997) 283–288. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19970720)55:2<283::AID-BIT6>3.0.CO;2-E.

- [31] M. Hartmann, X. Kostrov, Immobilization of enzymes on porous silicas - benefits and challenges., *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6277–6289. doi:10.1039/c3cs60021a.
- [32] P. Zucca, E. Sanjust, Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms, *Molecules.* 19 (2014) 14139–14194. doi:10.3390/molecules190914139.
- [33] D.N. Tran, K.J. Balkus, Perspective of Recent Progress in Immobilization of Enzymes, *ACS Catal.* 1 (2011) 956–968. doi:10.1021/cs200124a.
- [34] J.N. Talbert, J.M. Goddard, Enzymes on material surfaces., *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* 93 (2012) 8–19. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.01.003.
- [35] S.A. Ansari, Q. Husain, Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review., *Biotechnol. Adv.* 30 (2012) 512–523. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.09.005.
- [36] B. Brena, P. González-Pombo, F. Batista-Viera, Immobilization of enzymes: a literature survey., in: J.M. Guisan (Ed.), *Immobil. Enzym. Cells*, 3 Ed., Humana Press, New York, 2013: pp. 15–31. doi:10.1007/978-1-62703-550-7_2.
- [37] M. Anderson, B.K. Samra, H. Holmberg, P. Adlercreutz, USE OF CELITE-IMMOBILISED CHLOROPEROXIDASE IN PREDOMINANTLY ORGANIC MEDIA, *Biocatal. Biotransformation.* 17 (1999) 293–303.
- [38] S. Aoun, M. Baboukne, Regioselective bromohydroxylation of alkenes catalyzed by chloroperoxidase: Advantages of the immobilization of enzyme on talc, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 4 (1998) 101–109.
- [39] Y.-J. Han, J.T. Watson, G.D. Stucky, A. Butler, Catalytic activity of mesoporous silicate-immobilized chloroperoxidase, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 17 (2002) 1–8. doi:10.1016/S1381-1177(01)00072-8.
- [40] J. Aburto, M. Ayala, I. Bustos-Jaimes, C. Montiel, E. Terrés, J.M. Domínguez, et al., Stability and catalytic properties of chloroperoxidase immobilized on SBA-16 mesoporous materials, *Microporous Mesoporous Mater.* 83 (2005) 193–200. doi:10.1016/j.micromeso.2005.04.008.
- [41] A. Petri, T. Gambicorti, P. Salvadori, Covalent immobilization of chloroperoxidase on silica gel and properties of the immobilized biocatalyst, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 27 (2004) 103–106. doi:10.1016/j.molcatb.2003.10.001.

- [42] D. Jung, C. Streb, M. Hartmann, Covalent anchoring of chloroperoxidase and glucose oxidase on the mesoporous molecular sieve SBA-15., *Int. J. Mol. Sci.* 11 (2010) 762–78. doi:10.3390/ijms11020762.
- [43] E. Guerrero, P. Aburto, E. Terrés, O. Villegas, E. González, T. Zayas, et al., Improvement of catalytic efficiency of chloroperoxidase by its covalent immobilization on SBA-15 for azo dye oxidation, *J. Porous Mater.* 20 (2012) 387–396. doi:10.1007/s10934-012-9608-8.
- [44] M. Bakker, F. Van De Velde, F. Van Rantwijk, R.A. Sheldon, Highly Efficient Immobilization of Glycosylated Enzymes into Polyurethane Foams, (2000).
- [45] A.S. Campbell, C. Dong, J.S. Dordick, C.Z. Dinu, BioNano engineered hybrids for hypochlorous acid generation, *Process Biochem.* 48 (2013) 1355–1360. doi:10.1016/j.procbio.2013.06.011.
- [46] G. Bayramoğlu, S. Kiralp, M. Yilmaz, L. Toppare, M.Y. Arica, Covalent immobilization of chloroperoxidase onto magnetic beads: Catalytic properties and stability, *Biochem. Eng. J.* 38 (2008) 180–188. doi:10.1016/j.bej.2007.06.018.
- [47] R. Cui, C. Bai, Y. Jiang, M. Hu, S. Li, Q. Zhai, Well-defined bioarchitecture for immobilization of chloroperoxidase on magnetic nanoparticles and its application in dye decolorization, *Chem. Eng. J.* 259 (2015) 640–646. doi:10.1016/j.cej.2014.08.074.
- [48] W. Wang, Y. Xu, D.I.C. Wang, Z. Li, Recyclable nanobiocatalyst for enantioselective sulfoxidation: facile fabrication and high performance of chloroperoxidase-coated magnetic nanoparticles with iron oxide core and polymer shell., *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 12892–12893. doi:10.1021/ja905477j.
- [49] L. De Matteis, R. Germani, M.V. Mancini, F. Di Renzo, N. Spreti, Encapsulation of chloroperoxidase in novel hybrid polysaccharide-silica biocomposites: Catalytic efficiency, re-use and thermal stability, *Appl. Catal. A Gen.* 492 (2015) 23–30. doi:10.1016/j.apcata.2014.12.016.
- [50] L. De Matteis, R. Germani, M.V. Mancini, G. Savelli, N. Spreti, L. Brinchi, et al., Investigations to optimize the catalytic performance of CPO encapsulated in PEG 200-doped silica matrices, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 97 (2013) 23–30. doi:10.1016/j.molcatb.2013.07.011.
- [51] H.M. de Hoog, M. Nallani, J.J.L.M. Cornelissen, a E. Rowan, R.J.M. Nolte, I.W.C.E. Arends, Biocatalytic oxidation by chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* in polymersome nanoreactors., *Org. Biomol. Chem.* 7 (2009) 4604–4610. doi:10.1039/b911370c.

- [52] D. Jung, M. Paradiso, D. Wallacher, A. Brandt, M. Hartmann, Formation of cross-linked chloroperoxidase aggregates in the pores of mesocellular foams: characterization by SANS and catalytic properties., *ChemSusChem*. 2 (2009) 161–164. doi:10.1002/cssc.200800245.
- [53] M. Ayala, E. Horjales, M.A. Pickard, R. Vazquez-duhalt, Cross-linked crystals of chloroperoxidase, 295 (2002) 828–831.
- [54] W. Na, Q. Wei, H. Sun, Z.-R. Nie, Catalase immobilized on siliceous mesocellular foam with controlled window size, *J. Porous Mater.* 20 (2013) 75–79. doi:10.1007/s10934-012-9576-z.
- [55] D.I. Perez, F. van Rantwijk, R.A. Sheldon, Cross-Linked Enzyme Aggregates of Chloroperoxidase: Synthesis, Optimization and Characterization, *Adv. Synth. Catal.* 351 (2009) 2133–2139. doi:10.1002/adsc.200900303.
- [56] S.-S. Kim, T.R. Pauly, T.J. Pinnavaia, Non-ionic surfactant assembly of ordered, very large pore molecular sieve silicas from water soluble silicates, *Chem. Commun.* 123 (2000) 1661–1662. doi:10.1039/b002856h.
- [57] J. Hou, G. Dong, B. Xiao, C. Malassigne, V. Chen, Preparation of titania based biocatalytic nanoparticles and membranes for CO₂ conversion, *J. Mater. Chem. A*. 3 (2015) 3332–3342. doi:10.1039/C4TA05760K.
- [58] J. Hou, G. Dong, Y. Ye, V. Chen, Laccase immobilization on titania nanoparticles and titania-functionalized membranes, *J. Memb. Sci.* 452 (2014) 229–240. doi:10.1016/j.memsci.2013.10.019.
- [59] Q. Ai, D. Yang, Y. Li, J. Shi, X. Wang, Z. Jiang, Highly efficient covalent immobilization of catalase on titanate nanotubes, *Biochem. Eng. J.* 83 (2014) 8–15. doi:10.1016/j.bej.2013.11.021.
- [60] R. An, W. Zhuang, Z. Yang, X. Lu, J. Zhu, Y. Wang, et al., Protein adsorptive behavior on mesoporous titanium dioxide determined by geometrical topography, *Chem. Eng. Sci.* (2014). doi:10.1016/j.ces.2014.06.004.
- [61] M. Haruta, J. Kawahara, Epoxidation of Propylene with Oxygen-Hydrogen Mixtures, in: S. Ted Oyama (Ed.), *Mech. Homog. Heterog. Epoxidation Catal.*, Elsevier, 2008: pp. 297–313. doi:10.1016/B978-0-444-53188-9.00010-9.
- [62] Y. Zhu, H. Cao, L. Tang, X. Yang, C. Li, Immobilization of horseradish peroxidase in three-dimensional macroporous TiO₂ matrices for biosensor applications, *Electrochim. Acta.* 54 (2009) 2823–2827. doi:10.1016/j.electacta.2008.11.025.

- [63] Y. Zhang, P. He, N. Hu, Horseradish peroxidase immobilized in TiO₂ nanoparticle films on pyrolytic graphite electrodes: direct electrochemistry and bioelectrocatalysis, *Electrochim. Acta.* 49 (2004) 1981–1988. doi:10.1016/j.electacta.2003.12.028.
- [64] L. Zhang, Q. Zhang, X. Lu, J. Li, Direct electrochemistry and electrocatalysis based on film of horseradish peroxidase intercalated into layered titanate nano-sheets., *Biosens. Bioelectron.* 23 (2007) 102–106. doi:10.1016/j.bios.2007.03.015.
- [65] P. Xiao, B.B. Garcia, Q. Guo, D. Liu, G. Cao, TiO₂ nanotube arrays fabricated by anodization in different electrolytes for biosensing, *Electrochem. Commun.* 9 (2007) 2441–2447. doi:10.1016/j.elecom.2007.07.020.
- [66] J. Campos-Terán, I. Iñárritu, J. Aburto, E. Torres, Enhanced functionality of peroxidases by its immobilization at the solid-liquid interface of mesoporous materials and nanoparticles, in: J.M. Ruso, Á. Piñeiro (Eds.), *Proteins Solut. Interfaces Methods Appl. Biotechnol. Mater. Sci.*, First, Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2013: pp. 335–351.
- [67] J. Xu, J. Sun, Y. Wang, J. Sheng, F. Wang, M. Sun, Application of iron magnetic nanoparticles in protein immobilization., *Molecules.* 19 (2014) 11465–11486. doi:10.3390/molecules190811465.
- [68] H. Itoh, T. Sugimoto, Systematic control of size, shape, structure, and magnetic properties of uniform magnetite and maghemite particles, *J. Colloid Interface Sci.* 265 (2003) 283–295. doi:10.1016/S0021-9797(03)00511-3.
- [69] S.-J. Lee, J.-R. Jeong, S.-C. Shin, J.-C. Kim, J.-D. Kim, Synthesis and characterization of superparamagnetic maghemite nanoparticles prepared by coprecipitation technique, *J. Magn. Magn. Mater.* 282 (2004) 147–150. doi:10.1016/j.jmmm.2004.04.035.
- [70] B. Wang, Q. Wei, S. Qu, Synthesis and Characterization of Uniform and Crystalline Magnetite Nanoparticles via Oxidation-precipitation and Modified co-precipitation Methods, 8 (2013) 3786–3793.
- [71] M.I. Monterde, M. Lombard, A. Archelas, A. Cronin, M. Arand, R. Furstoss, Enzymatic transformations. Part 58: Enantioconvergent biohydrolysis of styrene oxide derivatives catalysed by the *Solanum tuberosum* epoxide hydrolase, *Tetrahedron: Asymmetry.* 15 (2004) 2801–2805. doi:10.1016/j.tetasy.2004.06.032.
- [72] K. Hattori, M. Nagano, T. Kato, I. Nakanishi, K. Imai, T. Kinoshita, et al., Asymmetric Synthesis of FR165914: A novel β ₃-Adrenergic Agonist with a

- Benzocycloheptene Structure, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 5 (1995) 2821–2824.
- [73] S. Hwang, C.Y. Choi, E.Y. Lee, Bio- and chemo-catalytic preparations of chiral epoxides, *J. Ind. Eng. Chem.* 16 (2010) 1–6. doi:10.1016/j.jiec.2010.01.001.
- [74] C. Jia, L. Sun, F. Luo, X. Han, L.J. Heyderman, Z. Yan, et al., Large-Scale Synthesis of Single-Crystalline Iron Oxide Magnetic Nanorings, (2008) 16968–16977.
- [75] F.A. Muñoz-Guerrero, S. Águila, R. Vazquez-Duhalt, C.C. Torres, C.H. Campos, J.B. Alderete, Biocatalytic performance of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* immobilized onto TiO₂ based supports, *Top. Catal.* (2015).
- [76] R.M. Cornell, U. Schwertmann, *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*, Second, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2003.
- [77] A.C. Maehly, B. Chance, Chapter 14. The Assay of catalases and peroxidases, in: D. Glick (Ed.), *Methods Biochem. Anal.* Vol. I, Interscience Publishers, 1954: pp. 357–424.
- [78] L.P. Hager, D.R. Morris, F.S. Brown, H. Eberwein, Chloroperoxidase: II. Utilization of halogen anions, *J. Biol. Chem.* 241 (1966) 1769–1777.
- [79] I.H. Segel, *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1993.
- [80] R. Massart, Preparation of Aqueous Magnétic liquids in Alkaline and Acidic Media, *IEEE Trans. Magn. Mag-17* (1981) 1247–1248.
- [81] R.A. Sheldon, S. van Pelt, Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how., *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6223–6235. doi:10.1039/c3cs60075k.
- [82] M.P.J. Van Deurzen, K. Seelbach, F. van Rantwijk, U. Kragl, R. a. Sheldon, Chloroperoxidase: Use of a Hydrogen Peroxide-Stat for Controlling Reactions and Improving Enzyme Performance, *Biocatal. Biotransformation.* 15 (1997) 1–16. doi:10.3109/10242429709003606.
- [83] K. Ryu, J.S. Dordick, How do organic solvents affect peroxidase structure and function?, *Biochemistry.* 31 (1992) 2588–2598. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1312352>.

- [84] S. Colonna, N. Gaggero, A. Manfredi, Enantioselective Oxidations of Sulfides Catalyzed by Chloroperoxidase, *Biochemistry*. 29 (1990) 10465–10468.
- [85] S. Colonna, N. Gaggero, L. Casella, G. Carrea, P. Pasta, Enantioselective Epoxidation of Styrene Derivatives by Chloroperoxidase Catalysis, *Tetrahedron: Asymmetry*. 4 (1993) 1325–1330.
- [86] M. Hofrichter, R. Ullrich, Heme-thiolate haloperoxidases: versatile biocatalysts with biotechnological and environmental significance., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71 (2006) 276–88. doi:10.1007/s00253-006-0417-3.
- [87] W. Sun, T.A. Kadima, M.A. Pickard, H.B. Dunford, Catalase activity of chloroperoxidase and its interaction with peroxidase activity, *Biochem. Cell Biol.* 72 (1994) 321–331.
- [88] F. van de Velde, M. Bakker, F. van Rantwijk, G.P. Rai, L.P. Hager, R.A. Sheldon, Engineering chloroperoxidase for activity and stability, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 11 (2001) 765–769.
- [89] J. Priego, C. Ortiz-Nava, M. Carrillo-Morales, A. López-Munguía, J. Escalante, E. Castillo, Solvent engineering: an effective tool to direct chemoselectivity in a lipase-catalyzed Michael addition, *Tetrahedron*. 65 (2009) 536–539.
- [90] D. Popescu, R. Hoogenboom, H. Keul, M. Moeller, Hydroxy functional acrylate and methacrylate monomers prepared via lipase—catalyzed transacylation reactions, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 62 (2010) 80–89. doi:10.1016/j.molcatb.2009.09.008.
- [91] S.J. Singer, The properties of Proteins in Nonaqueous Solvents, *Adv. Protein Chem.* 17 (1963) 1–68.
- [92] P.P. Wangikar, P.C. Michels, D.S. Clark, J.S. Dordick, Structure and function of subtilisin BPN' solubilized in organic solvents, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 70–76.
- [93] A.L. Serdakowski, J.S. Dordick, Enzyme activation for organic solvents made easy., *Trends Biotechnol.* 26 (2008) 48–54. doi:10.1016/j.tibtech.2007.10.007.
- [94] L. Yang, J.S. Dordick, S. Garde, Hydration of enzyme in nonaqueous media is consistent with solvent dependence of its activity., *Biophys. J.* 87 (2004) 812–821. doi:10.1529/biophysj.104.041269.
- [95] A.S. Bommarius, B.R. Riebel, *Biocatalysis. Fundamentals and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2004.

- [96] J.G. SPEIGHT, Lange's Handbook of Chemistry, 16th ed., McGraw-Hill, New York, 2005.
- [97] K. Ryu, J.S. Dordick, How do organic solvents affect peroxidase structure and function?, *Biochemistry*. 31 (1992) 2588–98. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1312352>.
- [98] F. Van De Velde, M. Bakker, F. Van Rantwijk, R.A. Sheldon, Chloroperoxidase-Catalyzed Enantioselective Oxidations in Hydrophobic Organic Media, *Biotechnol. Bioeng.* 72 (2001) 523–529.
- [99] A. Zaks, D.R. Dodds, Chloroperoxidase-Catalyzed Asymmetric Oxidations: Substrate Specificity and Mechanistic Study, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 10419–10424.
- [100] M. Hartmann, Ordered Mesoporous Materials for Bioadsorption and Biocatalysis, *Chem. Mater.* 17 (2005) 4577–4593.
- [101] D.R. Morris, L.P. Hager, Chloroperoxidase I. Isolation and properties of the crystalline glycoprotein, *J. Biol. Chem.* 241 (1966) 1763–1768.
- [102] P.F. Hallenberg, L.P. Hager, Purification of Chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*, *Methods Enzymol.* 52 (1978) 521–529. doi:10.1016/S0076-6879(78)52057-0.
- [103] K.S.W. Sing, REPORTING PHYSISORPTION DATA FOR GAS/SOLID SYSTEMS with Special Reference to the Determination of Surface Area and Porosity, *Pure Appl. Chem.* 57 (1985) 603–619.
- [104] J. Li, G. Yin, Y. Ding, X. Liao, X. Chen, Z. Huang, et al., Amino-functionalized mesostructured cellular foams as carriers of glucose oxidase., *J. Biosci. Bioeng.* 116 (2013) 555–61. doi:10.1016/j.jbiosc.2013.04.021.
- [105] C. Garcia-Galan, Á. Berenguer-Murcia, R. Fernandez-Lafuente, R.C. Rodrigues, Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance, *Adv. Synth. Catal.* 353 (2011) 2885–2904. doi:10.1002/adsc.201100534.
- [106] J. Deere, E. Magner, J.G. Wall, B.K. Hodnett, Mechanistic and Structural Features of Protein Adsorption onto Mesoporous Silicates, *J. Phys. Chem. B.* 16 (2002) 7340–7347.
- [107] A. Popat, S.B. Hartono, F. Stahr, J. Liu, S.Z. Qiao, G. Qing Max Lu, Mesoporous silica nanoparticles for bioadsorption, enzyme immobilisation, and delivery carriers., *Nanoscale.* 3 (2011) 2801–18. doi:10.1039/c1nr10224a.

- [108] A. Illanes, ed., *Enzyme Biocatalysis. Principles and Applications*, Springer, Sine loco, 2008.
- [109] J.A. Thomas, D.R. Morris, L.P. Hager, Chloroperoxidase VII. Classical peroxidatic, catalytic, and halogenating forms of the enzyme, *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 3129–3134.
- [110] L. Cao, *Carrier-bound Immobilized Enzymes. Principles, Applications and Design*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005.
- [111] S. Hudson, E. Magner, J. Cooney, B.K. Hodnett, Methodology for the immobilization of enzymes onto mesoporous materials., *J. Phys. Chem. B.* 109 (2005) 19496–506. doi:10.1021/jp052102n.
- [112] S. Hudson, J. Cooney, B.K. Hodnett, E. Magner, Chloroperoxidase on Periodic Mesoporous Organosilanes: Immobilization and Reuse, *Chem. Mater.* 19 (2007) 2049–2055. doi:10.1021/cm070180c.
- [113] M. Sundaramoorthy, J. Turner, T.L. Poulos, The crystal structure of chloroperoxidase: a heme peroxidase--cytochrome P450 functional hybrid., *Structure.* 3 (1995) 1367–1377. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8747463>.
- [114] C. Mateo, J.M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J.M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 1451–1463. doi:10.1016/j.enzmictec.2007.01.018.
- [115] V. V. Mozhaev, N.S. Melik-Nubarov, Strategy for Stabilizing Enzymes Part One: Increasing Stability of Enzymes via their Multi-Point Interaction with a Support, *Biocatalysis.* 3 (1990) 179–187.
- [116] B. Valderrama, Deactivation of Hemeperoxidases by Hydrogen Peroxide: Focus on Compound III, in: E. Torres, M. Ayala (Eds.), *Biocatal. Based Heme Peroxidases*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2010: pp. 291–314. doi:10.1007/978-3-642-12627-7.
- [117] R. Vazquez-duhalt, K.M. Semple, D.W.S. Westlake, P.M. Fedorak, Effect of water-miscible organic solvents on the catalytic activity of cytochrome c, *Enzyme Microb. Technol.* 15 (1993) 936–943.
- [118] J.-B. Park, D.S. Clark, Deactivation Mechanisms of Chloroperoxidase During Biotransformations, *Biotechnol. Bioeng.* 93 (2006) 1190–1195. doi:10.1002/bit.

- [119] J.P. Collman, T. Kodadek, S.A. Raybuck, J.I. Brauman, L.M. Papazian, Mechanism of Oxygen Atom Transfer from High Valent Iron Porphyrins to Olefins: Implications to the Biological Epoxidation of Olefins by Cytochrome P450, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 4343–4345.
- [120] D. Kumar, B. Karamzadeh, G.N. Sastry, S.P. De Visser, What Factors Influence the Rate Constant of Substrate Epoxidation by Compound I of Cytochrome P450 and Analogous Iron (IV) -Oxo Oxidants ?, (2010) 7656–7667.
- [121] M. a. Sainna, S. Kumar, D. Kumar, S. Fornarini, M.E. Crestoni, S.P. de Visser, A comprehensive test set of epoxidation rate constants for iron(iv)–oxo porphyrin cation radical complexes, *Chem. Sci.* 6 (2015) 1516–1529. doi:10.1039/C4SC02717E.
- [122] C. Hansch, A. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, Wiley-Interscience, New York, 1979.
- [123] N.B. Chapman, J. Shorter, eds., Correlation Analysis in Chemistry. Recent Advances, Plenum Pres, New York, 1978.
- [124] J. Kim, J.W. Grate, P. Wang, Nanostructures for enzyme stabilization, *Chem. Eng. Sci.* 61 (2006) 1017–1026. doi:10.1016/j.ces.2005.05.067.
- [125] A. Kondo, F. Murakami, M. Kawagoe, K. Higashitani, Kinetic and circular dichroism studies of enzymes adsorbed on ultrafine silica particles, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39 (1993) 726–731.