

00524
114

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA



**INMOVILIZACION DE LA CLOROPEROXIDASA (CPO) EN
MATERIALES MESOPOROSOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A :
MONTIEL ROLDAN MAYRA ALONDRA

MEXICO, D. F.



**EXÁMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**

2003.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente: Prof. Jose Manuel Méndez Stivalet

Vocal: Prof. Ismael Bustos Jaimes

Secretario: Prof. Eduardo Torres Ramírez

1er. Suplente: Prof. Alberto Gómez Gutiérrez

2o. Suplente: Prof. María Paz Sánchez Bravo

Instituto Mexicano del Petróleo.

Asesor: Eduardo Torres Ramírez

E. Torres. R.

Supervisor Técnico: Eduardo Terrés Rojas

E. T. R.

Sustentante: Mayra Alondra Montiel Roldán

~~M. A. M. R.~~

AGRADECIMIENTOS

A la Educación Pública y Gratuita, sin la cual no hubiese llegado hasta aquí.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por todo lo que aprendí dentro y fuera de los salones de clase.

A mis asesores, Dr. Eduardo Torres Ramírez y M. en C. Eduardo Terrés Rojas, por su valiosa enseñanza.

Al IMP por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo, en especial al "Programa de Tecnología complementaria al proceso de hidrodesulfuración del diesel D.00020" y al "Programa de Ingeniería Molecular D.01234".

Esta tesis se realizó en **L^AT_EX**

DEDICATORIAS

A mi mamá Paulina por todo su cariño y apoyo. gracias por creer en mi aún en los momentos más complicados. A mis hermanos Sara, Ardán (y retoñitos), Ismael y Brisa, mis amigos de toda la vida, sin ustedes hubiese sido más difícil.

A David con amor, por estar a mi lado sin importar las circunstancias.

A mi familia, por su apoyo.

A mis amigos, en especial a "Los de la Imprenta", con quienes viví los momentos más intensos en el periodo 1999-2000.

Al Movimiento Estudiantil de la UNAM 1999-2000 (CGH), por todo lo que aprendí y maduré.

Índice general

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. La problemática del azufre en los combustibles	3
2.2. Desulfuración del petróleo	5
2.3. Desulfuración Oxidativa	9
2.4. BIODESULFURACIÓN	10
2.5. Peroxidasas	12
2.6. La Cloroperoxidasa: una peroxidasa con aplicación potencial	16
2.7. Inmovilización de enzimas en materiales mesoporosos	20
3. OBJETIVOS	27
4. MATERIALES Y MÉTODOS	28
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
5.1. Síntesis de materiales mesoporosos	33
5.2. Síntesis de SBA-16	40
5.3. Determinación del pH óptimo de reacción y de inmovilización	50
5.4. Inmovilización de la CPO	51
5.5. Efecto del acetonitrilo en la actividad catalítica de la CPO	54

5.6. Efecto de la temperatura en la actividad catalítica de la CPO	59
5.7. Estabilidad de la CPO a 45°C	61
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	64
7. REFERENCIAS	66
A. APÉNDICE	71
A.1. Propiedades texturales de los sólidos catalíticos	71
A.2. Difracción de Rayos X	78
A.3. MCM-41	81

Índice de cuadros

2.1. Contenido de azufre en diesel tras la oxidación catalizada por la Cloroperoxidasa . . .	16
2.2. Efectos generales de los disolventes orgánicos en la biocatálisis	19
2.3. Ventajas y desventajas del uso de materiales mesoporosos para la inmovilización de enzimas	26
5.1. Características texturales de los materiales sintetizados con L64	37
5.2. Características texturales de los materiales sintetizados con F127	39
5.3. Características texturales de los materiales SBA16	46
5.4. Principales características de los biocatalizadores soportados	53
5.5. Actividad catalítica de la CPO a diferentes concentraciones de acetonitrilo	55
5.6. Actividad específica de la CPO a diferentes concentraciones de acetonitrilo	58
5.7. Oxidación del 4,6 DM DBT por enzimas oxidativas en 20% de acetonitrilo	58
5.8. Actividad específica de la CPO a diferentes temperaturas	61
5.9. Tiempo al 50% de la actividad catalítica de la CPO a 45°C	62
A.1. Clasificación de la IUPAC de las isotermas de adsorción	74

Índice de figuras

2.1. Clasificación de los procesos de desulfuración	6
2.2. Compuestos organosulfurados y su ruta de hidrotreamiento	8
2.3. Ruta metabólica de la desulfuración del DBT por <i>Rhodococcus erythropolis IGTS8</i>	10
2.4. Ciclo de reacción de las peroxidasas	13
2.5. Cloroperoxidasa de <i>Caldariomyces fumago</i>	18
2.6. Fases micelares	22
2.7. Simulaciones moleculares de la peroxidasa de rábano blanco inmovilizada en FSM-16	24
5.1. Nomenclatura de los materiales sintetizados con L64 y F127	33
5.2. Isotermas de adsorción-desorción de los materiales sintetizados con L64	35
5.3. Distribución de diámetro de poro de los materiales sintetizados con L64	36
5.4. Distribución de tamaño de poro de los materiales sintetizados con F127	38
5.5. Isotermas de adsorción-desorción de los materiales sintetizados con F127	40
5.6. Nomenclatura de los materiales SBA16	41
5.7. Distribución de tamaño de poro de SBA16-34 (0), SBA16-149 (24), SBA16-193 (36), SBA16-149 (48)	42
5.8. Isotermas de adsorción-desorción de SBA16-34 (0), SBA16-149 (24), SBA16-193 (36) y SBA16-149 (48)	43
5.9. Isotermas de adsorción-desorción de SBA16-34 (0), SBA16-32 (2), SBA16-41 (4) y SBA16-32 (6)	44

5.10. Distribución de diámetro de poro de SBA16-34 (0), SBA16-32 (2), SBA16-41 (4) y SBA16-32 (6)	45
5.11. Isotermas de adsorción-desorción de SBA16-34 (0), SBA16-91 (7), SBA16-89 (8), SBA16-116 (9) y SBA16-117 (12)	46
5.12. Distribución de diámetro de poro de SBA16-34 (0), SBA16-91 (7), SBA16-89 (8), SBA16-116 (9) y SBA16-117 (12)	47
5.13. Microscopía electrónica de barrido del material SBA-16	49
5.14. Microscopía electrónica de transmisión del material SBA-16	49
5.15. Perfil catalítico de la CPO con respecto al pH	51
5.16. Estructura de los silicatos y los aluminosilicatos	52
5.17. Perfil catalítico de la CPO con respecto a la concentración de acetonitrilo	54
5.18. Actividad específica de la CPO con respecto a la concentración de acetonitrilo	57
5.19. Actividad catalítica de la CPO a diferentes temperaturas	60
5.20. Actividad catalítica de la CPO a 45°C	62
A.1. Diferencia entre la absorción y la adsorción	71
A.2. Clasificación de la IUPAC de las isotermas de adsorción	73
A.3. Isoterma de adsorción-desorción	76
A.4. Demostración de la Ley de Bragg	79
A.5. Difracción de Rayos X del material MCM-41	82
A.6. Fotomicrografía del MCM-41, arreglos hexagonales ordenados	82

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ACN	Acetonitrilo
BDS	Biodesulfuración
BT	Benzotiofeno
CNS	Grupos funcionales ciano
CPO	Cloroperoxidasa
DBT	Dibenzotiofeno
DRX	Difracción de rayos X
4,6 DM DBT	4,6 Dimetil dibenzotiofeno
EO	Óxido de etileno
FSM	Materiales mesoporosos de hoja plegada
HBP	Hidroxibifenilo
HDS	Hidrodesulfuración
HCl	Ácido clorhídrico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HRP	Peroxidasa de rábano blanco
KCl	Cloruro de potasio
ODS	Desulfuración oxidativa
PO	Óxido de propileno
TEOS	Tetraetilortosilicato
TMEOS	Tetrametilortosilicato
TPA	Ácido tungstosulfúrico

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

Debido al uso generalizado de los hidrocarburos en diversas actividades humanas, el contenido de azufre en el petróleo es de gran importancia por las consecuencias colaterales que implica. El azufre emitido a la atmósfera deriva principalmente del uso de combustibles automotrices e industriales, por lo que se ha establecido que el nivel de este elemento en los combustibles deberá disminuir de 350 a 50 ppm a partir del 2006. Si bien es cierto que ya existen tecnologías para eliminar una cantidad importante de los compuestos organoazufrados del petróleo (como la HDS), los costos para obtener los rendimientos requeridos no son viables, existiendo así la necesidad de nuevas propuestas que puedan resolver el problema.

Entre las alternativas potenciales que han emergido se encuentra la biodesulfuración, en la que se propone el empleo de microorganismos desulfurantes tales como *Rhodococcus erythropolis*, capaz de "extraer" el átomo de azufre de las moléculas organoazufradas, lo cual sería muy conveniente en un proceso de desulfuración del petróleo. Sin embargo, una limitante importante es la estabilidad de los microorganismos en medios orgánicos como el petróleo, donde los contenidos de agua son muy bajos. Con la intención de reducir estas limitantes se ha propuesto la aplicación de diversas enzimas aisladas con capacidad de oxidar compuestos organoazufrados recalcitrantes a sus correspondientes sulfonas, que al ser de mayor peso molecular y polaridad son más fáciles de remover. La ventaja de

usar enzimas aisladas en vez del microorganismo completo es que son más tolerantes a los medios orgánicos, factor importante para la aplicación en un proceso de refinación del petróleo. Una de las enzimas que puede realizar este tipo de catálisis es la cloroperoxidasa (CPO) producida por el hongo marino *Caldariomyces fumago*, la cual presenta actividades catalíticas muy elevadas con respecto a otras enzimas que realizan este tipo de oxidaciones (Torres *et al*, 2003).

Aún cuando las enzimas son más tolerantes que los microorganismos completos a los medios orgánicos, se ha explorado la forma de mejorar su estabilidad en medios con la menor cantidad posible de agua, sistema que se aproximaría al existente en los procesos de refinación; con el objetivo de mejorar la estabilidad de las enzimas se han llevado a cabo varios procesos como la modificación química, la encapsulación, el entrecruzamiento, la inmovilización, etc (Coombs, 2002). Con el advenimiento de los materiales mesoporosos (Zhao *et al*, 1998a), se abre un área para explorar la inmovilización enzimática; estos materiales tienen la peculiaridad de que el tamaño de los poros puede ser muy cercano al diámetro molecular de las enzimas, lo cual permite inmovilizarlas en los poros de forma más ordenada. Una de las ventajas potenciales de este tipo de inmovilización es que la enzima se fija al material una vez que se ha sintetizado, por lo que la enzima no tiene que ser expuesta a condiciones extremas en el proceso, además este tipo de materiales tienen gran área superficial, son inocuos y son química y mecánicamente estables.

En este trabajo se evaluó el efecto de la inmovilización de la CPO en materiales mesoporosos tipo SBA-16, enfrentando al biocatalizador libre e inmovilizado a sistemas con alto contenido de disolvente. Aún cuando la actividad catalítica de la CPO inmovilizada es inferior a la que presenta la enzima libre, ésta sigue siendo superior a la de otras enzimas que reconocen al sustrato empleado, por lo que los resultados alcanzados permiten continuar explorando el potencial de aplicación de la catálisis enzimática en la industria petrolera.

Capítulo 2

ANTECEDENTES

2.1. La problemática del azufre en los combustibles

La combustión empleada para obtener calor, generar energía eléctrica o movimiento, es el proceso de emisión de contaminantes atmosféricos más significativo. El aire puro es una mezcla gaseosa compuesta por 78 % de nitrógeno, 21 % de oxígeno y 1 % de diferentes compuestos tales como el argón, el dióxido de carbono y el ozono, por lo que la contaminación atmosférica se refiere a cualquier cambio en el equilibrio de estos componentes, lo cual altera las propiedades físicas y químicas del aire (Chamizo y Garritz, 1995), siendo los principales contaminantes los óxidos de nitrógeno, los hidrocarburos y los óxidos de azufre, entre otros.

En el ámbito nacional, la contaminación atmosférica se limita a las zonas de alta densidad demográfica o industrial, las emisiones anuales de contaminantes en el país son superiores a 16 millones de toneladas de las cuales el 65 % es de origen vehicular, por lo que la contaminación por óxidos de azufre es uno de los temas que más ha llamado la atención (Comisión Metropolitana para la Prevención y Control de la Contaminación Ambiental en el Valle de México, 1996).

Óxidos de azufre

El principal contaminante atmosférico es el grupo de los óxidos de azufre debido a que es el componente mayoritario de la lluvia ácida. Estudios realizados en el Distrito Federal demuestran que el pH del agua de lluvia es menor a 5.5 (valor menor al de una atmósfera limpia), por lo que sobre nuestra ciudad "lueve ácido" (Comisión Metropolitana para la Prevención y Control de la Contaminación Ambiental en el Valle de México, 1996). Los óxidos de azufre se producen cuando el azufre elemental o sus compuestos se queman en el aire (Chamizo y Garritz, 1995)



Una parte importante de estas emisiones es atribuible al hombre por quemar carbón de coque con alto contenido de azufre, extraer metales de sulfuros, quemar combustibles sin reformar (diesel y combustóleo), entre otros. El SO_2 tiene un tiempo corto de residencia en la atmósfera y en presencia de oxígeno y luz se oxida a SO_3



El trióxido también es peligroso, pues reacciona con el agua para formar ácido sulfúrico, que es sumamente corrosivo



Con la lluvia, el SO_2 y el SO_3 son "lavados" de la atmósfera y se vierten sobre ríos y mares en forma de ácido sulfídrico y ácido sulfúrico (H_2SO_3 y H_2SO_4), por lo que la acidez del agua aumenta. Este fenómeno afecta la salud, provocando irritación en los ojos y el tracto respiratorio, reduciendo las funciones pulmonares y agravando las enfermedades respiratorias como el asma, la bronquitis crónica y el enfisema. En cuanto al efecto sobre algunos materiales, corroe los metales, deteriora los contactos eléctricos, el papel, los textiles, las pinturas, e incluso los materiales de

construcción.



En la industria, el azufre presente en productos de petróleo contamina los convertidores catalíticos, corroe partes de motores de combustión interna y de refinería debido a la formación de oxiácidos de sulfuro (Hangun, *et al.*, 2002).

El grado de emisión de SO_2 en la combustión del carbón y del petróleo depende del nivel de su contenido de azufre, por lo que el petróleo bajo en este elemento tiene mayor demanda y en consecuencia su precio es mayor. En México la NOM-086-ECOL-1994 señala que el nivel máximo permisible de azufre en los combustibles es de 500 ppm, actualmente el nivel se encuentra alrededor de 350 ppm; la Agencia de Protección al Medio Ambiente de los Estados Unidos (EPA) ha establecido que los requerimientos reducirán el contenido de sulfuro del diesel y la gasolina a 30 ppm para el 2004 y a 15 ppm para el 2006. Por otro lado, la Secretaría del Medio Ambiente del Distrito Federal ha propuesto reducir el nivel de azufre en diesel combustible de 400 a 300 ppm para el año 2004 y en Premium[®] de 220 a 30 ppm para el año 2006, por mencionar algunos ejemplos (<http://www.rolac.unep.mx>). Debido a lo anterior, se han desarrollado nuevas metodologías que sean aplicables a la industria y que permitan reducir aún más los niveles de azufre.

2.2. Desulfuración del petróleo

El campo de investigación aplicada a la desulfuración del petróleo es muy amplio, los métodos son variados y aunque algunos procesos ya son aplicados, la investigación de técnicas alternativas más eficientes sigue en pie.

No hay una forma universal para clasificar los procesos de desulfuración, sin embargo esto puede hacerse basándose en la ruta por la que los compuestos organosulfurados son transformados

(Babich y Mouljin, 2003). Los procesos pueden ser divididos en tres grupos dependiendo de si los compuestos sulfurados son transformados, separados de la corriente de la refinación sin descomposición o por ambas (figura 2.1). En el primer tipo de proceso cuando los compuestos organoazufrados se transforman, se forman productos sulfurados gaseosos o sólidos y la parte hidrocarbonada es recuperada y devuelta a la corriente del proceso de refinación, la hidrodesulfuración convencional (HDS) es el ejemplo más típico de este tipo de procesos. En el segundo tipo de proceso los compuestos organosulfurados son simplemente separados de la corriente del proceso de refinación; algunos procesos de este tipo primero transforman los compuestos organosulfurados en otros que son más fáciles de separar; cuando la corriente es desulfurada por separación algunos productos deseados se pueden perder al ser retenidos por las moléculas organosulfuradas. En el tercer tipo de proceso, los compuestos organosulfurados son separados de la corriente y descompuestos en una unidad de reactor, estos procesos combinados, los cuales proveen las bases de tecnologías propuestas recurrentemente para la aplicación en la industria, son promisorios para la producción de combustibles ultra-bajos en contenidos de azufre.

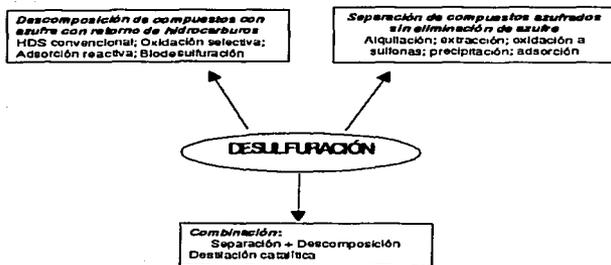


Figura 2.1: Clasificación de los procesos de desulfuración (Babich y Mouljin, 2003).

En la actualidad, uno de los procesos más empleados es el de la HDS, el cual es esencialmente una reducción catalítica con hidrógeno a alta temperatura (350-500 °C) y alta presión (~ 1000psi), convirtiendo los compuestos organosulfurados a sulfuro de hidrógeno (H₂S) e hidrocarburos (Topsoe *et al.*, 1996). El proceso convencional de HDS usualmente se realiza con catalizadores como CoMo/Al₂O₃ y NiMo/Al₂O₃. Su transformación en términos de nivel de desulfuración, actividad y selectividad depende de las propiedades de especificidad del catalizador usado (concentración de la especie activa, propiedades del soporte, ruta de síntesis), las condiciones de reacción (temperatura, presión parcial de hidrógeno y H₂S, etc.), la naturaleza y concentración de los compuestos sulfurados presentes en la corriente de alimentación, entre otros.

En la figura 2.2 se muestran algunos de los compuestos organosulfurados presentes en el petróleo, los compuestos sulfurados orgánicos polinucleares también son de interés para la desulfuración profunda de la corriente del proceso de refinación; sin embargo, son muy estables bajo las condiciones de la HDS convencional y las rutas de reacción de desulfuración son más complejas comparadas con el dibenzotiofeno alquilado y no se conocen bien (Topsoe *et al.*, 1996).

La reactividad de los compuestos organosulfurados varía enormemente dependiendo de la estructura y del ambiente local del átomo de azufre. La reactividad en la HDS sigue este orden (del más reactivo al menos reactivo): tiofeno > tiofeno alquilado > BT (benzotiofeno) > BT alquilado > DBT (dibenzotiofeno) y DBT alquilado sin sustituyentes en las posiciones 4 y 6 > DBT alquilado con un sustituyente ya sea en la posición 4 o en la posición 6 > DBT sustituido con alquilo en las posiciones 4 y 6 (Babich y Mouljin, 2003; Topsoe *et al.* 1996). La desulfuración deseada del combustible implica que los compuestos sulfurados menos reactivos puedan ser transformados.

Aunque la HDS es un proceso que ha sido implementado por refinerías del petróleo por varias décadas, los costos de operación son muy altos, especialmente cuando se requiere la reducción del contenido de sulfuros por debajo de 50 ppm. Como consecuencia, se están buscando alternativas

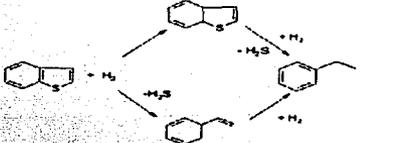
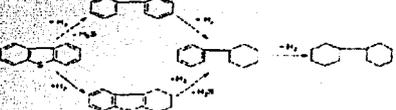
Tipo de compuestos orgánicos azufrados	Estructura química	Mecanismo de reacción de hidrotatamiento
Mercaptanos	$R-S-H$	$R-S-H + H_2 \longrightarrow R-H + H_2S$
Sulfuros	R^1-S-R^2	$R^1-S-R^2 + 2H_2 \longrightarrow R^1-H + R^2-H + H_2S$
Disulfuros	$R^1-S-S-R^2$	$R^1-S-S-R^2 + 3H_2 \longrightarrow R^1-H + R^2-H + 2H_2S$
Tiofeno		
Benzotiofeno		
Dibenzotiofeno		

Figura 2.2: Compuestos organosulfurados y su ruta de hidrotatamiento (Babich y Mouljin, 2003).

a la HDS convencional, particularmente aquellas que están basadas en una tecnología nueva que utilicen condiciones de operación más suaves y representan bajos costos de seguridad.

2.3. Desulfuración Oxidativa

La desulfuración oxidativa (ODS por sus siglas en inglés) comprende la remoción de sulfuros como una alternativa al proceso de HDS (Hagun *et al.*, 2002), y tiene la ventaja significativa de que los compuestos sulfurados que son los más difíciles de reducir por HDS son los más reactivos por ODS. Este efecto emerge debido a que la reactividad de oxidación de compuestos sulfurados se incrementa al aumentar la densidad electrónica del átomo de sulfuro, el anillo aromático derivado del DBT influenciado positivamente por los grupos metálicos con la propiedad de donar electrones y aquél que contenga el átomo de azufre más rico en electrones, es el que reaccionará más rápido.

La oxidación de tiofenos a sulfonas incrementa la polaridad y el peso molecular, lo cual hace más fácil su remoción por adsorción en materiales sólidos, como la sílica, alúmina, arcilla o carbón activado o su separación por extracción, destilación o tratamiento alcalino. Para la oxidación selectiva de los compuestos organosulfurados regularmente se usan peroxiacidos orgánicos (fórmico, acético, propiónico, etc.) y ácido peroxisulfúrico, y como catalizadores mezclas de óxidos de molibdeno/tungsteno, ácido tungstofosfórico (TPA) y metil trioxorenio (VII). Sin embargo, la selectividad de la reacción, seguridad y costo son los que definen la selección de oxidantes, catalizadores y condiciones de operación del proceso de ODS.

Los sistemas catalíticos reportados son tóxicos y explosivos y aunque ésta es una tecnología importante, hay todavía asuntos que necesitan ser definidos con respecto a la calidad final del combustible y a la economía del proceso, por lo que existe la necesidad de una nueva tecnología que permita la existencia de las reacciones de oxidación bajo condiciones menos drásticas y que

oxide selectivamente los compuestos sulfurados.

2.4. BIODESULFURACIÓN

Una de las alternativas para remover las moléculas sulfuradas del combustible fósil a bajas temperaturas y presión atmosférica es el uso de catalizadores microbianos, proceso que se conoce como biodesulfuración.

Se ha reportado la remoción selectiva de sulfuro por una ruta que involucra la conversión de dibenzotiofeno (DBT) a 2-hidroxibifenilo (2-HBP) y sulfato, como en el caso de, *Rhodococcus erythropolis* (Wang y Krawiec, 1996) y *Rhodococcus rodochrous IGTS8* (Kilbane y Jackowski, 1992), ésta última ha sido la más estudiada, y se ilustra en la figura 2.3.

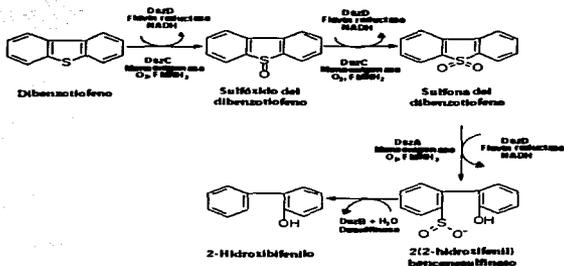


Figura 2.3: Ruta metabólica de la desulfuración del DBT por *Rhodococcus erythropolis IGTS8* (Kilbane y Jackowski, 1992).

La actividad desulfurante de *R. erythropolis* JGTS8 es reprimida por los sulfatos y por aminoácidos que contienen sulfuros. Las primeras dos enzimas de esta ruta, DszA y DszC son monooxigenasas dependientes de FMNH₂, el cual es regenerado por una flavin reductasa dependiente de NADH, la DszD. La necesidad de cofactores y la complejidad de la ruta metabólica requiere el trabajo de la célula completa.

Sin embargo, tres factores principales han limitado la implementación de la desulfuración microbiana del petróleo (Vázquez-Duhalt *et al.*, 2002):

- las grandes cantidades de agua necesarias para el metabolismo microbiano
- el tiempo de residencia largo en el proceso que se realiza en un reactor de volumen considerablemente grande
- el metabolismo microbiano limitado con respecto a la gran variedad de estructuras químicas que se encuentran en los compuestos organosulfurados existentes en el petróleo.

Ninguno de estos problemas se ha resuelto todavía, sin embargo estas limitaciones podrían remediarse usando enzimas purificadas en lugar de microorganismos completos, ya que requieren menos agua que los microorganismos para ser activas y estables en disolventes orgánicos y teóricamente, sólo una película de agua que cubriera su superficie podría ser suficiente para que se lleve a cabo la catálisis (Vázquez-Duhalt *et al.*, 2002). El petróleo por si mismo puede ser el disolvente orgánico, evitando o minimizando la adición un cosolvente.

Los compuestos de sulfuro antes de la HDS son menos reactivos frente al hidrógeno y probablemente más activos frente al oxígeno, lo cual genera una ventaja para la catálisis enzimática sobre la HDS convencional.

2.5. Peroxidasas

El interés en la catálisis oxidativa ha sido estimulado principalmente por dos cuestiones ambientales. La primera es la necesidad de reemplazar las oxidaciones que requieren de cantidades estequiométricas de metales pesados por alternativas catalíticas más "limpias", usando como agente oxidante peróxido de hidrogeno u oxígeno. La segunda es la gran demanda de selectividad en las reacciones químicas de oxidación, con el propósito de oxidar selectivamente el azufre y dejando intacta el resto de la molécula, así como el resto de hidrocarburos presentes en el combustible. Las enzimas óxido-reductoras son potencialmente adecuadas para cumplir con estas condiciones.

Entre estas enzimas se encuentran las peroxidasas, las cuales catalizan las transformaciones oxidativas de substratos orgánicos con un peróxido, usualmente peróxido de hidrogeno. A diferencia de otras enzimas oxidantes, las peroxidasas no tienen requerimiento de un cosubstrato costoso. Por otra parte, la mayor parte de las peroxidasas son enzimas extracelulares relativamente estables que pueden adaptarse a un gran intervalo de substratos en una diversidad de reacciones.

Mecanismo de reacción de las peroxidasas

Las peroxidasas son abundantes en la naturaleza y desempeñan diferentes funciones, por ejemplo: la peroxidasa de rábano blanco (HRP), cataliza la oligomerización de radicales libres y la polimerización de aromáticos ricos en electrones (Akita *et. al.*, 2001), la lignino peroxidasa cataliza la degradación oxidativa de la lignina (Hammel *et. al.*, 1986). Aunque el rol exacto de las haloperoxidasas (peroxidasas que pueden halogenar un substrato orgánico) no son precisamente los halometabolitos, probablemente su participación es importante en el sistema de defensa de los organismos (Van Duerzen *et al.*, 1996).

La mayoría de las peroxidasas contienen el grupo hemo (hierro(III) protoporfirina IX) como

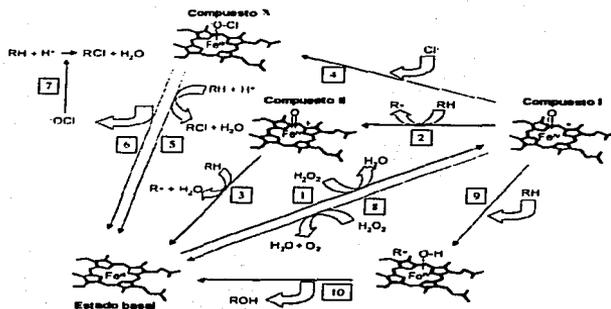
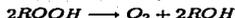


Figura 2.4: Ciclo de reacción de las peroxidasas (Valderrama *et al.*, 2002).

grupo prostético. Durante la catálisis las hemo peroxidasas son oxidadas por un peróxido a una especie oxo hierro (IV) la cual esta predominantemente presente como una especie de radical catiónico porfirínico oxo hierro (IV) en la mayoría de la peroxidasas (fig. 2.4), esta especie es comúnmente llamada compuesto I. El compuesto I puede ser reducido a enzima nativa por diversos mecanismos dependiendo del tipo de reacción (Van Deurzen, *et al.*, 1996), las cuales pueden ser divididas en cuatro categorías:

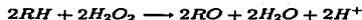
Descomposición de H₂O₂ (catalasa). El ciclo catalítico comienza con la reacción de una molécula de peróxido con el sitio activo (ruta 1). El peróxido se une al hemo y después de una transferencia de protones facilitada por los aminoácidos que rodean al sitio activo, la molécula se rompe para liberar agua y formar un intermediario enzimático conocido como Compuesto I, el cual puede reaccionar con una segunda molécula de peróxido para formar oxígeno molecular y el correspondiente alcohol (en el caso de un peróxido orgánico) o agua (ruta 8), la reacción general

se ilustra como



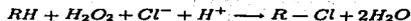
donde R=H en el caso del peróxido de hidrógeno. Alternativamente, el Compuesto I puede tomar otros tres caminos:

1. Deshidrogenación oxidativa (peroxidasa). El Compuesto I puede sufrir una reducción de un electrón para formar el Compuesto II, mediante la oxidación de una molécula de sustrato orgánico (ruta 2). Durante la formación de este intermediario, el electrón transferido desde el sustrato reduce al radical centrado en la porfirina. El Compuesto II, que sólo tiene un equivalente oxidativo que se encuentra localizado en el átomo de hierro, puede catalizar la oxidación de una segunda molécula de sustrato (ruta 3), de esta manera la enzima regresa a su estado basal. La reacción general es:



Las peroxidasas catalizan una variedad de oxidaciones de compuestos aromáticos ricos en electrones, resultando en productos radicales acoplados inter- o intra-molecularmente. Un uso clásico de las reacciones de la peroxidasa es la polimerización de fenoles y anilinas bajo condiciones ligeras (Van Deurzen *et al.*, 1997).

2. Halogenación oxidativa (halogenasa). La halogenación oxidativa se cree que procede vía una especie haluro, en el caso de las hemo-peroxidasas, ilustrando las posibles reacciones con las rutas 4, 5, 6 y 7, debido a que existe la controversia de si la halogenación oxidativa se lleva a cabo dentro o fuera del sitio activo (Stiborová *et al.*, 2000). La reacción general puede expresarse como



3. Reacciones de transferencia de oxígeno (peroxigenasa). Otra alternativa es que el Compuesto I reaccione con una molécula de sustrato unida en el sitio activo, cerca del hierro del grupo hemo. En este caso el átomo de oxígeno se transfiere directamente al sustrato (rutas 9 y 10). La reacción general es



Este tipo de reacciones pueden ser divididas dentro de las siguientes categorías:

- Oxidación de heteroátomos: S-oxidación, N-oxidación
- Epoxidación
- Oxidación de enlaces CH: oxidación benfénico/alílico, oxidación alcohólica, oxidación indólica

Estas reacciones tienen un alto potencial de aplicación en la industria farmacéutica, en la industria alimentaria, en la síntesis de compuestos orgánicos, y muchas otras áreas, incluyendo la biotecnología (Van Deurzen *et al.*, 1997).

Recientemente se describió un proceso enzimático para la desulfuración oxidativa del petróleo (Ayala *et al.*, 1998). Este método está basado en la oxidación de organoazufrados y tiofenos contenidos en el petróleo con hemoproteínas para obtener sulfóxidos y sulfonas, siguiendo con un paso de destilación en el cual estos compuestos oxidados son removidos. El diesel amargo con un contenido de 1.6% de sulfuro se oxidó biocatalíticamente con la cloroperoxidasa de *Caldario-mycetes fumago* en la presencia de 0.25 mM de peróxido de hidrógeno. La reacción se realizó a temperatura ambiente y los compuestos organoazufrados se transformaron de manera efectiva a sus respectivas sulfonas y sulfóxidos, los cuales fueron removidos por destilación. La fracción resultante después de la destilación contenía solo 0.27% de sulfuro (cuadro 2.1). En adición a los

compuestos organoazufrados, la cloroperoxidasa es capaz de reaccionar con otros componentes del combustible, tales como los hidrocarburos poliaromáticos; sin embargo, en las mezclas complejas del petróleo se espera que los compuestos organoazufrados sean preferencialmente oxidados (Ayala *et al.*, 1998 y 2000), dado la facilidad de oxidar el heteroátomo en lugar del enlace C-H de anillo.

	Destilación		Catalisis enzimática + Destilación	
	HTP (%)	Sulfuro (%)	HTP (%)	Sulfuro (%)
Destilado	83	1.27	71	0.27
Residuo	17	3.21	29	5.51

Cuadro 2.1: Contenido de azufre en diesel tras la oxidación catalizada por la Cloroperoxidasa. HTP: Hidrocarburos totales del petróleo

Estos estudios han mostrado que la CPO es una enzima en la cual se puede centrar la investigación para optimizar la oxidación de este tipo de compuestos.

2.6. La Cloroperoxidasa: una peroxidasa con aplicación potencial

Características de la CPO

La CPO, cuyo nombre sistemático es E.C. 1.11.1.10, proviene del hongo marino *Caldariomyces fumago*, aislada por primera vez en 1961 por Hager. Se piensa que la función *in vivo* de esta enzima es la producción del clorometabolito caldaromicina (1,1-dicloro-2,5-dihidroxi ciclopentano).

La secuencia original del ADN indica que el gen completo de la CPO codifica para una proteína de 373 residuos de aminoácidos (Sundaramoorthy *et al.*, 1995), la cual es procesada para madurar. La CPO secretada contiene 299 residuos de aminoácidos debido a dos escisiones, y posteriormente

sufre dos modificaciones: una glicosilación y una ciclización del ácido glutámico N terminal. La CPO se encuentra glicosilada en diferentes grados, por ejemplo, para la isoenzima A la glicosilación alcanza el 19% del peso molecular total, donde la estructura cristalina muestra 14 sitios de glicosilación.

El grupo hemo se encuentra entre los dominios N-terminal y C-terminal, el pliegue comprende ocho segmentos de α -hélice (A-H), tres hélices pequeñas 3_{10} (C', D' y G') y un pequeño par antiparalelo β . La CPO tiene una hélice proximal (hélice A) al grupo hemo y contiene al ligando axial del hemo, y una hélice distal (hélice F) que provee grupos catalíticos requeridos para la activación de peroxidasa. La Cis29 provee el tiolato para ligarse con el grupo hemo y se encuentra en el dominio N terminal, las otras dos cisteínas, Cis79 y Cis87, realizan los puentes disulfuro en la estructura.

El grupo prostético hemo está compuesto por un anillo de porfirina quelato, conformado por un sistema pirrólico macrocíclico con dobles enlaces conjugados y diversos grupos unidos a su alrededor y con enlaces conjugados a un átomo de hierro que se encuentra en el centro. Este grupo hemo se encuentra retenido en su lugar por interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno; a diferencia de otras peroxidases en donde el ligando axial es la histidina, en la CPO es la cisteína, donde el tiolato se presenta como un donador fuerte de electrones (ligadura de alto spin), lo cual explica la actividad catalítica relativamente alta de esta enzima (fig. 2.5), por esta razón muchas de las propiedades espectroscópicas y químicas son similares a la del citocromo P-450.

Aún cuando esta enzima muestra ventajas significativas sobre otras, para considerar el uso de la CPO como catalizador para las reacciones de oxidación en medios orgánicos, se debe considerar (como en cualquier otra catálisis) que la energía de enlace entre la enzima y el sustrato sea la fuerza de unión más importante. En mezclas de reacción acuosas existen principalmente dos fuerzas que están involucradas en el enlace con el sustrato hidrófobo: una induciendo la atracción del com-

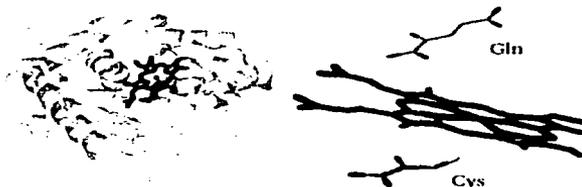


Figura 2.5: Cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*. A la izquierda se muestra en rojo el grupo hemo, a la derecha el grupo hemo con los grupos adyacentes cisteína y glutamina (rojo=O, verde=C, azul=N, amarillo=S, gris=Fe).

puesto al interior del sitio activo y la otra expulsándolo del medio acuoso. En la mayoría de los casos el factor que predomina es la capacidad del sitio activo para atraer al sustrato hidrófobo del medio acuoso (Vázquez-Duhalt *et al.*, 2002).

Por lo anterior, reemplazar el agua con un disolvente orgánico afecta considerablemente la energía de unión entre el sitio activo de la enzima y el sustrato, debido a que éste es desolvatado con más dificultad en un medio orgánico que en un medio acuoso, ya que las interacciones hidrofóbicas son eliminadas en un medio no polar. De este modo, la mayoría de los disolventes hidrófobos debilitan la energía de enlace y en consecuencia la reacción enzimática se hace más lenta, por lo tanto se espera que la selección apropiada del disolvente promueva interacciones desfavorables disolvente-sustrato, y promueva la partición del sustrato hacia el sitio activo de la enzima. Adicionalmente, el disolvente puede afectar la estructura de la enzima (Vázquez-Duhalt *et al.*, 2002), por lo que se ha tenido que recurrir a la búsqueda de herramientas que permitan mantener la estabilidad de las enzimas en condiciones no convencionales. En el cuadro 2.2 se resumen los efectos generales de los disolventes orgánicos en la biocatálisis.

Principales ventajas	Principales desventajas
Alta solubilidad del sustrato hidrofóbico	La actividad enzimática se reduce
Incremento de la regio-, enantio- y estereoespecificidad	Los solventes polares pueden actuar como desnaturalizantes
Reducción de reacciones laterales encontradas en agua	Inactivación en la interfase en sistemas de dos fases
Eliminación de la contaminación microbiana	
Mejoramiento de la termoestabilidad	
Ajuste del equilibrio químico	

Cuadro 2.2: Efectos generales de los disolventes orgánicos en la biocatálisis (Torres, 2000; Blanke *et al.*, 1996, Gupta, 1992).

2.7. Inmovilización de enzimas en materiales mesoporosos

La aplicación de enzimas a escala industrial requiere que éstas se encuentren en un estado inmovilizado que permita su manejo, operación y reciclamiento. Con el propósito de mejorar las propiedades de estabilidad de las enzimas a temperaturas y valores de pH extremos, solventes orgánicos, detergentes, etc., se han desarrollado diversos métodos físicos y/o químicos para conferirles más resistencia a la desnaturalización. Entre los métodos más usados se encuentran la inmovilización por adsorción a soportes, encapsulación con glicolpidos, incorporación en polímeros, modificación con polietilenglicol entre otros (Coombs J., 1992).

En los últimos años, gran parte del estudio de la inmovilización de enzimas se ha enfocado a la utilización de materiales mesoporosos (diámetro de poros de 20 a 500 Å) debido a que sus propiedades, tales como el diámetro de poro (Takahashi *et. al.*, 2000, Yiu *et. al.*, 2001), la capacidad de adsorción (Deere *et. al.*, 2002), el ordenamiento estructural (Blum y Hyde, 1994) e inocuidad (The Merck Index, 2000) han demostrado ser las adecuadas para esta tarea.

Uno de los primeros materiales inorgánicos que se usaron como soportes fueron las zeolitas, conformadas por arreglos regulares de poros y canales con microporos uniformes de diámetros menores a los 20 Å. Estos soportes se han usado principalmente para reconocer, discriminar y organizar moléculas con alta precisión, con variaciones del orden de angstroms (Davis *et. al.*, 1992). Sin embargo, ante la necesidad de contar con un material que pudiera reconocer moléculas de mayor tamaño, se recurrió a la investigación de materiales mesoporosos, que pudieran cubrir estas necesidades.

En 1990 Yanagisawa y colaboradores, reportaron la síntesis de materiales mesoporosos mediante la intercalación de cationes alquiltrimetilamonio, con cadenas de 12, 14, 16 o 18 carbonos, al silicato laminar kanemita. El estudio a través de DRX (difracción de rayos X) de estos materiales

presentó un sólo un pico a ángulos bajos (2° , 2θ), y los picos presentes en el intervalo de $2\theta = 15 - 30^\circ$, indicaron poco ordenamiento con respecto a los poros. Este material se reportó como una estructura tridimensional en escala nanométrica, pero en 1996 es clasificado como mesoporoso por Fukushima e Inagaki, dándole el nombre de FSM (materiales mesoporoso de hoja plegada).

Por otro lado, en 1992 el grupo de investigadores de la Corporación Mobil desarrolló una nueva clase de materiales mesoporosos, llamada, M41S. Este tipo de materiales posee una estructura porosa ordenada a largo alcance, áreas específicas de $700-1000 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ y volumen de poro de aproximadamente 1 ml g^{-1} (Beck et al., 1992).

Para la formación de los materiales mesoporosos es necesaria la presencia de un tensoactivo en solución, que es el agente formador de estructuras micelares. Los tensoactivos contienen un grupo hidrofílico en la cabeza y una cadena hidrofóbica, regularmente con más de diez átomos de carbono, este carácter anfifílico les permite autoensamblarse cuando se encuentran en solución. La interacción entre las moléculas del tensoactivo y un producto químico inorgánico como fuente de sílice (TEOS, TMEOS) puede dar lugar a la formación del sólido mesoporoso. Los componentes inorgánicos (que están cargados negativamente a valores de pH altos) interactúan preferentemente con los grupos amonio de la cabeza de los tensoactivos cargados positivamente y condensan en un sólido formando una estructura continua (fig. 2.6).

El material MCM-41 (Mobil Composition of Matter) es parte de la familia de M41S, el cual presenta un arreglo hexagonal de poros con diámetro de entre 3 y 10 nm. Este material ya se ha usado para la inmovilización de algunas enzimas, tales como la tripsina (Yiu H. *et al.*, 2001), el citocromo c (Deere *et al.*, 2002), la HRP (peroxidasa de rábano blanco) (Takahashi *et al.*, 2001) y en MCM-48 la CPO (Han *et al.*, 2002). Sin embargo, un gran número de enzimas de interés no podrían ser inmovilizadas en el intervalo de poros del MCM-41 debido a que su diámetro excede las medidas alcanzadas de este material, por lo que ha sido necesario buscar más opciones.

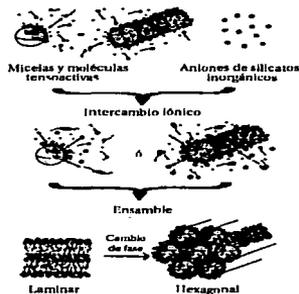


Figura 2.6: Fases micelares.

En 1998(a) Zhao y colaboradores reportaron una nueva familia de estructuras moleculares mesoporosas, la familia SBA (Santa Barbara Amophus), con tamaño de poro considerablemente más grande que el del MCM-41 tradicional y altamente ordenadas (20-300 Å). Estos autores reportaron arreglos periódicos de poros ordenados mesoscópicamente con simetrías cúbicas, hexagonales y laminares, las cuales se obtienen dependiendo del surfactante empleado, por ejemplo, la estructura mesoporosa cúbica SBA-11 ha sido sintetizada en la presencia del surfactante $C_{16}EO_{10}$ (Brij 56), mientras que la estructura mesoporosa hexagonal SBA-12 resulta cuando se usa $C_{18}EO_{10}$ (Brij 76). Los surfactantes con pequeños segmentos de EO (óxido de etileno) tienden a formar mesoestructuras laminares de sílica a temperatura ambiente. Las estructuras mesoporosas hexagonales de sílica con una distancia interplanar de 64-77 Å pueden ser sintetizados a 100°C usando surfactantes oligoméricos no iónicos. Las estructuras mesoporosas hexagonales altamente ordenadas SBA-15 con una distancia interplanar de 104-320 Å han sido sintetizadas en la presencia

del tribloque copolimérico poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno) (PEO-PPO-PEO) y una nueva estructura cúbica de mesoporosos de sílica, el SBA-16, ha sido sintetizada usando el tribloque copolimérico $\text{EO}_{106}\text{PO}_{70}\text{EO}_{106}$ (F127), en donde las longitudes de EO son relativamente grandes. La relación EO/PO de los copolímeros puede ser usada para controlar la formación de la mesofase de sílica: disminuyendo esta relación del tribloque copolimérico se promueve la formación de mesoestructuras laminares de sílica, mientras que a relaciones mayores se favorece la mesoestructura cúbica de sílica. El incremento del tamaño de poro a más de 300 Å hace que estos materiales sean buenos candidatos para la inmovilización de enzimas (Zhao *et al.*, 1998b), algunos ejemplos de enzimas que ya han sido inmovilizadas en SBA son la CPO, (Han *et al.*, 2002), tripsina (Yiu *et al.*, 2001), HPR (Takahashi *et al.*, 2000), entre otros.

Otro material que promete ser buen candidato para actuar como soporte de catalizadores es el MCF (esponja mesocelular) (Schmidt-Winkel *et al.*, 1999). Esta estructura se considera un material tipo SBA-15, y está conformado por células esféricas grandes de tamaño uniforme, interconectadas por ventanas uniformes para formar una sistema de poros tridimensional. El diámetro de las ventanas regularmente es de 1.3 a 3 nm también se ha utilizado para inmovilizar algunas enzimas, entre ellas la CPO (Han *et al.*, 2002).

En los últimos años se ha realizado la inmovilización de enzimas en materiales mesoporosos de sílica, buscando establecer los parámetros que deben considerarse para hacerlo. El diámetro de poro es uno de los parámetros que más ha llamado la atención. En un estudio realizado por Takahashi y colaboradores (2000), se analizó el material FSM-16 con diferentes tamaños de poros (27,51 y 89 Å), en los que se inmovilizó la peroxidasa de rábano blanco (HRP) (diámetro molecular de 48 Å). Se realizaron isotermas de adsorción de nitrógeno y curvas de distribución de poro de los materiales antes y después de inmovilizar la enzima. En los materiales de 51 y 89 Å se encontró una disminución en el volumen de poro una vez inmovilizada la enzima, lo que indica que la enzima ocupa un espacio dentro de los poros. En el material con poro de 27 Å, el volumen se mantuvo



Figura 2.7: Simulaciones moleculares de la peroxidasa de rábano blanco inmovilizada en FSM-16 con varios tamaños de poro (30, 50 y 90 Å).

constante, lo que indicó que la enzima no estaba adsorbida en los poros, sino únicamente en la superficie. Con estos resultados, se propusieron modelos para ilustrar la adsorción de la enzima en el material por medio de simulaciones moleculares (fig. 2.7). En estos estudios se concluyó que una inmovilización proporciona estabilidad térmica y en medios orgánicos (tolueno) cuando el diámetro del mesoporo se aproxima al diámetro molecular de la enzima.

También se han realizado estudios referentes a la interacción entre la enzima y el soporte durante la inmovilización, Deere y colaboradores (2002) estudiaron la inmovilización de varias enzimas en materiales mesoporosos de sílice y concluyeron que es importante la compatibilidad de cargas entre la enzima y el soporte para que la adsorción se lleve a cabo, variando el pH y estudiando el fenómeno de desorción con sulfato de amonio, polietilenglicol y CNS (grupos funcionales ciano). Como conclusión, afirmaron que es necesario conocer el punto isoeléctrico de la enzima y del soporte para establecer el intervalo de pH donde la inmovilización pueda ser óptima.

En cuanto a la estructura del material de soporte, Washmon-Kriel y colaboradores (2000) afirmaron que la uniformidad de los poros permite controlar la adsorción en base al tamaño y que el "recinto" de las proteínas en un espacio bien definido puede ayudar a prevenir su desnaturalización. Estos autores concluyeron que las características de los materiales de soporte son críticas para la adsorción y estabilización de las enzimas, y que la similitud entre el tamaño de poro y la enzima provee una mejor estabilidad. De la misma manera, se ha estudiado el mejoramiento de la estabil-

idad de las enzimas inmovilizadas en materiales mesoporosos con respecto a las enzimas libres o no inmovilizadas. Un ejemplo es la inmovilización de la HRP en FSM-16, MCM-41 y SBA-15, en donde se obtuvo una mayor estabilidad térmica y en disolventes orgánicos (Takahashi *et al.*, 2001).

En resumen, las principales características que son de interés para la inmovilización de enzimas en los materiales mesoporosos se muestran en el cuadro 2.3. Con estos antecedentes, se abre un campo de investigación para determinar la estabilidad de las enzimas inmovilizadas en materiales mesoporosos, enfrentándolas a condiciones extremas y situaciones en la que normalmente la enzima sufre una pérdida de actividad. De ahí que en este trabajo nos enfocamos a estudiar el comportamiento biocatalítico de la cloroperoxidasa inmovilizada en materiales mesoporosos, con el propósito de conocer la potencialidad de la enzima como biocatalizador en la oxidación de compuestos organoazufrados en sistemas no acuosos.

Ventajas	Desventajas
<p data-bbox="203 269 510 317">Estos materiales son química y mecánicamente estables, además de ser resistentes al ataque microbiano</p> <p data-bbox="203 336 510 402">Las enzimas se inmovilizan después de la síntesis del soporte, lo cual evita su exposición a condiciones o agentes severos</p> <p data-bbox="203 421 510 506">El intervalo de diámetro de poro que puede obtenerse es similar al intervalo en donde se encuentran varias proteínas, incluyendo a las proteínas globulares</p> <p data-bbox="203 525 510 625">Es posible modificar sus superficies químicamente con varios grupos funcionales, estableciendo atracción electrostática o repulsión entre un material mesoporoso de sílica y la molécula a inmovilizar</p> <p data-bbox="203 644 306 660">Son inocuos</p> <p data-bbox="203 679 417 695">Volumen de poro grande</p> <p data-bbox="203 715 507 745">Alto ordenamiento de la estructura porosa</p>	<p data-bbox="531 269 839 317">El área superficial disminuye rápidamente con el incremento de tamaño de poro</p> <p data-bbox="531 336 839 384">La principal desventaja de usar estos materiales es su costo (sólo de surfactantes catiónicos)</p> <p data-bbox="531 421 839 490">Existe la posibilidad de que el material pueda adsorber otros compuestos que no se desean, como los sustratos de las enzimas</p>

Cuadro 2.3: Ventajas y desventajas del uso de materiales mesoporosos para la inmovilización de enzimas.

Capítulo 3

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar y comparar el comportamiento biocatalítico de la CPO libre e inmovilizada en materiales mesoporosos para la oxidación del 4,6 DM DBT en un medio de reacción con disolventes orgánicos.

Objetivos particulares

- Obtener materiales mesoporosos altamente ordenados, con tamaño de poro menor, igual y mayor al diámetro molecular de la CPO
- Inmovilizar a la CPO en materiales mesoporosos con diferentes diámetros de poro
- Determinar la actividad catalítica hacia el 4,6 DM DBT de la CPO inmovilizada y libre
- Obtener y comparar el perfil catalítico de la CPO libre e inmovilizada en un intervalo de temperaturas y concentraciones de disolvente en el medio de reacción
- Determinar el perfil de estabilidad de la CPO libre e inmovilizada a la temperatura

Capítulo 4

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

El HCl, etanol y citrato de sodio se obtuvieron de J.T. Baker. El hidróxido de amonio y H_2O_2 fueron proveídos por Fermont. El 4,6 DMDBT y KCl se adquirieron de Aldrich Chemical Company. El ACN grado HPLC se adquirió de Burdick & Jackson. El tetraetil ortosilicato (TEOS, $Si(OC_2H_5)_4$) y el Pluronic F127 se obtuvieron de Sigma-Aldrich, mientras que el surfactante L64 fue proporcionado por Polioles.

Material Biológico

La cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* fue proporcionada por el Dr. Michael A. Pickard de la Universidad de Alberta, Canadá, con grado de pureza $R_z = 1,2$.

Instrumentos analíticos

Espectrómetro: Thermo Spectronic Helios α , lámparas de tungsteno (VIS) y deuterio (UV), monocromador por 12000 líneas/mm, rango de longitud de onda 190-1100 nm, ancho de banda de 2 nm.

Cromatógrafo para Líquidos de Alta Resolución (HPLC): Hewlett Packard 1100, columna de fase reversa SUPELCOSIL $\text{\textcircled{O}}$, LC-18-DB, 15 cm x 4.6 mm, tamaño de partícula de 3 μm . Detector de arreglo de diodos, controlador de temperatura e inyector automático.

Métodos

A. Síntesis de materiales mesoporosos

Se disolvieron 4 g de surfactante en 30 ml de agua destilada y se disolvió completamente, se agregaron 120 ml de HCl 2M y se agitó hasta obtener una solución homogénea. Posteriormente se agregó bajo agitación y gota a gota 8.5 g de tetraetil-ortosilicato (TEOS) durante 5 min. La solución se añejó a distintos tiempos a 35°C. El material obtenido se filtró y se lavó dos veces de forma alternada con 15 ml de etanol y 15 ml de agua destilada.

Tratamiento alcohólico. Posteriormente se realizó un tratamiento alcohólico en donde se disolvió 1 g del surfactante correspondiente en 100 ml de agua destilada, se agregaron 40 ml de etanol y 0.1 ml de hidróxido de amonio 5 N y se agitó por 5 minutos. Se agregó 1 g del material sólido obtenido en el paso anterior y se agitó a temperatura ambiente por 1.5 horas a 100°C por diferentes tiempos. El material obtenido se filtró y se lavó dos veces con agua destilada.

Calcinado. El material obtenido con la metodología anterior se calcinó bajo flujo de aire con una velocidad de calentamiento de $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$, se mantuvo a 350°C por 30 minutos y posteriormente se llevó a 550°C a la misma velocidad y se mantuvo a esta temperatura por 4 horas.

Análisis microscópico. Los materiales obtenidos se analizaron por microscopía electrónica de transmisión (MET) en un equipo JEOL 100cx, microscopía electrónica de barrido (MEB) en los laboratorios centrales del IMP con un equipo marca Phillips, así como por el método BET (adsorción de nitrógeno), análisis realizados en el Laboratorio de Propiedades Texturales del Departamento de Ingeniería Molecular del IMP, con un equipo MICROMIMETICS.

B. Inmovilización de la CPO

Se suspendió 1 g de soporte en 10 ml de amortiguador de citratos pH 4, se atemperó a 25°C y se le agregaron $0.2635\ \mu\text{moles}$ de CPO. La suspensión se agitó a 100 rpm durante 3 horas.

El material se filtró y lavó con 150 ml de amortiguador de citratos pH 4, cuantificando la enzima no inmovilizada a 403 nm. La cantidad de enzima inmovilizada se determinó por la diferencia entre la cantidad de enzima inicial y la cantidad de enzima no inmovilizada.

C. Cuantificación de CPO soluble

La cloroperoxidasa se cuantificó mediante espectrofotometría, en donde el coeficiente de extinción molar a 403 nm es $75.3\ \text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Ayala, 2002).

D. Actividad catalítica de la CPO

Primero se determinó el pH óptimo de la reacción para la oxidación del 4,6 DM DBT 20 μM , en amortiguador 60 mM, 25°C, 20 mM de KCl, H₂O₂ 1 mM y 20% ACN. Para valores de pH de 3, 3.5, 4, 4.5 y 5 se empleó amortiguador de citratos, mientras que para los valores de pH de 5.5, 6, 6.5 y 7 se empleó amortiguador de fosfatos. Las reacciones se detuvieron a los dos minutos desactivando a la enzima con un exceso de ACN (1 volumen de ACN por 1 volumen de medio de reacción). A la par de cada reacción se elaboró un control, al cual no se le adicionó la enzima.

La actividad catalítica de la CPO se determinó en amortiguador de citratos pH 4, conteniendo KCl 20 mM, 4,6 DMDBT 20 μM , H₂O₂ 1 mM y ACN a diferentes concentraciones y temperaturas. Las reacciones se detuvieron a los dos minutos desactivando a la enzima con un exceso de ACN (1 volumen de ACN por 1 volumen de medio de reacción). A la par de cada reacción se elaboró un control, al cual no se le adicionó la enzima. La cuantificación de la velocidad de reacción se determinó por la disminución de la concentración de 4,6 DMDBT por HPLC. El monitoreo se realizó a 240 nm, eluyendo con una fase 80/20 de ACN/agua, con un flujo de 1.2 ml/min.

Para determinar el perfil enzimático con respecto al disolvente, se determinaron actividades catalíticas con 20, 30, 40, 50 y 60% de ACN en el medio de reacción. Para determinar el perfil enzimático con respecto a la temperatura se aplicaron temperaturas de reacción de 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60°C, utilizando la metodología explicada anteriormente.

Para la determinación de actividad catalítica de la enzima libre, se usaron 3.04×10^{-5} μmoles de CPO, con un volumen de reacción de 1 ml y para la CPO inmovilizada, se usaron 5 μg de material con enzima inmovilizada, con un volumen final de reacción de 10 ml.

E.Estabilidad de la CPO libre e inmovilizada a 45°C

Se incubó la enzima libre o inmovilizada a 45°C en amortiguador de citratos 60 mM, pH 4, tomando muestras a diferentes tiempos y realizando reacciones de oxidación del 4,6 DM DBT a 25°C, por 2 minutos. Las reacciones se detuvieron por inactivación de la CPO con adición de 1 volumen de ACN por 1 volumen de reacción (concentración final de ACN de 60 %). A la par de cada reacción se elaboró un control, al cual no se le adicionó la enzima. El sustrato remanente se monitoreó a 240 nm por HPLC bajo las condiciones ya citadas.

Capítulo 5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Síntesis de materiales mesoporosos

Los materiales se sintetizaron a partir de dos surfactantes, L64 ($\text{EO}_{13}\text{PO}_{70}\text{EO}_{13}$) y F127 ($\text{EO}_{106}\text{PO}_{70}\text{EO}_{106}$), siguiendo la misma metodología para ambos en donde el tiempo de añejamiento se empleó para variar la distribución del diámetro de los poros. En los siguientes párrafos se usará la nomenclatura que se describe en la figura 5.1. ,



Figura 5.1: Nomenclatura de los materiales sintetizados con L64 y F127.

Materiales sintetizados con el surfactante L64

El efecto del tiempo de añejamiento a 80°C sobre el diámetro de poro y la distribución de diámetro de poro se ilustra en la figura 5.3, donde puede apreciarse como el diámetro de poro aumenta con el tiempo.

El material L64-1 presenta microporos de 17.8 a 18.3 Å y mesoporos de 36.9 Å, y una isoterma con características cercanas a la isoterma tipo I (ver la figura A.2 del apéndice), la cual es representativa de los materiales microporosos (Gregg y Sing, 1997). Aunque los materiales L64-2 con poros de 21.1 Å y L64-3 con poros de 26.4 Å, pueden clasificarse como mesoporosos, sus isotermas, tal como se ilustran en la figura 5.1, se aproximan a las características de la isoterma tipo I debido a que sus diámetros de poro se encuentran próximos a los 20 Å, límite en el cual se diferencian los mesoporos de los microporos. El material L64-0, sin añejamiento a 80°C, presenta microporos de 17 Å y muestra, por tanto, una isoterma tipo I.

De acuerdo a Zhao y colaboradores (1998a), generalmente se obtienen isotermas tipo IV para los materiales SBA-15, en donde se incluyen los materiales sintetizados con L64; sin embargo, Bennadja y colaboradores (2001) encontraron que los materiales sintetizados con el surfactante L64 tienen un ordenamiento estructural mucho menor al de algunos materiales sintetizados con surfactantes de mayor peso molecular, lo que puede estar contribuyendo a la formación de isotermas tipo I.

Comparando las muestras L64-1, L64-2 y L64-3 con la muestra L64-0, se observa que el tiempo de añejamiento a 80°C produce poros que van de 17 a 50 Å, tal como se aprecia en la figura 5.3. La distribución de diámetro de poro promedio del material L64-1 tiene un comportamiento bimodal, en donde el primer pico está formado a su vez por cuatro picos

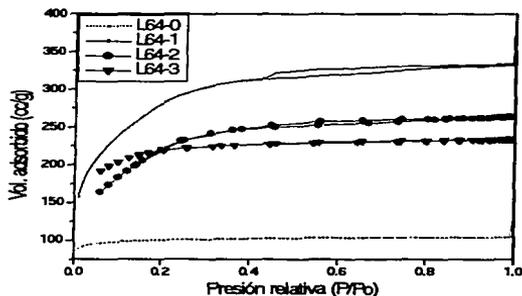


Figura 5.2: Isotermas de adsorción-desorción de los materiales sintetizados con L64.

pequeños, encontrados a 17.8, 19.7, 21.1 y 22.5 Å; el segundo pico tiene un máximo a 36.9 Å. Para el material L64-2 no es posible observar, con el método empleado, el ascenso del pico que muestra un máximo a 21.1 Å, aunque los puntos que se logran ver aducen que la distribución de diámetro de poros es relativamente grande. El material L64-3 es el que presenta mayor uniformidad de diámetro de poro, ya que la tendencia es unimodal y el intervalo de distribución es más estrecho, con un máximo a 26.4 Å. Aunque los diámetros de los poros predominantes de cada material no difieren mucho unos de otros, se observa una tendencia ascendente al incrementarse el tiempo de añejamiento a 80°C (cuadro 5.1), comportamiento que ya ha sido reportado por Zhao y colaboradores (1998a), donde concluyen que al aumentar el tiempo de añejamiento a 80°C de materiales sintetizados con el surfactante P123 (EO₂₀PO₇₀EO₂₀), el diámetro de los poros aumenta.

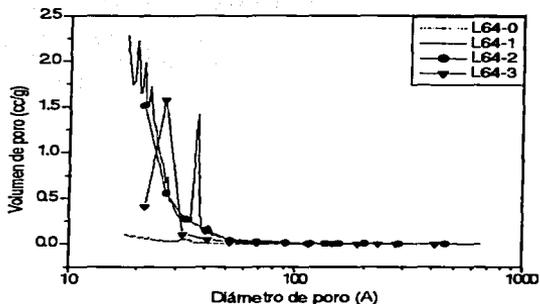


Figura 5.3: Distribución de diámetro de poro de los materiales sintetizados con L64.

El tiempo de añejamiento a 80°C también afectó el área específica de los materiales L64-1, L64-2 y L64-3, con valores de 919.9, 810.4 y 757.9 m²/g respectivamente. El área específica menor la presentó el material que no se añejó a 80°C, L64-0, con un valor de 398.1 m²/g; esta gran diferencia radica en la mayor formación de poros cuando se somete al añejamiento a 80°C. Sin embargo, al comparar las muestras L64-1, L64-2 y L64-3, se observa una disminución del área específica al aumentar el diámetro de poro. Un resumen de las propiedades texturales se presentan en el cuadro 5.1.

Clave	Añejamiento 80°C (días)	Diámetro poros pre- dominantes (Å)	Area específica BET (m ² /g)
L64-0	0	17.1	398.1
L64-1	1	17.8, 19.7, 21.1, 22.5, 36.9	919.9
L64-2	2	21.1	810.4
L64-3	3	26.4	757.9

Cuadro 5.1: Características texturales de los materiales sintetizados con L64.

Materiales sintetizados con el surfactante F127

En las síntesis realizadas con el surfactante F127 también se estudió el efecto del tiempo de añejamiento a 80°C en donde nuevamente el diámetro de los poros aumenta con el tiempo.

La distribución de poros de los materiales F127-0 y F127-1 es unimodal y llegan a sobrepone gráficamente, por lo que puede inferirse que el añejamiento a 80°C no tiene un efecto significativo sobre el material cuando el tratamiento es de un día (figura 5.4). Sin embargo, la mayor amplitud del pico del material F127-1 da la impresión de que en este tiempo se comienzan a formar poros más grandes, aunque no de forma predominante. A diferencia de éstos, los materiales F127-2 y F127-3 muestran una distribución de poros bimodal, en donde los diámetros de poro predominantes se encuentran en 32.6 y 51.6 Å para F127-2 y 34.6 y 70 Å para F127-3; los primeros picos de ambos materiales tienen una intensidad muy próxima a la de los materiales F127-0 y F127-1, por lo que la presencia de un segundo pico de intensidad similar indica que al segundo y tercer día de añejamiento, se forman poros en un área adicional del material. De dos a tres días de añejamiento, materiales F127-2 y F127-3 respectivamente, se puede observar un desplazamiento del segundo pico hacia un diámetro de poros mayor, de 51.2 a 70 Å, lo que indica que el tiempo de añejamiento puede estar

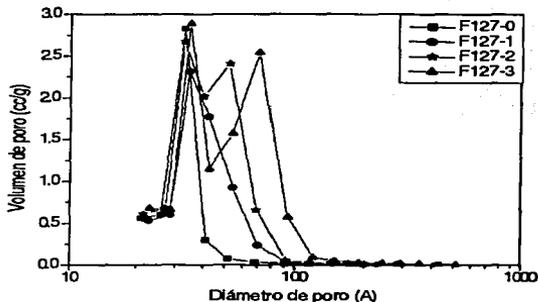


Figura 5.4: Distribución de tamaño de poro de los materiales sintetizados con F127.

relacionado con un incremento en la magnitud de los poros, comportamiento que ya ha sido descrito por Zhao y colaboradores (1998a).

En lo que respecta al área específica, ésta disminuye para el material F127-1 con respecto F127-0, con valores de 629.7 y 781.6 m^2/g respectivamente, lo que en parte puede deberse al aumento del diámetro de poro. El área específica de los materiales F127-2 y F127-3, de 875.6 y 928.3 m^2/g respectivamente, aumenta con respecto a los materiales anteriores debido a que hay una mayor formación de poros, reflejada en la presencia del segundo pico de la distribución bimodal. Los resultados se resumen en el cuadro 5.2.

A diferencia de los materiales sintetizados con L64, las isotermas de los materiales sintetizados con F127 presentan histéresis. Las histéresis de las muestras F127-0 y F127-1 presentan perfiles e histéresis similares, las correspondientes a los materiales F127-2 y F127-3 presentan

Clave	Añejamiento a 80°C (días)	Diámetros de poros predominantes (Å)	Area específica BET (m ² /g)
F127-0	0	32.6	781.6
F127-1	1	34.3	629.7
F127-2	2	32.6, 51.6	875.6
F127-3	3	34.6, 70.0	928.3

Cuadro 5.2: Características texturales de los materiales sintetizados con F127.

una doble histéresis, la cual indica la existencia de dos diámetros de poros predominantes en cada material. Estas isotermas, ilustradas en la figura 5.5, no son lo suficientemente claras como para clasificarlas de acuerdo a BET; sin embargo, debido a la existencia simultánea de histéresis y del punto B (véase la figura A.2 del apéndice) existe una aproximación a la isoterma tipo IV que es característica de los mesoporosos.

Las características de las isotermas de los materiales F127-0 y F127-1 son similares a las reportadas por Yamada y colaboradores (2002), en donde sintetizan un material a partir del surfactante F127 (SBA-16). Esta isoterma, típica del material SBA-16, la comparan con la isoterma del material SBA-15, la cual tiene una histéresis más ancha en el eje y de la gráfica, y a la cual tienen más parecido las isotermas de los materiales F127-2 y F127-3. Este holgamiento de las histéresis en el eje y de la gráfica indica mayor presencia de poros y una distribución de diámetros de poro más estrecha, por lo que el añejamiento de dos y tres días en los materiales puede estar induciendo la formación de poros de tamaño más homogéneo, aunque de forma bimodal.

A razón de que el tiempo de añejamiento a 80°C presenta un mayor efecto en los materiales sintetizados con el surfactante F127 que los materiales sintetizados con el surfactante L64 y a

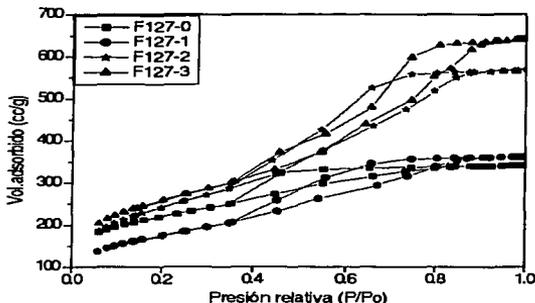


Figura 5.5: Isotermas de adsorción-desorción de los materiales sintetizados con F127.

que presentan mayor uniformidad de poro, se decidió concentrar el trabajo en la modificación de los silicatos sintetizados con F127, los llamados SBA-16.

5.2. Síntesis de SBA-16

Con el fin de obtener poros más grandes y más uniformes, se adicionó un tratamiento autocotérmico antes del calcinado de los materiales (Sun *et al.*, 2001), tratamiento mediante el cual las estructuras preformadas se colapsan y reordenan, dando lugar a materiales más homogéneos y con diámetros de poro más grande. Como material base para aplicar este tratamiento, se usó el material F127-1 debido a que presenta mayor posibilidad de aumentar el diámetro de poro de acuerdo al perfil mostrado en la figura 5.4. De aquí en adelante, la nomenclatura que se usará se describe en la figura 5.6.

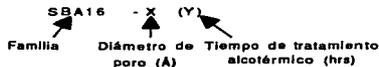


Figura 5.6: Nomenclatura de los materiales SBA16.

El procedimiento se inició sometiendo a un tratamiento alcotérmico al material F127-1, que en lo sucesivo se nombrará SBA16-34.4 (0), a tiempos de 24, 36 y 48 horas, en donde se observa que la magnitud del diámetro de los poros aumenta significativamente con respecto a la muestra sin tratamiento, las muestras son SBA16-149 (24), SBA16-193 (36) y SBA16-149 (48). Por otro lado, el área específica de los materiales con tratamiento alcotérmico disminuyó notablemente debido al aumento en el diámetro de los poros con áreas específicas de 426.6, 290.8 y 353.2 m²/g para los materiales SBA16-149 (24), SBA16-193 (36) y SBA16-149 (48), respectivamente, con respecto al material SBA16-34 (0) con área específica de 629.7 m²/g.

Las isotermas de adsorción de los materiales SBA16-149 (24), SBA16-193 (36) y SBA16-149 (48), presentan mayor pendiente con respecto a la muestra SBA16-34 (0) y sus perfiles se aproximan notablemente a la isoterma tipo IV, la cual es característica de los materiales mesoporosos (véase la figura A.2 del apéndice). El perfil de la isoterma de SBA16-34 (0) es característica del material SBA-16, reportada por Yamada y colaboradores (2002), en donde el ancho de la histéresis en el eje y de la gráfica es angosto; por otro lado, las isotermas de los materiales SBA16-149 (24), SBA16-193 (36) y SBA16-149 (48) presentan histéresis más anchas en el eje y de la gráfica, aproximándose más a las características de la isoterma tipo del material SBA-15, reportada por estos mismos autores. En este caso, el tratamiento alcotérmico aplicado a estos materiales da lugar a una mayor formación de poros que se relaciona a la intensidad del volumen de poro (fig. 5.7) y al volumen adsorbido de sus correspondientes

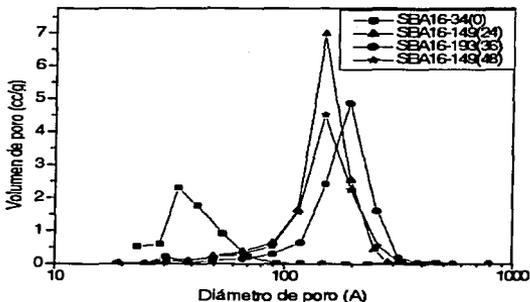


Figura 5.7: Distribución de tamaño de poro de SBA16-34 (0), SBA16-149 (24), SBA16-193 (36), SBA16-149 (48).

isotermas (fig. 5.8).

Aunque se obtuvieron materiales con diámetros de poro más grande al aplicar el tratamiento alcotérmico, existía la necesidad de obtener materiales con diámetro de poro de tamaño similar al de la enzima (80 Å) para poder llevar a cabo la inmovilización, por lo que los intervalos del tiempo de añejamiento alcotérmico se fueron reduciendo. Aunque la relación entre el tiempo de añejamiento y el diámetro de poro no es clara, se puede observar que a mayores tiempos de añejamiento, mayor diámetro de poro, por lo que se realizaron diferentes experimentos con tratamientos alcotérmicos de 2, 4, 6, 7, 8, 9 y 12 horas.

Las isotermas de adsorción de los materiales SBA16-32 (2), SBA16-41 (4), SBA16-32 (6) son muy parecidas a la del material SBA16-34 (0), y se clasifican como de como tipo IV (véase la

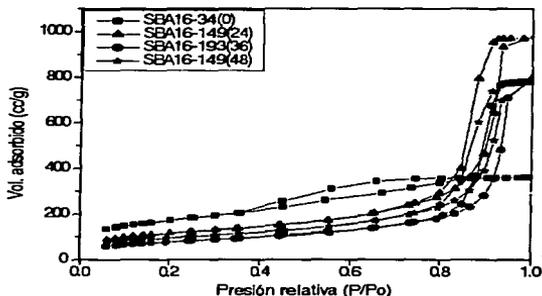


Figura 5.8: Isotermas de adsorción-desorción de SBA16-34 (0), SBA16-149 (24), SBA16-193 (36) y SBA16-149 (48).

figura A.2 del apéndice), ilustradas en figura 5.9. La gran aproximación entre estas isotermas expresa que el efecto del tratamiento alcotérmico a los tiempos señalados, no es significativo. El tratamiento alcotérmico no tuvo un efecto considerable sobre la magnitud del diámetro de los poros para los materiales SBA16-32 (2), SBA16-41 (4), SBA16-32 (6), con respecto al material SBA16-34 (0). La distribución de tamaños de poro es muy similar entre estos materiales, tal como se observa en la figura 5.10

Aunque el tratamiento alcotérmico no manifestó un efecto considerable sobre el diámetro de los poros, sí se observa de forma más clara sobre las áreas específicas de los materiales SBA16-32 (2), SBA16-41 (4) y SBA16-32 (6), con valores de 776.8, 926.9 y 649.5 m²/g, respectivamente, los cuales son mayores con respecto al área específica del material SBA16-34 (0) con valor de 629.7 m²/g.

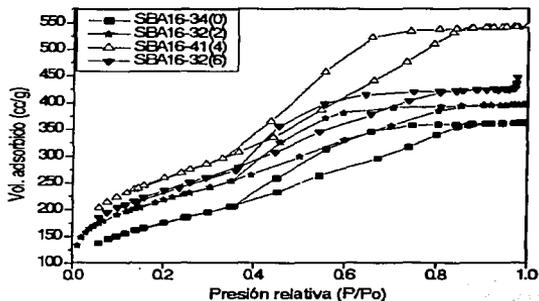


Figura 5.9: Isotermas de adsorción-desorción de SBA16-34 (0), SBA16-32 (2), SBA16-41 (4) y SBA16-32 (6).

Los materiales SBA16-91 (7) a SBA16-117 (12) muestran isotermas tipo IV (figura 5.11). Las isotermas de los materiales SBA16-91 (7) y SBA16-89 (8) se sobreponen gráficamente; por su parte, a una presión relativa más alta, las isotermas de los materiales SBA16-116 (9) y SBA16-117 (12) se sobreponen gráficamente. Estas cuatro isotermas pueden clasificarse como tipo IV que, como ya se mencionó, son características de los materiales mesoporosos (véase la figura A.2 del apéndice). A los tiempos señalados para los cuatro materiales mencionados, existe un efecto notable del tratamiento alcotérmico en donde la formación de poros se presentan con mayor intensidad, lo cual se refleja en la amplitud de sus correspondientes histeresis en el eje y de la gráfica, comparadas con la correspondiente al material sin tratamiento alcotérmico, SBA16-34 (0).

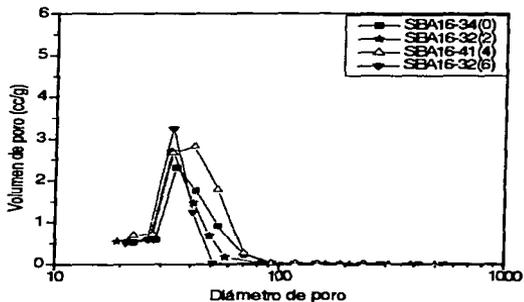


Figura 5.10: Distribución de diámetro de poro de SBA16-34 (0), SBA16-32 (2), SBA16-41 (4) y SBA16-32 (6).

La intensidad de los picos de las gráficas de distribución de poros de los materiales, SBA16-91 (7), SBA16-89 (8), SBA16-116 (9) y SBA16-117 (12) es mayor que la del material SBA16-34 (0), lo que representa una mayor formación de poros en el intervalo de la distribución de poros en la figura 5.12. En este caso, las áreas específicas con valores de 545.2, 549.6, 427.0 y 502.4 m^2/g , para los materiales SBA16-91 (7), SBA16-89 (8), SBA16-116 (9) y SBA16-117 (12), respectivamente, son menores al área específica del material SBA16-34 (0), debido a que el tamaño de los poros aumenta considerablemente. En el cuadro 5.3 se resumen los resultados cuantitativos de todos los materiales con los diferentes tiempos de tratamiento alcotérmico.

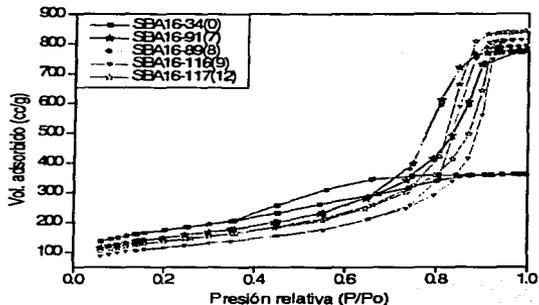


Figura 5.11: Isotermas de adsorción-desorción de SBA16-34 (0), SBA16-91 (7), SBA16-89 (8), SBA16-116 (9) y SBA16-117 (12).

Clave	Diámetros de poros predominantes (Å)	Área específica BET (m ² /g)
SBA16-34 (0)	34.3	629.7
SBA16-32 (2)	32.7	776.8
SBA16-41 (4)	41.2	926.9
SBA16-32 (6)	32.7	649.5
SBA16-91 (7)	91.0	545.2
SBA16-89 (8)	89.5	549.6
SBA16-116 (9)	116.7	427.0
SBA16-117 (12)	117.3	502.4
SBA16-149 (24)	149.3	426.6
SBA16-193 (36)	193.0	290.8
SBA16-149 (48)	149.5	353.2

Cuadro 5.3: Características texturales de los materiales SBA16

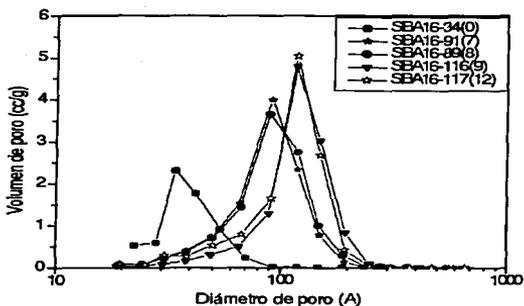


Figura 5.12: Distribución de diámetro de poro de SBA16-34 (0), SBA16-91 (7), SBA16-89 (8), SBA16-116 (9) y SBA16-117 (12).

Como puede observarse en la tabla anterior, la magnitud del diámetro de los poros está relacionado con el tratamiento alcohólico, en donde a mayor tiempo de tratamiento se obtiene un diámetro de poro mayor, comportamiento que fue reportado por Sun y colaboradores (2001), en donde sintetizaron SBA-15 a partir del surfactante P123 y observaron un aumento del diámetro de los poros al aplicar un tratamiento alcohólico a 100°C, pasando de 44 a 73 Å. Los resultados aquí obtenidos confirman la relación entre el tiempo de tratamiento alcohólico y el diámetro de poros. Estos autores dan tres posibles explicaciones de la expansión de los poros: primera, el alcohol puede penetrar a la región hidrofóbica de las micelas incrementando así el volumen de esta fracción; segundo, la hidrólisis-condensación de las paredes de los poros en presencia de alcohol puede expandir el tamaño de los poros y tercero, una capa de alcohol se puede estar formando entre la micela y la pared de silica del poro.

Con la variedad de diámetros de poro obtenidos, se procedió a seleccionar aquellos que se parecieran a las características más importantes para la inmovilización enzimática, esto es, el diámetro y la uniformidad de poro. Considerando que el diámetro mayor de la enzima a inmovilizar es de 80 Å, se seleccionaron materiales con diámetros de poro menor, mayor e igual a 80 Å, es decir, de 41.2, 91.0 y 117.3 Å correspondientes a los materiales SBA16-41 (4), SBA16-91 (7) y SBA16-117 (12), respectivamente.

Para conocer un poco más sobre las características de los materiales, se realizó una microscopía electrónica de barrido de algunos materiales a una resolución de 10000x, ilustrada en la figura 5.13 en la que se pueden observar partículas esféricas y algunas zonas rugosas. También se realizó la microscopía electrónica de transmisión (MET) de estos materiales, pero no fue posible discernir el ordenamiento poroso; un ejemplo de éstas se muestra en la figura 5.14. Cho y colaboradores (2001) han reportado que el material SBA-16 tiene un ordenamiento cúbico periódico. En este trabajo no fue posible determinar el arreglo de los materiales sintetizados debido a que no se tuvo acceso a un equipo de difracción de rayos X con resolución suficiente.



Figura 5.13: Microscopía electrónica de barrido del material SBA-16.



Figura 5.14: Microscopía electrónica de transmisión del material SBA-16.

5.3. Determinación del pH óptimo de reacción y de inmovilización

Como parte inicial del trabajo se evaluó el perfil catalítico de la CPO para la oxidación del 4,6 DM DBT en un intervalo de pH de 3 a 7, con el propósito de establecer el pH óptimo para las reacciones subsiguientes así como para la inmovilización de la CPO.

Se ha reportado en la literatura que hasta el 70% del azufre en el petróleo se encuentra como dibenzotiofeno (DBT) y derivados alquil sustituidos (Monticello y Finnerty, 1985), aquellos derivados en los cuales el átomo de azufre se encuentra impedido estéricamente por sustituyentes en las posiciones 4 y 6 son los más difíciles de remover por los tratamientos fisicoquímicos convencionales (HDS) actualmente usados en las refinerías (Gregg *et al.*, 1997), razón por la cual se eligió al 4,6 DM DBT como sustrato modelo de las reacciones enzimáticas de este trabajo. En esta determinación se empleó una concentración de 20% de ACN, a la cual la enzima libre presenta la máxima actividad catalítica (Zúñiga, 2002). Todas las reacciones catalíticas se llevaron a cabo en presencia de KCl 20 mM y H₂O₂ 1 mM, con dos minutos de reacción; el sustrato remanente y la sulfona formada se monitorearon por HPLC (Zúñiga, 2002).

Como se puede observar en la figura 5.15, el perfil catalítico presenta una forma de campana, que es la más comúnmente observada entre las enzimas libres en medios acuosos. La máxima actividad catalítica para la oxidación del 4,6 DM DBT se encuentra a pH 4 con un valor de 117 min⁻¹; la actividad específica en el rango de pH de 5 a 6 disminuye a un porcentaje de 20 y 11% respectivamente; mientras que a partir de pH 6 la enzima se inactiva. La inactivación por pH ya ha sido reportada para esta enzima a partir de pH 6.5 (Blank *et al.*, 1996).

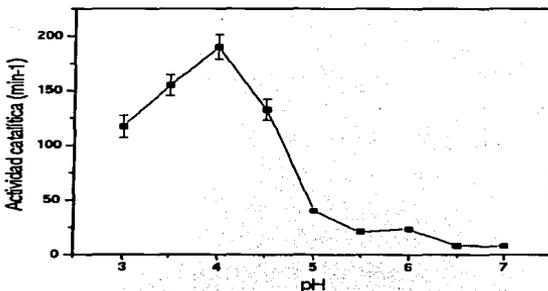


Figura 5.15: Perfil catalítico de la CPO con respecto al pH.

Dado el resultado anterior se eligió el pH de 4 para la inmovilización de la enzima y reacciones subsiguientes, este valor ha sido reportado como el pH de máxima estabilidad de la CPO para su almacenamiento (Ayala, 2002).

5.4. Inmovilización de la CPO

La inmovilización de la CPO en los materiales SBA16-41(4), SBA16-91(7), SBA16-117(12) y MCM41-40 se llevó a cabo bajo las mismas condiciones. La cantidad de enzima inmovilizada varió de acuerdo al soporte: el material SBA16-41(4) no retuvo una cantidad detectable de enzima, el material SBA16-91(7) inmovilizó 99.3 nmoles de CPO por gramo de soporte, correspondiente al 66.7% de la enzima total agregada, el material SBA16-117(12) inmovilizó 190.0 nmoles de CPO por gramo de soporte, correspondiente al 91.5% mientras que 245.5 nmoles de CPO fueron inmovilizados en el material MCM41-40, el cual corresponde

al 99.7% de retención (cuadro 5.4). Debido a que el diámetro de la enzima es de 80 Å se espera que ésta no sea encapsulada en poros de menor magnitud de acuerdo a los modelos planteados por Takahashi y colaboradores (2001) para explicar la inmovilización de la HRP en el material FSM-16, ilustrado en la figura 2.7.

De los materiales de soporte hay dos con diámetros de poro prácticamente iguales, el SBA16-41(4) y el MCM41-40, con diámetros de 41.2 y 40.0 Å, respectivamente. No obstante a la similitud del tamaño de poro, la fijación de la enzima no es la misma para los dos materiales: el MCM41-40 retuvo 99.7% y el SBA16-40(4) no retuvo alguna cantidad detectable. La diferencia más significativa entre estos dos materiales está dada por la presencia de aluminio en el material MCM41-40 (fig 5.16), por lo que puede inferirse que los sitios ácidos de Lewis formados por la presencia del metal (Huheey, 1997), favorecen la interacción electrostática entre el material y la enzima, por lo que ésta puede ser retenida; cabe aclarar que dado el tamaño de poro, la enzima está unida superficialmente al material. Al pH de inmovilización y de acuerdo con el pK_a de los aminoácidos que se encuentran en la superficie de la estructura de la enzima, aquellos que podrían estar interactuando con los sitios ácidos son: el ácido aspártico en las posiciones 11, 24, 44, 86, 89, 123, 126, 131, 140, 149, 152, 168, 193, 198, 200, 208, 291, 298, así como el ácido glutámico en las posiciones 1, 51, 69, 80, 133, 166, 175, 201, 233, 235, 266, los cuales tienen un pK_a del grupo radical de 3.86 y 4.25, respectivamente.

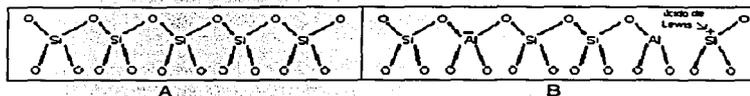


Figura 5.16: Estructura de (A) los silicatos y (B) los aluminosilicatos (Huheey, 1997).

Clave	Diámetros de poros predominantes (Å)	Area específica BET (m ² /g)	% Enzima inmovilizada	nmol CPO / g soporte
SBA16-40(4)	41.2	926.9	0.0	0.0
SBA16-90(7)	91.0	545.2	66.7	99.3
SBA16-117(12)	117.3	502.4	91.5	190.0
MCM-41-40	40.0	1150.0	99.7	245.5

Cuadro 5.4: Principales características de los biocatalizadores soportados.

Debido a que el MCM41-40 y SBA16-41(4) tienen un diámetro de poro similar y a que solo el MCM41-40 fue capaz de retener a la enzima, se puede descartar una interacción electrostática importante entre los materiales SBA16 y la enzima bajo las condiciones empleadas.

Los materiales SBA16-91(7) y SBA16-117(12) con diámetro de poro 91.0 y 117.3 Å, respectivamente, presentaron un 66.7 y 91.5% de retención de la enzima total agregada. La mayor inmovilización en el material SBA16-117(12) con respecto al SBA16-91(7) puede estar favorecida por la mayor magnitud de los poros, ya que la enzima cuenta con diámetros moleculares de 40 y 60 Å, además del diámetro mayor de 80 Å. La cuantificación de la enzima retenida por gramo de soporte y las características texturales de los soportes se resumen en el cuadro 5.4.

Los resultados muestran que el diámetro de poro de los materiales SBA16 está relacionado con la cantidad de enzima inmovilizada, probablemente debido al impedimento que pudiera ocasionar el tamaño de la misma para entrar en los poros. Una vez que se obtuvieron las diferentes preparaciones de CPO se procedió a determinar la actividad catalítica de cada uno de los biocatalizadores con respecto al contenido de disolvente orgánico y a la temperatura, parámetros esenciales para la aplicación potencial de la enzima en los procesos de desulfu-

ración del petróleo.

5.5. Efecto del acetonitrilo en la actividad catalítica de la CPO

Se determinó la actividad catalítica de la CPO libre e inmovilizada para la oxidación del 4,6 DM DBT a diferentes concentraciones de ACN del sistema de reacción y a 25°C, el perfil catalítico se ilustra en la figura 5.17, en donde el 100 % de la actividad catalítica corresponde a la máxima encontrada en el intervalo empleado.

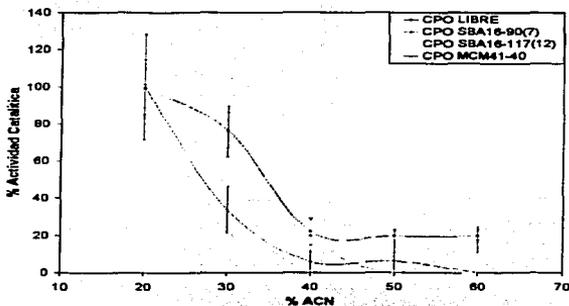


Figura 5.17: Perfil catalítico de la CPO con respecto a la concentración de acetonitrilo.

Como puede observarse en la figura anterior el perfil catalítico de los cuatro biocatalizadores

evaluados es similar, por lo que puede considerarse que el efecto del ACN en el sistema es más importante que el producido al inmovilizar a la enzima. En el cuadro 5.5 se muestran los valores del porcentaje de actividad catalítica para cada concentración de ACN en el sistema.

%ACN	CPO libre		CPO SBA16(90)-7		CPO SBA16(117)-12		CPO MCM41-40	
	Act. catalítica	D.S.	Act. catalítica	D.S.	Act. catalítica	D.S.	Act. catalítica	D.S.
20	100.0	1.2	100.0	14.9	100.0	11.4	100.0	28.6
30	76.6	9.7	75.8	13.7	46.7	15.9	33.8	12.5
40	22.0	7.2	19.9	8.6	15.2	19.4	6.1	6.0
50	19.7	3.4	0.0	0.0	0.0	0.0	6.2	16.1
60	19.7	3.4	17.5	7.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Cuadro 5.5: Actividad catalítica de la CPO a diferentes concentraciones de acetonitrilo, dada en porcentaje. D.S. = desviación estándar.

Como se mencionó anteriormente, la máxima actividad catalítica de la CPO libre se encuentra a 20% de ACN en el sistema debido a que hay una mejor solvatación del sustrato y por tanto una mejor transferencia hacia el sitio activo de la enzima; sin embargo a concentraciones mayores la actividad catalítica se ve disminuida, lo cual se observa en el experimento que se expone aquí. Uno de los factores posibles que afectan la actividad es la desnaturalización de la enzima por el disolvente, en la naturaleza las enzimas funcionan en sistema acuosos, así que la presencia de un disolvente orgánico podría provocar efectos importantes en la estructura de la enzima, como podría ser la disrupción de puentes de hidrógeno, la disminución de las interacciones hidrofóbicas, etc.

Otro factor que puede estar influyendo en esta disminución es el coeficiente de partición del sustrato entre las fases ACN-agua y el sitio activo del biocatalizador, al aumentar la concentración de ACN la mezcla ACN-agua tiene características menos polares que solvatan más fácilmente al sustrato, de forma tal que se hace más difícil su difusión hacia el sitio catalítico de la enzima, es decir, el estado basal del sustrato, el estado termodinámicamente

más estable, es la permanencia del mismo en el disolvente y no en el sitio activo. Además, los soportes empleados presentan grupos silanoles en su superficie, que al ser de carácter hidrofílico hacen más polar el microambiente de la enzima soportada en comparación con el de la enzima en solución, por lo que el sustrato, al ser de carácter hidrófobo es aún menos afín a la enzima inmovilizada.

Como se puede observar en el cuadro 5.5 y en la figura 5.17, la actividad catalítica decae más rápidamente para el biocatalizador CPO MCM41-40, lo cual tiene dos posibles causas principalmente, una es la interacción electrostática entre la enzima y la superficie externa del material que favorecería un estado de menor tolerancia hacia el disolvente, la otra posibilidad es que por la mayor hidrofiliidad el MCM41 con respecto a los materiales SBA16, la partición del sustrato entre las fases ACN-agua y enzima inmovilizada sea aún menos favorable para el biocatalizador CPO MCM41-40.

Una de las diferencias notables es que la CPO libre no pierde totalmente la actividad a concentraciones de 40, 50 y 60 % de ACN, manteniendo alrededor de 20 % de la actividad máxima en los dos primeros minutos de la reacción. Otro dato que sobresale de estos comportamientos es que el biocatalizador CPO SBA16-90(7) pierde su actividad a 50 % de ACN y la "recupera" a 60 % de ACN, lo cual puede deberse a que la desnaturalización de la enzima está más gobernada por la cinética que por la termodinámica, es decir, la enzima tiende a desnaturalizarse más fácilmente a 50 % de ACN (termodinámicamente menos estable). Sin embargo, la disminución de la constante dieléctrica por el aumento del solvente incrementa la rigidez de la enzima, disminuyendo así la velocidad de desnaturalización (cinéticamente más estable) (Partridge *et al.*, 1999).

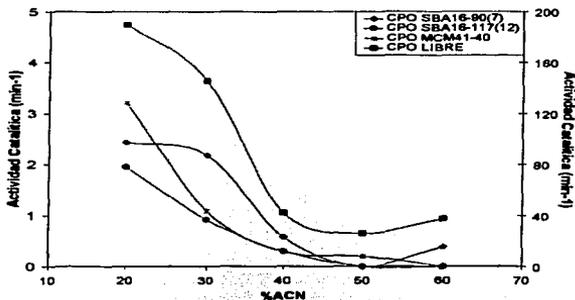


Figura 5.18: Actividad específica de la CPO con respecto a la concentración de acetonitrilo (el eje secundario corresponde a la CPO libre).

La figura 5.18 y el cuadro 5.6 muestran el mismo efecto expresado en actividad específica, en donde pueden compararse los valores correspondientes al 100 % de cada biocatalizador, los cuales son muy parecidos entre los biocatalizadores soportados.

Estos resultados nos dan fuertes indicios de que el tamaño del diámetro de poro no es tan importante en la actividad catalítica que desempeña la CPO en sistemas con disolventes orgánicos, en este caso ACN, como lo es para la HRP inmovilizada en FSM16, trabajo realizado por Takahashi y colaboradores (2000), en donde concluyen que la inmovilización de la enzima en materiales mesoporosos con diámetro de poro similar al diámetro de la proteína mejora su estabilidad en medios orgánicos.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la actividad catalítica de la CPO inmovilizada es mu-

cho menor a la de la enzima libre, como puede verse en el cuadro 5.6 la actividad catalítica de los materiales CPO SBA16-90(7), CPO SBA16-120(12) y CPO MCM41-40 son 59, 79 y 59 veces menor con respecto a la CPO libre, respectivamente, comparando las actividades máximas.

%ACN	CPO libre		CPO SBA16(90)-7		CPO SBA16(117)-12		CPO MCM41-40	
	Actividad Especifica	D.S	Actividad Especifica	D.S.	Actividad Especifica	D.S.	Actividad Especifica	D.S.
20	189.547	1.2	2.426	0.611	1.955	0.223	3.212	0.922
30	145.252	9.7	2.186	0.552	0.913	0.311	1.088	0.400
40	41.767	7.2	0.582	0.336	0.296	0.038	0.284	0.189
50	26.049	5.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.298	0.052
60	37.309	3.4	0.391	0.275	0.0	0.0	0.0	0.0

Cuadro 5.6: Actividad específica de la CPO a diferentes concentraciones de acetonitrilo, dada en min^{-1} . D.S = desviación estándar.

Aún cuando las actividades específicas de los biocatalizadores soportados se vieron reducidas, son mayores a las que presentan algunas enzimas con capacidad de oxidar este tipo de compuestos, tal como se presenta en el cuadro 5.7, por lo que la CPO inmovilizada aún presenta potencial para este tipo de catálisis (Torres et al., artículo enviado).

Enzima	Actividad específica (min^{-1})
Citocromo c	14 ± 0.11
Hemoglobina	2.9 ± 0.3
Microperoxidasa	0.1 ± 0.002
Peroxidasa	RND
Lacasa	RND
Tirosinasa	RND

Cuadro 5.7: Oxidación del 4,6 DM DBT por enzimas oxidativas en 20% de acetonitrilo. RND:reacción no detectada.

5.6. Efecto de la temperatura en la actividad catalítica de la CPO

La temperatura de las corrientes de petróleo es de aproximadamente 80°C, por lo que es importante evaluar el efecto de este parámetro en el comportamiento de las enzimas con potencial de aplicación. Con esto, se determinó el perfil catalítico de la CPO libre e inmovilizada para la oxidación del 4,6 DM DBT en presencia de 20 % de ACN en el sistema de reacción a 25, 30, 35, 40, 45, 50 y 55°C, mostrado en la figura 5.19, en donde la máxima actividad catalítica encontrada en el intervalo empleado corresponde al 100 %. Como se puede observar los biocatalizadores CPO SBA16-90(7) y CPO SBA16-117(12) tienen un comportamiento de campana, el cual es clásico de las enzimas, en este caso con un máximo de actividad catalítica a los 35°C; esta temperatura óptima se debe a dos sucesos principalmente, el primero es el incremento habitual de la velocidad de reacción con la temperatura, y el segundo es el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la enzima, es decir, es el inicio de la desnaturalización al sobrepasar una temperatura crítica (Lehninger, 1993). Con respecto al biocatalizador CPO MCM41-40, la actividad catalítica desciende a los 30°C y a partir de ahí sigue un comportamiento de campana; comportamiento similar a éste se muestra para la CPO libre, con un máximo de actividad catalítica a los 25°C; hasta el momento no se ha estudiado este comportamiento en la CPO, sin embargo, podría tratarse de la actividad catalítica de intermediarios de la enzima en el proceso de desnaturalización producida por la temperatura. Aún cuando pueden resaltarse algunas diferencias entre los perfiles de los biocatalizadores, al parecer el efecto de la temperatura es muy parecido para la enzima libre e inmovilizada.

Como puede observarse en el cuadro 5.8 la actividad catalítica disminuye 34, 142 y 54 veces para los biocatalizadores CPO SBA16-90(7), CPO SBA16-117(12) y CPO MCM41-40, respectivamente con respecto a la CPO libre; sin embargo aún a 45°C todos los biocata-

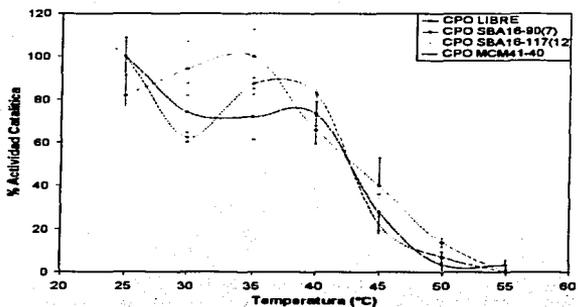


Figura 5.19: Actividad catalítica de la CPO a diferentes temperaturas.

lizadores presentan una actividad específica mayor a la que muestran otras peroxidases para la oxidación de compuestos organoazufrados a temperatura ambiente (cuadro 5.7) (Torres *et al.*, artículo enviado).

De acuerdo a los resultados obtenidos el diámetro de poro no afecta significativamente el perfil de actividad catalítica de la CPO con respecto a la temperatura para la oxidación del 4.6 DM DBT a 20% de ACN.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Temperatura (°C)	CPO libre		CPO SBA16(90)-7		CPO SBA16(117)-12		CPO MCM41-40	
	Actividad Especifica	D.S.						
25	228.1	20.0	6.7	2.2	1.6	0.8	4.2	0.3
30	166.4	30.7	7.7	1.0	2.1	0.4	3.8	0.5
35	164.3	24	8.2	1.0	3.1	0.2	3.6	0.1
40	167.3	13.0	5.4	0.5	1.2	0.5	3.4	0.2
45	63.1	19.2	3.2	1.1	1.6	0.2	0.9	0.1
50	8.0	8.8	1.2	0.2	0.0	0.0	0.3	0.1
55	7.7	5.1	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0

Cuadro 5.8: Actividad específica de la CPO a diferentes temperaturas, dada en min^{-1} . D.S. = desviación estándar.

5.7. Estabilidad de la CPO a 45°C

Como se mencionó en la sección anterior, los cuatro biocatalizadores empleados presentan actividad catalítica aún a 45°C, por lo que de forma complementaria a este trabajo se determinó la estabilidad a esta temperatura con respecto al tiempo. En los procesos de refinación del petróleo se emplean altas temperaturas, y aunque en este contexto 45°C no lo es, se buscó el efecto de la inmovilización sobre la estabilidad térmica, el perfil se ilustra en la figura 5.20.

Como se puede observar, los biocatalizadores CPO SBA16-117(12), CPO MCM41-40 y CPO libre tienden a desnaturalizarse a partir de las primeras horas de incubación, disminuyendo así su actividad catalítica. Para el biocatalizador CPO SBA16-90(7) la actividad catalítica aumenta de las 0 a las 72 horas y posteriormente decae, comportamiento poco usual en las enzimas; tal vez esta peculiaridad se deba a una reorientación de la enzima que pudiera estar haciendo más disponibles los accesos a los sitios catalíticos o tal vez esté involucrado algún intermediario de desnaturalización de la enzima producido por efecto de la temperatura, el cual presenta mayor actividad catalítica que la enzima nativa.

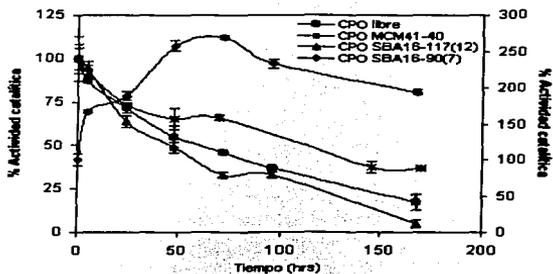


Figura 5.20: Actividad catalítica de la CPO a 45°C.

De la figura 5.20 es posible obtener gráficamente el valor al cual la actividad disminuye al 50%, observándose que el biocatalizador CPO MCM41-40 mantiene el 50% de su actividad catalítica inicial aproximadamente hasta 110 horas, la CPO libre a las 60 horas, el biocatalizador CPO SBA16-117(12) a las 45 horas y en el biocatalizador CPO SBA16-90(7) el 50% de su actividad catalítica inicial no es alcanzado aún a las 150 horas del estudio realizado (cuadro 5.9).

Biocatalizador	Tiempo al 50% de actividad (hrs)
CPO libre	60
CPO SBA16-90(7)	> 150
CPO SBA16-117(12)	45
CPO MCM41-40	110

Cuadro 5.9: Tiempo al 50% de la actividad catalítica de la CPO a 45°C.

La inmovilización de la enzima en un material con diámetros de poro similar al de su diámetro molecular produce un aumento en la actividad catalítica respecto a la temperatura. Takahashi y colaboradores (2000) determinaron que la estabilidad a 70°C de la HRP inmovilizada en FSM16 está relacionada con el diámetro de los poros del soporte, aunque el perfil de la actividad catalítica no presentó el perfil del biocatalizador CPO SBA15-90(7). Por otro lado, la presencia de silicio en la preparación CPO MCM41-40 provee de una mayor resistencia a la pérdida de actividad de la CPO.

Capítulo 6

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Conclusiones

- Con el tratamiento alcotérmico se obtuvieron materiales mesoporosos SBA-16 con diámetros de poro predominantes de 40, 90 y 117 Å.
- La distribución de diámetro de los poros de los materiales SBA-16 sintetizados muestran un buen grado de homogeneidad en los materiales.
- No fue posible determinar el grado de ordenamiento de los materiales sintetizados.
- Probablemente el principal factor para la inmovilización de la CPO en los materiales SBA-16 a pH 4, es el encapsulamiento de la enzima en las estructuras porosas.
- La actividad catalítica para la oxidación del 4,6 DM DBT de la CPO inmovilizada en SBA-16 disminuye drásticamente con respecto a la CPO libre probablemente por problemas difusionales, sin embargo esta actividad se mantiene por encima de las actividades reportadas para otras enzimas que reconocen el mismo sustrato.

- Los perfiles catalíticos de la CPO libre e inmovilizada con respecto a la temperatura y a la concentración de ACN en el sistema son similares, al parecer los efectos causados por el solvente y la temperatura son mayores a los causados por la inmovilización .
- La inmovilización de la CPO en materiales mesoporosos puede estabilizar a la enzima respecto a la temperatura si le provee de interacciones eléctricas (CPO MCM41-40).
- A 45°C el biocatalizador CPO SBA16-90 sufre un aumento en la actividad catalítica que alcanza su máximo a las 72 hrs, probablemente debido a un arreglo molecular en la orientación de la CPO en el material, formación de intermediarios de la enzima o a un efecto difusional.
- El diámetro de poro de los soportes no tiene un efecto significativo en el perfil catalítico de la CPO para la oxidación del 4,6 DM DBT con respecto a la temperatura y a la concentración de ACN en el sistema de reacción.

Perspectivas

- Es necesario realizar pruebas de difusibilidad del sustrato, la sal y el H_2O_2 hacia la CPO inmovilizada para descartar problemas difusionales.
- Una alternativa para el desarrollo de este trabajo es funcionalizar los materiales mesoporosos (con metales o grupos reactivos) para mejorar la estabilidad/actividad de la CPO.

Capítulo 7

REFERENCIAS

- Akita M., Tsutsumi D., Kobayashi M., Kise H.**, Solvent effect on hemin-catalyzed polymerization of phenols, *Biotechnology Letters*, **23**, (2001), 1827-1831.
- Ayala M.**, Obtención y caracterización de cristales catalíticos de cloroperoxidasa, Tesis doctoral, UNAM, (2002).
- Ayala M., Robledo N., López-Munguía A., Vázquez-Duhalt R.**, Substrate specificity and ionization potential in cloroperoxidasa-catalyzed oxidation of diesel fuel, *Environ.Sci.Technol*, **34**, (2000), 2804-2809
- Ayala M., Tinoco R., Hernández V., Bremañuntz P., Vázquez-Duhalt R.**, Biocatalytic oxidation of fuels as an alternative to biodesulfurization. *Fuel Processing Technology*, **57**, (1998), 101-111.
- Babich I. V., Moulijn J. A.**, Science and technology of novel processes for deep desulfuration of oil refinery stream: a review, *Fuel*, **82**, (2003), 607-631.
- Beck J. S., Vartuli C., Roth W. J., Leonowicz M. E., Kresge C. T., Schmitt K. D., Chu C. T-W., Olson D. H., Sheppard E. W., McCullen S. B., Higgins J. B., Schlenker J. L.**, A new family of mesoporous molecular sieves prepares with liquid crystal

templates, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, (1992), 10834-10843.

Bennadja Y., Beaunier P., Margolese D., Davidson A., Fine tuning of the interaction between Pluronic surfactants and silica walls in SBA-15 nanostructured materials, *Microporous and Mesoporous Materials*, **44-45**, (2001), 147-152.

Blanke S.T., Martinis S.A., Sligar S.G., Hager L.P., Probing de heme iron coordination structure of alkaline chloroperoxidase, *Biochemistry*, **35**, (1996), 1437-1453.

Blum Z., Hyde S. T., Solid-state structures and liquid crystals as ordering matrices for proteins, *Acta Chimica Scandinavica*, **48**, (1994), 88-89.

Chamizo A., Garritz A., Química terrestre, Fondo de Cultura Económica, México, (1995).

Cho E-B., Kwon K-W., Char K., Mesoporous organosilicas prepared with PEO-Containing triblock copolymers with different hydrophobic moieties, *Chem. Mater.*, **13**, (2001), 3837-3839.

Comisión Metropolitana para la Prevención y Control de la Contaminación Ambiental del Valle de México, (1996), <http://www.sma.df.gob.mx/cam/cam.htm>

Coombs J., Dictionary of Biotechnology, Ed. Stockton Press, Gran Bretaña, (1992).

Davis M. E., Lobo R. F., Zeolite and molecular sieve synthesis, *Chem. Mater.*, **4**, (1992), 756-768.

Deere J., Magner E., Wall J. G., Hodnett B. K., Mechanistic and structural features of protein adsorption onto mesoporous silicates, *J. Phys. Chem. B*, **106**, (2002), 7340-7347.

Fukushima Y., Inagaky S., Nano-scale structure control of mesoporous silica, *Mater. Sci. Eng.*, **A217/218**, (1996), 116-118.

Gregg S. J., Sing K. S. W., Adsorption, surface area and porosity, Ed. Academic Press, (1997), 303 págs.

Gupta M.N., Enzyme function in organic solvents, *Eur. J. Biochem.*, **203**, (1992), 25-32

Hagun Y., Alexandrova L., Khetan S., Horwitz C., Cugini A., Link D. D., Howard

- B., Collins T. J., Oxidative desulfurization of fuel through TAML® activators and hydrogen peroxide, Petroleum Chemistry division Preprints, 47(1), (2002), 42-44.
- Hammel K. E., Kalyanaraman B., Kirk T. K., Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo[p]-dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase, J. Biol. Chem., 261(36), (1986), 16948-16952.
- Han Y-J, Watson J.T., Stucky G.D., Butler A., Catalytic activity of mesoporous silicate-immobilized chloroperoxidase, J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 17, (2002), 1-8.
- Huheey J.E., Química Inorgánica: principios de estructura y reactividad, México, (1997), Ed. Harla, 1023 págs.
- Kilbane J. J., Jackowski K., Biodesulfurization of water-soluble coal-derived material by rhodococcus rhodochrous IGTS8, Biotechnol. Bioeng, 40, (1992), 1107-1114.
- Lehninger A., Principles of biochemistry, USA, (1993), Ed. Omega, 1013págs.
- Monticello D.J., Finnerty W.R., Microbial desulfurization of fossil fuels, Annu. Rev. Microbiol. 39, (1985), 371.
- Patridge J., Moore B. D., Halling P. J., alpha-Chymotrypsin stability in aqueous-acetonitrile mixtures: is the native enzyme thermodynamically or kinetically stable under low water conditions?, J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 6, (1999), 11-20.
- Schmidt-Winkel P., Lukens W. W., Zhao D. Jr., Yang P., Chmelka B. F., Stucky G., Mesocellular siliceous foams with uniformly sized cells and windows, J. Am., Chem. Soc., 121, (1999), 254-255.
- Stiborová M., Miksanová M., Martinek V., Frei E., Heme peroxidases: structure, function, mechanism and involvement in activation of carcinogens, Collect. Czech. Chem. Commun., 65, (2000), 297-325.
- Sun J., Moulijn J. A., Jansen K. C., Maschmeyer T., Coppens M-O., Alcothermal synthesis under basic conditions of an SBA-15 with long-range order and stability, Adv.

Mater., *13* (5), (2001), 327-331.

Sundaramoorthy M., Terner J., Poulos T., The crystal structure of chloroperoxidase: a heme peroxidase-cytochrome P450 functional hybrid, *Structure*, *3*(12), (1995), 1367-1377.

Takahashi H., Bo Li, Sasaki T., Miyazaki Ch., Kajino T., Inagaki S., Immobilized enzymes in ordered mesoporous silica materials and improvement of their stability and catalytic activity in an organic solvent, *Microporous and Mesoporous Materials*, *44-45*, (2001), 755-762.

Takahashi H., Bo Li, Sasaki T., Miyazaki Ch., Kajino T., Inagaki S., Catalytic activity in organic media solvents and stability of immobilized enzymes depend on the pore size and surface characteristics of mesoporous silica, *Chem. Mater.*, *12*, (2000), 3301-3305.

The Merk Index, Editora Budavari S., Ed. Whitehouse Station, EUA.

Topsoe H., Clavse B. S., Massoth I. E., Hidrotreating Catalysis, Ed. Springer-Verlag, Alemania, (1996).

Torres E., Tesis doctoral Modificación química *ex-situ* e *in-situ* del grupo hemo de la CPO del hongo *Caldariomyces fumago* y de la hemoglobina humana, UNAM, 2000.

Torres E., Aburto J., Zuñiga K., LeBorgne S., Effect of cosolvent concentration on biocatalytic performance of chloroperoxidase, Artículo enviado *J.Mol. Cat. B: Enzymatic* (2003).

Valderrama B., Ayala M., Vázquez-Duhalt R., Suicide Inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzyme, *Chemistry and Biology*, *9*, (2002), 555-565.

Van Deurzen M., Van Rantwijk F, Sheldon R., Selective oxidations catalyzed by peroxidases, *Tetrahedron*, *53* (39), (1996), 1383-13220.

Vázquez-Duhalt R., Torres E., Valderrama B., Le Borgne S., Energy and Fuels, *16*(5), (2002), 1239-1250.

Wang P., Krawiec S., Kinetic Analyses of Desulfurization of Dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* in Batch and Fed-Batch Cultures, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, (1996), 1670-1675.

Washmon-Kriel L., Jimenez V. L., Balkus K. J. Jr., Cytocrome c immobilization into mesoporous molecular sieves, *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, **10**, (2000), 453-469.

Yamada T., Zhou H., Asai K., Honma I., Pore size controlled mesoporous silicate powder prepared by triblock copolymer templates, *Mater. Lett.*, **5538**, (2002), 1-4.

Yanagisawa T., Shimizu T., Kuroda K., Kato Ch., The preparation of alkyltrimetil ammonium-kanemite complexes and their conversion to microporous materials, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **63**, (1990), 988-992.

Yiu H. H. P., Wright P. A., Botting N. P., Enzyme immobilization using SBA-15 mesoporous molecular sieves with functionalised surfaces, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **15**, (2001), 81-92.

Zhao D., Freng J., Huo Q., Melosh N., Frederickson G. H., Chmelka B.F., Stucky G.D., Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores, *Science*, **279**, (1998a), 548-552.

Zhao D., Huo Q., Feng J., Melosh N., Chmelka B.F., Stucky G.D., Nonionic triblock and star diblock copolymer and oligomeric surfactant synthesis of highly ordered, hydrothermally stable, mesoporous silica structures, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, (1998b), 6024-6036.

Zúñiga Sánchez Kareem, Actividad Enzimática de la Cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* en sistemas con solventes orgánicos, Tesis de Licenciatura, UNAM, 2002.

(<http://www.rolac.unep.mx>).

Apéndice A

APÉNDICE

A.1. Propiedades texturales de los sólidos catalíticos

La medida del área específica de un sólido y el estudio de su estructura porosa, se realizan generalmente mediante la impregnación del sólido con una substancia líquida o gaseosa que no sea reactivo con éste. La utilización de un gas para estas medidas, está basada en el fenómeno de adsorción física (fig. A.1), y ha dado lugar al método ideado por Brunauer, Emmet y Teller, conocido como método BET, aunque en realidad no se trata de un método, sino de una interpretación de los datos que constituyen una isoterma de adsorción, basada en un modelo propuesto por los mismos autores.

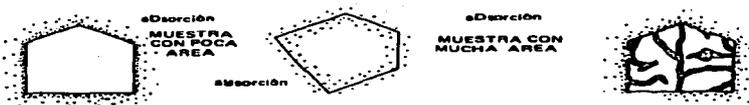


Figura A.1: Diferencia entre la adsorción y la absorción.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El punto de partida del método es una isoterma de adsorción física de un gas sobre un sólido. En condiciones de equilibrio termodinámico habrá un número N_a de moléculas de gas adsorbidas sobre la superficie del sólido. El número de moléculas N_a se puede convertir en un volumen adsorbido V_a a condiciones normales de presión y temperatura mediante la ley de los gases ideales:

$$PV_a = N_a RT$$

donde T y P corresponden a la temperatura ambiente y la presión atmosférica a nivel del mar, respectivamente. Manteniendo fija la temperatura T es posible variar la presión del equilibrio P y para cada valor específico de la presión se tendrá un nuevo valor de V_a . A la gráfica V_a contra P se le llama isoterma de adsorción. Existen diversas formas de presentar una isoterma de adsorción, una de las más comunes consiste en graficar V_a/M contra P/P_s , donde M es el peso de la muestra y P_s es la presión de saturación del gas en presencia de la muestra. El cociente P/P_s se conoce como presión relativa del gas. Las diferentes isotermas que se pueden obtener dependen de la naturaleza del gas utilizado y del sustrato sólido y de acuerdo a la IUPAC se clasifican como se indica en la figura A.2.

En el cuadro A.1 se indica de forma breve el tipo de material al que puede corresponder cada tipo de isoterma. Cabe mencionar que la isoterma tipo VI que es muy difícil de observar y que por su forma es llamada "isoterma escalonada".

Es posible entender la forma de las isotermas de manera cualitativa, en base a los principios físicos y a los modelos del proceso adsorptivo. Como anteriormente se mencionó, la interpretación de los resultados experimentales en el trazo de la isoterma, se supone que la adsorción es física de muchas capas (multicapas) y que las fuerzas de interacción entre las moléculas del gas son iguales a las fuerzas responsables de la condensación de vapores;

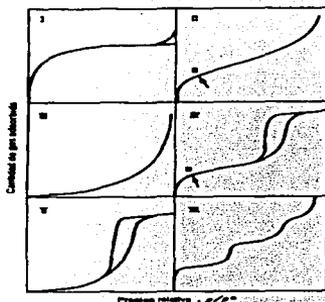


Figura A.2: Clasificación de la IUPAC de las isothermas de adsorción.

basándose en estas condiciones se obtiene, a través de una derivación cinética o estadística, la ecuación de la isoterma de BET, la cual se detalla así:

$$\frac{(P/P_s)}{V_a(1 - P/P_s)} = \frac{1}{V_m C} + \frac{C - 1}{V_m C} \frac{P}{P_s}$$

en donde V_a es el volumen de gas adsorbido (adsorbato) a la presión P en condiciones estándar de presión y temperatura; V_m es el volumen a condiciones estándar de presión y temperatura que se necesita de gas para cubrir la superficie (adsorbente) con una monocapa completa; C es una constante que depende de la temperatura, y P_s es la presión de saturación del adsorbato. En la ecuación anterior hay tres constantes, una de ellas, P_s , es característica del adsorbato y existen tablas en donde se puede obtener su valor; las dos restantes, V_a y P , se calculan a través de los datos experimentales graficando $(P/P_s)/V_a(1 - P/P_s)$ contra (P/P_s) . A la recta resultante se le calcula la pendiente y la ordenada al origen, las cuales se identifica como:

Isoterma	Tipo de material
Tipo I	Sólidos microporosos
Tipo II	Sólidos no porosos
Tipo III	Sólidos no porosos o macroporosos que presentan interacciones débiles gas-sólido
Tipo IV	Sólidos mesoporosos
Tipo V	Sólidos mesoporosos o microporosos que presentan interacciones débiles gas-sólido

Cuadro A.1: Clasificación de la IUPAC de las isoterma de adsorción.

Intersección (ordenada al origen) = $\frac{1}{V_m C}$

Pendiente = $\frac{C-1}{V_m C}$

De estas dos ecuaciones es posible evaluar las dos constantes C y V_m , en particular el volumen de una monocapa completa, está dado por:

$$V_m = \frac{1}{\text{Ordenada al origen} + \text{Pendiente}}$$

El valor de V_m así obtenido puede usarse para calcular el área específica de un sólido.

Una característica textural de gran importancia en el diseño de un sólido catalítico, es el área que presenta el adsorbente factible de ser ocupado por el adsorbato; cuando esta área se expresa por unidad de masa del catalizador, se le nombra área específica. Para calcular esta propiedad utilizando como adsorbato al nitrógeno y la técnica BET, basta con trabajar en la región lineal de la isoterma, que generalmente se encuentra situada en el intervalo de 0.04 a 0.3 de la presión relativa. Trabajando en este intervalo se calcula el volumen de la monocapa completa (V_m), y si se conoce el área transversal de una molécula de nitrógeno (16.2 Å) adsorbida en la superficie de la muestra, se calcula el área específica del adsorbente

a partir de la ecuación

$$A(m^2/g) = \frac{\sigma A^2 10^{-20} (6,02323) V_m (ml/g)}{(22,414)(103)}$$

que al sustituir el valor de s para nitrógeno y el volumen de la monocapa V_m , la ecuación anterior se reduce a:

$$A(m^2/g) = \frac{4,35}{Int. + Pend.}$$

con esta ecuación se determina el área específica de un sólido catalítico, utilizando como adsorbato al nitrógeno.

Distribución de diámetro de poro.

El área específica de un adsorbente está formada por el área de las regiones planas que presenta el sólido catalítico, y por el área de las paredes de los poros. Cuantificar el área específica de los poros de un adsorbente, es en muchos casos sumamente importante, debido a que es allí donde se lleva a cabo un alto porcentaje del proceso catalítico; por esto, es necesario saber si los poros son de un tamaño tal, que permitan a las moléculas de los reactantes viajar al interior de ellos; tal información de esta propiedad estructural, se obtiene al calcular la distribución de diámetro de poro para un adsorbente dado.

Para obtener esta característica se procede como sigue: una vez que la adsorción se terminó, se puede proceder a desadsorber el gas y con esto trazar la curva de la desorción, que junto

con el de la adsorción, forman la histéresis de la adsorción, ilustrado en la figura A.3.

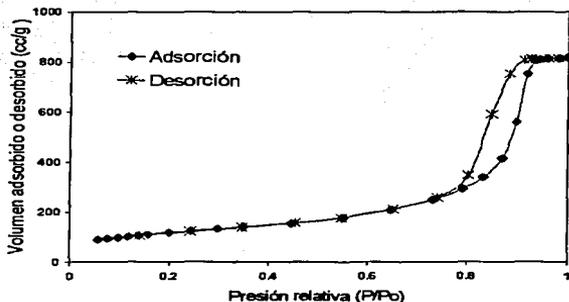


Figura A.3: Isoterma de adsorción-desorción.

Para elaborar el brazo de la desorción, se va evacuando paulatinamente el gas adsorbido en la muestra, o sea que el adsorbato abandona al adsorbente, vaciándose algunos poros y emigrando las moléculas hacia las regiones planas hasta llegar a una situación de equilibrio; se hace otra evacuación y se obtiene otro punto experimental, y así se procede sucesivamente para los siguientes puntos experimentales hasta evacuar completamente al gas.

Para obtener la distribución de poro a partir de los datos de adsorción, se necesita proceder con más cuidado. Hasta ahora, el método más frecuentemente utilizado es de BJH (Barret, Joyner y Halenda), basado en un modelo de poros cilíndricos.

El área específica total de poro está formada por las contribuciones de las regiones planas,

el área de las paredes de los poros y el área expuesta entre las partículas del sólido. La cuantificación del área específica de los poros del sólido, es muy importante, debido a que ahí es donde se lleva a cabo el fenómeno catalítico, por esto, es necesario saber si los poros son de un tamaño tal que permitan a las moléculas de los reactivos difundirse en su interior. Lo anterior se logra a partir del cálculo de la distribución del diámetro de poros para lo cual se toman por convención los puntos experimentales del brazo de desorción de la isoterma y se procede como sigue:

Si llamamos L_k a la longitud total de poros con radios entre $R_k - DR_k$ y $R_k + R_k$, con tamaño medio R_k , en cualquier intervalo de presiones $P_k - D_k$ a $P_k + D_k$ podemos escribir:

$$V_p - V_i = \sum_{k=1}^i \pi (R_k - t_i)^2 L_k$$

Donde V_i es el volumen total del adsorbato a un punto de la isoterma y P_i/P_s es el límite inferior del intervalo de presión i -ésimo y t_i es la capa adsorbida a esta presión. La ecuación anterior puede ser resuelta para L_i :

$$L_i = \frac{1}{\pi (R_k - t_i)^2 L_k} (V_p - V_i - \sum_{k=1}^{i-1} \pi (R_k - t_i)^2 L_k)$$

dividiendo la isoterma en intervalos de presiones adecuados por debajo de la saturación, se calcula la distribución completa de L_i (R_i), el volumen de poro y la superficie. La ecuación es específica para poros cilíndricos, pero puede ser fácilmente modificada para otras geometrías.

A.2. Difracción de Rayos X

En una primera aproximación un cristal puede considerarse como una agrupación ordenada y periódica de átomos, que al ser alcanzados por un haz de Rayos X, los difunden simultáneamente. En general, las ondas dispersadas interfieren unas con otras anulándose, pero en ciertas direcciones se refuerzan para formar un nuevo frente de onda, fenómeno conocido como difracción.

La técnica de Rayos X permite determinar parámetros tan importantes como el grado de cristalinidad, la identificación de las fases cristalinas, el estado de agregación y el tamaño de las partículas metálicas entre otras características. Los electrones de los átomos ordenados en los cristales, desvían los rayos X originando patrones de difracción a partir de los cuales se calculan los parámetros deseados.

Con el fin de explicar los ángulos observados para los haces difractados por un cristal (experimento Laue), Bragg propuso una explicación sencilla. Supongamos que cada uno de los planos de los átomos actúa como un espejo casi transparente que sólo refleja una parte de la intensidad incidente; no se obtienen rayos difractados más que cuando las reflexiones debidas a los planos paralelos interfieren de manera constructiva (fig. A.4).

Considérese que:

- La dispersión es elástica, o sea que la longitud de onda del fotón no se modifica con la reflexión (dispersión coherente)
- Los planos son equidistantes
- La distancia interplanar es d . (Estos planos no se deben confundir con los planos de las caras de la muestra ya que los Rayos X atraviesan la superficie)

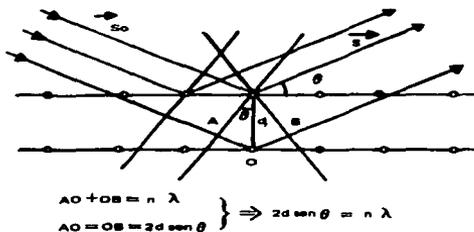


Figura A.4: Demostración de la Ley de Bragg.

La diferencia de camino óptico entre los haces difractados por dos planos adyacentes, es $2d \sin \theta \lambda$, en donde θ es el ángulo entre el plano y el haz incidente. Por otro lado, una interferencia constructiva se produce sólo cuando la diferencia de camino óptico es un múltiplo entero de onda λ . Así, la condición de la interferencia constructiva para un haz incidente queda condensada en la relación:

$$2d \sin \theta = n \lambda \quad (n = 1, 2, 3 \dots)$$

Esta ecuación se conoce como la ley de Bragg. Hay que resaltar:

- o Aunque se suponga que cada plano actúa como un espejo, sólo para algunos valores de θ se suman a las reflexiones de todos los planos paralelos, para dar un haz reflejado (difractado) intenso.
- o Que la ley de Bragg es una consecuencia de la periodicidad de los planos y requiere de longitudes de onda $\lambda \leq 2d$. Si $\lambda / 2d$ fuese muy pequeño, los ángulos de difrac-

ción serían igualmente pequeños y, por tanto, el haz difractado sería difícilmente observable. Esto ocurre con cristales cuyas distancias interplanares son grandes.

- o Que para obtener un diagrama de difracción con un cristal, se emplean los métodos siguientes:

o bien el haz policromático y siempre hay una longitud de onda que cumple con la relación de Bragg para un plano reticular dado (experimento de Laue).

o el haz es monocromático y el cristal (o los cristales), deben dar vueltas para que los distintos planos hagan el ángulo necesario de reflexión con el haz incidente. Este es el principio de los métodos de difracción más importantes utilizados hoy en día.

- o Que en la fórmula de la Ley de Bragg la refracción debe ser diferente de 1.
- o Finalmente, que la intensidad del haz difractado depende de :
 - o La intensidad y la longitud de onda del haz incidente
 - o La estructura del cristal, es decir, del arreglo de los átomos en la celda unitaria; arreglo caracterizado que se conoce como "factor de estructura"
 - o El volumen de los cristales que difracten
 - o El ángulo de difracción
 - o La absorción de los Rayos X por el cristal
 - o El arreglo experimental utilizado

Las direcciones de los haces difractados sólo dependen de la geometría de la red (bien por la orientación y espaciado de los planos, desde el punto de vista de Bragg, o por la periodicidad de las tres dimensiones, según las ecuaciones de Laue). Dicho en otras palabras, son el tamaño y la forma de la celda unidad los que determinan la dirección de los haces. La distribución de los átomos dentro de la celda unidad no afecta a estas

direcciones, pero determina, en cambio, las intensidades de los distintos haces. Si se da una celda unidad de dimensiones conocidas se pueden predecir los haces difractados calculando los distintos espaciados interplanares d y llevándolo a la fórmula de Bragg.

A.3. MCM-41

Además de los materiales SBA-16, se decidió trabajar con un control externo para la inmovilización enzimática, el MCM-41. Este material no se sintetizó en el laboratorio, y las características que se proporcionaron son las siguientes. El material es un aluminosilicato mesoporoso con un diámetro de poro promedio de 40 Å y un área específica de 1150m²/g. La figura A.5 es el difractograma de Rayos X, correspondiente a este tipo de material, se observa un pico muy intenso en el plano (100), y tres picos restantes que indican la alta periodicidad del sólido.

En la fotomicrografía de la figura A.6 se observa como está el arreglo de poros de este material, que es básicamente hexagonal.

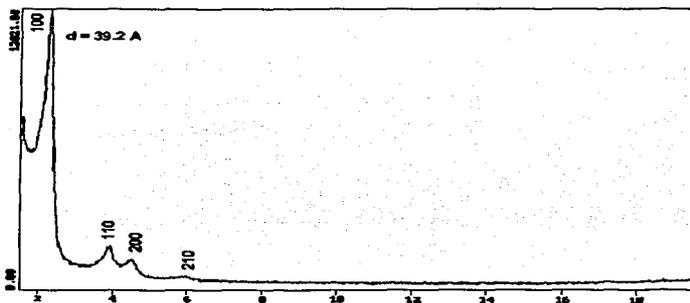


Figura A.5: Difracción de Rayos X del material MCM-41.



Figura A.6: Fotomicrografía del MCM-41, arreglos hexagonales ordenados.