



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

CENTRO DE NANOCIENCIAS Y
NANOTECNOLOGÍA

*Síntesis enzimática de colorantes
industriales derivados del índigo*

TESIS

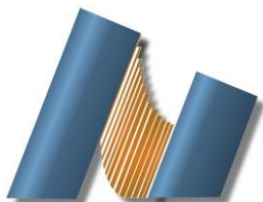
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN NANOTECNOLOGÍA**

P R E S E N T A:

JOSEMARCO MENDOZA ÁVILA

TUTOR DE TESIS

DR. RAFAEL VÁZQUEZ DUHALT



Ensenada, Baja California a agosto 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

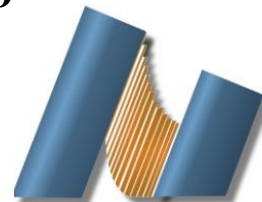
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
CENTRO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA



LICENCIATURA EN NANOTECNOLOGÍA
BIONANOTECNOLOGÍA

*SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE COLORANTES INDUSTRIALES DERIVADOS
DEL ÍNDIGO*

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN NANOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
JOSEMARCO MENDOZA ÁVILA

DIRECTOR DE TESIS
DR. RAFAEL VÁZQUEZ DUHALT

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA AGOSTO 2019

Hago constar que el trabajo que presento es de mi autoría y que todas las ideas, citas textuales, datos, ilustraciones, gráficas, etc. sacados de cualquier obra o debidas al trabajo de terceros, han sido debidamente identificados y citados en el cuerpo del texto y en la bibliografía y acepto que en caso de no respetar lo anterior puedo ser sujeto de sanciones universitarias.

Afirmo que el material presentado no se encuentra protegido por derechos de autor y me hago responsable de cualquier reclamo relacionado con la violación de derechos de autor.

Josemarco Mendoza Ávila

*A mamá, papá y Rodrigo,
por su amor y apoyo incondicional.*

RESUMEN

Los colorantes se usan ampliamente en textiles, papel, plásticos y alimentos. El índigo y sus derivados son quizá de los colorantes más antiguos conocidos por el hombre ya que originalmente eran extraídos de plantas y moluscos. No obstante, la demanda actual por este colorante se satisface en gran medida con índigo sintético. En este sentido, se han propuesto diversos métodos para la síntesis química de índigo: Baeyer-Drewson (1882), Heumann (1897), y Pfleger (1901), siendo el segundo el primer método viable comercialmente. Desafortunadamente, la era del índigo sintético ha despertado preocupación ambiental por el uso de agentes contaminantes y nocivos para la salud. En respuesta, la química verde plantea el desarrollo de nuevos métodos de síntesis amigables con el ambiente y económicamente atractivos. Por consiguiente, en este trabajo se ensayó la síntesis enzimática de índigo y sus derivados a partir de indol. La variante del citocromo P450, CYP_{BM3} F87A, se usó para catalizar la síntesis de índigo y tres derivados di-sustituídos. Los sustratos utilizados fueron: indol, 4-bromoindol, 5-metoxiindol, y 7-metoxiindol. Los datos cinéticos se ajustaron al modelo matemático de Hill con valores de k_{cat}/K_M de 27, 16, 43, y 33 $\text{min}^{-1} \text{mM}^{-1}$ para los sustratos, respectivamente. En todos los casos se obtuvieron productos coloreados que se caracterizaron por técnicas de espectrometría. Además, la CYP_{BM3} F87A se inmovilizó en nanopartículas magnéticas que mostraron actividad catalítica en la síntesis de índigo a partir de indol (k_{cat}/K_M 5 $\text{min}^{-1} \text{mM}^{-1}$). Esto sugiere que las nanopartículas biocatalíticas son capaces de transformar otros indoles sustituidos y producir así colorantes derivados del índigo. Estos resultados hacen de la síntesis enzimática de colorantes industriales una alternativa plausible a la síntesis química convencional, pero de menor impacto ambiental.

Palabras clave: Citocromo P450, índigo, indol, síntesis enzimática, química verde.

ABSTRACT

Coloring materials are extensively used in the textiles, paper, plastics, and food. Indigo and its derivatives are perhaps one of the oldest known natural dyes, since they were originally obtained from plants and mollusks. Today, the demand for this dye is largely met by synthetic indigo. Several methods have been proposed for indigo chemical synthesis: Baeyer-Drewson (1882), Heumann (1897), and Pflieger (1901), the second being the first commercially practiced method. Unfortunately, synthetic indigo has raised environmental concern due to the use of pollutant and hazardous chemicals. In response, green chemistry aims to find new environmentally friendly and economically attractive synthesis methods. Accordingly, this work describes the enzymatic synthesis of indigo and its derivatives starting from indol. A *Bacillus megaterium* cytochrome P450 variant, CYP_{BM3} F87A, was used to catalyze the synthesis of indigo and three di-substituted derivatives. Substrates used were indole, 4-bromoindole, 5-methoxyindole and 7-methoxyindole. The kinetic data were fitted to Hill's mathematical model with k_{cat}/K_M values of 27, 16, 43, and 33 min⁻¹ mM⁻¹ for each substrate, respectively. In all cases, colored products were obtained that were characterized by spectrometric techniques. Furthermore, the CYP_{BM3} F87A enzyme was immobilized on magnetic nanoparticles that exhibited catalytic activity in the synthesis of indigo from indol (k_{cat}/K_M 5 min⁻¹ mM⁻¹). This suggest that the biocatalytic nanoparticles can transform other substituted indols and thus produce indigo derivative dyes. Enzymatic synthesis of industrial dyes offers a plausible alternative to conventional chemical synthesis of lower environment impact.

Key words: Cytochrome P450, indigo, indol, enzymatic synthesis, green chemistry.

ÍNDICE

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	7
2.1. Síntesis enzimática de índigo.....	7
2.1.1. Monooxigenasas.....	8
2.1.2. Dioxigenasas	13
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. HIPÓTESIS	17
5. OBJETIVOS	17
5.1. Objetivo general.....	17
5.2. Objetivos específicos	17
6. METODOLOGÍA	17
6.1. Materiales.....	17
6.2. Expresión de la CYP _{BM3} F87A.....	18
6.3. Purificación de la CYP _{BM3} F87A	19
6.4. SDS-PAGE y cuantificación de la CYP _{BM3} F87A	20
6.5. Síntesis enzimática de colorantes.....	21
6.6. Extracción y purificación de los colorantes	22
6.7. Caracterización de los colorantes.....	22
6.8. Síntesis de las nanopartículas magnéticas.....	23
6.9. Funcionalización de las nanopartículas magnéticas	23
6.9.1. Funcionalización con dióxido de silicio.....	24
6.9.2. Funcionalización con grupos amino.....	25
6.9.3. Funcionalización con CYP _{BM3} F87A	25
6.10. Caracterización de las nanopartículas magnéticas	25
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
7.1. Expresión y purificación de la CYP _{BM3} F87A.....	27

7.2. Síntesis enzimática de colorantes.....	30
7.3. Caracterización de los colorantes.....	32
7.4. Inmovilización de la CYP _{BM3} F87A	37
8. CONCLUSIONES	41
9. OTRAS POSIBILIDADES	42
10. REFERENCIAS.....	43
11. ANEXOS.....	48
11.1. Coeficientes de extinción.....	48
11.2. Porcentaje de CYP _{BM3} F87A inmovilizada	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Síntesis de índigo natural a partir de plantas <i>Indigofera</i>	2
Figura 2. Síntesis de Baeyer-Drewson (1882).....	3
Figura 3. Síntesis de Heumann (1900)	3
Figura 4. Estructura tridimensional de la variante CYP _{BM3} F87A	6
Figura 5. Mecanismos sugeridos para la síntesis enzimática de índigo a partir de indol.....	8
Figura 6. Síntesis enzimática de colorantes catalizada por la CYP 2A6 y cinco mutantes a partir de indoles sustituidos.....	12
Figura 7. Funcionalización de las nanopartículas magnéticas.....	24
Figura 8. Expresión y purificación de la CYP _{BM3} F87A	27
Figura 9. Purificación de la CYP _{BM3} F87A mediante cromatografía de afinidad.....	28
Figura 10. Caracterización de la CYP _{BM3} F87A	29
Figura 11. Cinética enzimática de la transformación de indol, 4-bromoindol, 5-metoxiindol, y 7-metoxiindol	30
Figura 12. Espectros de masas de los colorantes sintetizados.....	33
Figura 13. Mecanismo propuesto para la síntesis enzimática de colorantes derivados del índigo	35
Figura 14. Caracterización de los colorantes.....	36
Figura 15. Caracterización de las nanopartículas magnéticas.....	38
Figura 16. Caracterización de las nanopartículas magnéticas	39
Figura 17. Síntesis química de dimetoxiíndigos.....	49

1. INTRODUCCIÓN

El color es una percepción visual humana fundamental. Consecuentemente, a lo largo de la historia, el hombre ha usado diversas sustancias para dar color a las cosas. En conjunto, estas sustancias se denominan colorantes y se caracterizan por conferir una tinción permanente al ser aplicados sobre un sustrato. Los colorantes absorben la luz la región visible del espectro electromagnético, exhibiendo el color complementario al que absorben (Luis-Lafuente *et al.*, 1997). Así, si un colorante es azul, entonces absorbe luz naranja (~595 a 640 nm). A la inversa, si un colorante es naranja, entonces absorbe luz azul (~440 a 485 nm). De este modo, el azul y el naranja son colores complementarios, es decir, cada uno de ellos es el color que adquiere la luz blanca cuando se elimina al otro.

Históricamente, los colorantes se han obtenido de fuentes naturales como plantas, animales y minerales. En el antiguo Egipto, por ejemplo, los colorantes marrones se extraían a partir de los óxidos de hierro presentes en la arcilla; en Mesoamérica, el color carmín se obtenía del ácido carmínico producido por la cochinilla del carmín *Dactylopius coccus*; y en Asia, el color rojo se extraía de las raíces de la planta *Rubia cordifolia* (Gürses *et al.*, 2016). No obstante, entre los colorantes naturales, destaca el azul índigo por su color intenso y sus aplicaciones textiles. En este sentido, diversos autores lo han denominado como “el rey de los colorantes” (Hunger, 2003; Teanglum *et al.*, 2013; Soladoye *et al.*, 2015; Paul, 2015).

El índigo y sus derivados son quizá de los colorantes más antiguos conocidos por el hombre (Gürses *et al.*, 2016). Etimológicamente, el término índigo proviene del latín *indicus* que significa “procedente de la India”, debido a que India fue por siglos el principal productor de este colorante (Clark *et al.*, 1993; Hunger, 2003). El azul índigo era exportado desde la India y sus vecindades a Europa, donde fue de gran interés para los griegos y los romanos, quienes no sólo lo usaban para teñir textiles, sino también como tinta de bolígrafo y para arte corporal (Balfour-Paul, 1998). Otros territorios productores de índigo fueron la región Andina y el antiguo Egipto, donde el índigo fue empleado para teñir prendas usadas los procesos de momificación (Clark *et al.*, 1993). El índigo también se produjo en Mesoamérica, donde los mayas lo mezclaban con arcillas para elaborar el famoso azul maya.

El azul índigo fue extraído originalmente de plantas del género *Indigofera*, como *Indigofera tinctoria* e *Indigofera suffruticosa* (Teanglum *et al.*, 2013; Soladoye *et al.*, 2015). El método de extracción del índigo (Figura 1) se basa en un proceso de fermentación descubierto hace más de 3000 años (Clark *et al.*, 1993). En líneas generales, el proceso comienza colectando las hojas de la planta, las cuáles contienen el β -glucósido indicano. Luego, las hojas se fermentan en agua, resultando en la hidrólisis del indicano en β -D-glucosa e indoxilo por la enzima indoxil- β -D-glucosidasa presente en las hojas. Posteriormente, se recupera el fermentado y se agrega una base fuerte, como hidróxido de sodio. De este modo, la interacción del indoxilo con el oxígeno del ambiente, en condiciones alcalinas, resulta en la formación de índigo (Hunger, 2003; Wenner, 2017).

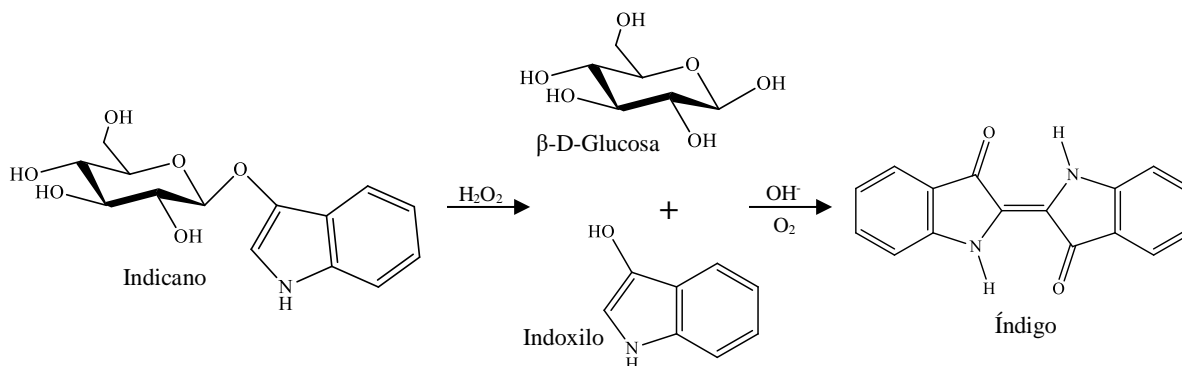


Figura 1. Síntesis de índigo natural a partir de plantas *Indigofera*

Las plantas *Indigofera* no fueron la única fuente de índigo natural, también se ha reportado la extracción de índigo y derivados a partir de moluscos gasterópodos marinos como *Murex brandaris*, *Murex trunculus* y *Purpura haemastoma* (Clark *et al.*, 1993). Entre los derivados de índigo extraídos de moluscos, destaca el púrpura de Tiro, que quizá ha sido el colorante más costoso de la historia y cuyo principal componente es el 6,6'-dibromoíndigo (Gürses *et al.*, 2016). El exorbitante costo del púrpura de Tiro se justifica porque para obtener un gramo de colorante se necesitaban más de 9000 moluscos, por lo que su uso se limitaba exclusivamente a los artículos de lujo (Kotz *et al.*, 2006).

Las plantas y los moluscos marinos constituyeron la única fuente de índigo por más de 3000 años. No obstante, la popularidad y alta demanda por este colorante motivó la

búsqueda de nuevos métodos para la producción de índigo sintético. De esta manera, a finales del siglo XIX, Adolf von Baeyer y Viggo Drewson elucidaron la primera ruta para la síntesis química de índigo. La síntesis de Baeyer-Drewson (Figura 2) consiste en la condensación aldólica de 2-nitrobenzaldehído y acetona en condiciones alcalinas (Baeyer y Drewson, 1882). Por sus contribuciones a la química de los colorantes, Adolf von Baeyer fue galardonado con el premio Nobel de química en 1905.

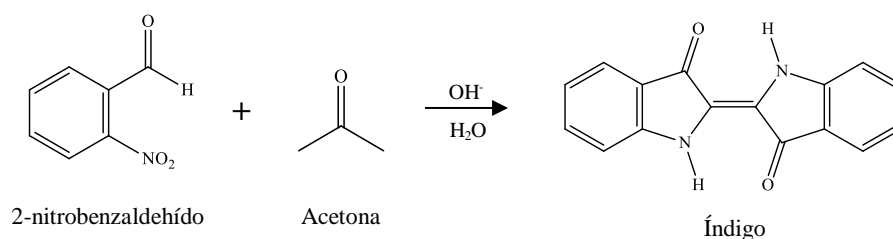


Figura 2. Síntesis de Baeyer-Drewson (1882)

A pesar de su relevancia, la síntesis de Baeyer-Drewson resultó ser económicamente inviable. Sin embargo, esta propuesta alentó a las compañías de productos químicos a invertir en nuevos métodos para la producción de índigo sintético (Reed, 1992). De esta forma, Karl Heumann introdujo en 1897 el primer método económicamente viable para la producción de índigo sintético (Christie, 2001). La síntesis de Heumann (Figura 3) inicia con la reacción entre el ácido 2-aminobenzoico y ácido cloroacético para dar 2-(carboximetil-amino)-ácido benzoico, que es calentado en medio alcalino y atmósfera inerte resultando en indoxil-2-ácido carboxílico. En contacto con el aire, este compuesto rápidamente se descarboxila y oxida produciendo índigo (Heumann, 1890).

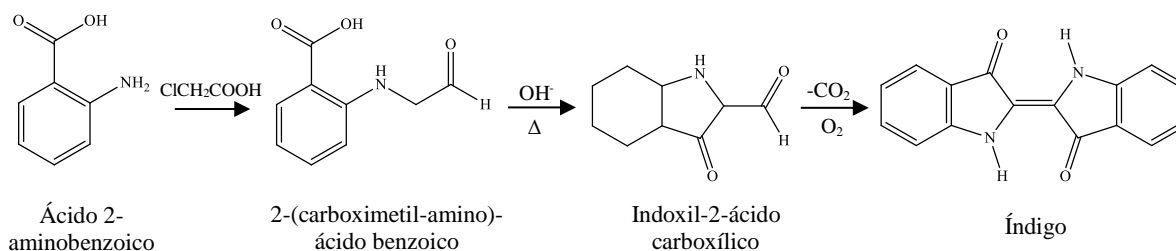


Figura 3. Síntesis de Heumann (1890)

Tras adquirir los derechos de la síntesis de Heumann, la compañía alemana BASF™ comercializó por primera vez índigo sintético en 1897. La introducción de este producto en el mercado, generó que la manufactura de índigo natural disminuyera notablemente. India, por ejemplo, pasó de exportar 19000 toneladas de índigo en 1897 a 1000 toneladas en 1914 (Clark *et al.*, 1993). Otro efecto del exitoso reemplazo del índigo natural por índigo sintético, fue la síntesis de nuevos colorantes derivados del índigo; tales como el tioíndigo (Friedländer 1907), los bromoíndigos, los metoxiíndigos (Friedländer *et al.*, 1912), y los hidroxíndigos (Friedländer y Schenck, 1914). Entre estos colorantes, destacan los índigos sustituidos con halógenos por su color brillante y su resistencia a los agentes blanqueadores (Fort y Lloyd, 2016).

A la fecha, las rutas sintéticas constituyen la principal fuente de índigo y sus derivados en el mundo. No obstante, en años recientes, dichas rutas se han convertido en fuente de preocupación ambiental. La razón de ello es que la síntesis química de índigo involucra el uso de recursos petroquímicos, catalizadores inorgánicos y agentes reductores que contaminan el ambiente y son potencialmente peligrosos para la salud (Namgung *et al.*, 2019). Por ejemplo, en el método de síntesis usado por BASF™, el naftaleno es el precursor del ácido 2-aminobenzoico, en una reacción catalizada por mercurio (Clark *et al.*, 1993). En este escenario, la química verde plantea la introducción de nuevos métodos para la síntesis de índigo y sus derivados, que sean amigables con el medio ambiente y económicamente atractivos.

La química verde consiste en el diseño de productos y procesos químicos que disminuyen o suprimen el uso y la generación de sustancias peligrosas. De este modo, la química verde debe ser plausible desde el punto de vista científico, más segura que los procesos convencionales, de bajo costo, y compatible con el desarrollo sostenible (Coronas-Ceresuela, 2013). Entre las propuestas que ofrece la química verde para la producción de colorantes, destaca el remplazo de los métodos de síntesis química por alternativas biotecnológicas. De este modo, las investigaciones actuales en este campo se enfocan a la producción de colorantes mediante métodos de biosíntesis que generen un mínimo impacto ecológico (Yusuf *et al.*, 2017).

El uso de enzimas constituye una estrategia novedosa para la síntesis de índigo. Las enzimas son catalizadores biológicos, es decir, aumentan la velocidad de las reacciones químicas. De este modo, las enzimas permiten que las reacciones energéticamente posibles, pero que transcurren a baja velocidad, sean cinéticamente favorables (Nelson y Cox, 2009). En estas reacciones, las enzimas actúan sobre moléculas llamadas sustratos, que se convierten en moléculas diferentes llamadas productos. Un grupo enzimático de interés biotecnológico para la síntesis de índigo son los citocromo P450 (CYP).

Los CYP constituyen una superfamilia de hemoproteínas encontradas en todos los reinos naturales, cuya característica distintiva es la absorbancia máxima a 450 nm cuando la proteína está unida a monóxido de carbono. Los CYP actúan sobre un rango extenso de sustratos (exógenos y endógenos) exhibiendo actividad monooxigenasa, es decir, catalizando la inserción de un átomo de oxígeno en los sustratos. La reacción más común catalizada por los CYP es la hidroxilación (Werck-Reichhart y Feyereisen, 2000). Los CYP requieren de oxígeno molecular y de dos electrones durante la catálisis. Naturalmente, estos electrones son suministrados por el cofactor nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH).

El NADPH es un cofactor inestable y costoso, por lo que representa un obstáculo para las aplicaciones biotecnológicas de los CYP. En respuesta, Cirino y Alrnold (2003) generaron la variante CYP_{BM3} F87A (EC 1.14.14.1) mediante evolución dirigida. Esta variante utiliza peróxido de hidrógeno como fuente directa de oxígeno y aceptor final de electrones, por lo que permite prescindir del cofactor NADPH y del dominio reductasa. Así, la CYP_{BM3} F87A constituye una herramienta biotecnológica autosuficiente para catalizar la biotransformación de diversos sustratos, tales como ácidos grasos (Cirino y Alrnold, 2003), pesticidas (Sanchez-Sanchez *et al.*, 2012) y estilbenoides (Koyani y Vazquez-Duhalt, 2018). En la Figura 4 se ilustra la estructura tridimensional de la variante CYP_{BM3} F87A. La nomenclatura de la variante indica que la proteína se obtuvo de bacteria Gram positiva *Bacillus megaterium* y que el residuo fenilalanina 87 se reemplazó por alanina. En color rojo el grupo prostético hemo y en azul el residuo aminoacídico 87. La imagen se generó en el software Chimera 1.13.1c. (RBVI, UCSF).

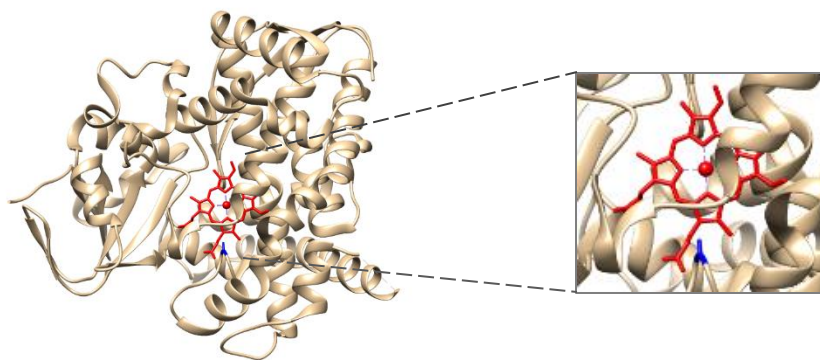


Figura 4. Estructura tridimensional de la variante CYP_{BM3} F87A.

Además de cofactores costosos, otro obstáculo para las aplicaciones biotecnológicas de los CYP es su falta de estabilidad operativa a largo plazo, así como su difícil recuperación y reutilización. La inmovilización enzimática permite superar estos inconvenientes. Las enzimas inmovilizadas son más robustas y resistentes. Asimismo, la heterogeneidad de los sistemas enzimáticos inmovilizados permite una recuperación fácil de la enzima y los productos, la reutilización de la enzima, el funcionamiento continuo de los procesos enzimáticos y una rápida terminación de las reacciones (Homaei *et al.*, 2013).

Entre las tecnologías aplicadas a la inmovilización de enzimas, destaca la nanotecnología por ofrecer matrices con propiedades únicas. En este sentido, las nanopartículas magnéticas representan una matriz con grandes ventajas sobre otro tipo de matrices. En primer lugar, el área superficial aumentada de las nanopartículas permite la inmovilización de cantidades más grandes de enzima. En segundo lugar, la capacidad de dispersar las nanopartículas en el medio de reacción permite un contacto rápido entre la enzima y el sustrato, reduciendo en parte las limitaciones de transferencia de masa. En última instancia, el carácter magnético de las nanopartículas da lugar a una fácil separación y reutilización de la enzima (Rossi *et al.*, 2004; Homaei *et al.*, 2013).

En virtud de lo anterior, en este trabajo se plantea el uso de la variante CYP_{BM3} F87A para sintetizar índigo y tres derivados a partir de indol, 4-bromoindol, 5-metoxiindol y 7-metoxiindol. Además, se describe la inmovilización de la enzima CYP_{BM3} F87A en nanopartículas magnéticas (Fe₃O₄ NPs) recubiertas de dióxido de silicio (SiO₂).

2. ANTECEDENTES

2.1. Síntesis enzimática de índigo

Las propiedades catalíticas de las enzimas han permitido su introducción en diversos productos y procesos biotecnológicos. En estos procesos, las enzimas se utilizan para facilitar transformaciones que no son técnicamente viables por otros medios, o bien, para reemplazar los procesos químicos tradicionales, ya que la catálisis enzimática conlleva procesos más limpios, seguros, y con menos residuos e impacto al medio ambiente (Lobedanz *et al.*, 2016). En este sentido, las enzimas constituyen una herramienta idónea para la síntesis verde de índigo. Más aún si se considera que diversos organismos metabolizan compuestos precursores de este colorante y sus derivados. En algunos mamíferos, por ejemplo, se ha reportado la presencia de estos compuestos en el tracto intestinal, e incluso, en la orina como sulfato de indoxilo (Warzecha, 2007).

El precursor de la síntesis enzimática de índigo es el indol. El indol es un compuesto aromático heterocíclico conformado por un anillo bencénico unido a un anillo pirrólico. En 1886 Adolf von Baeyer aisló por primera vez la molécula de indol y, desde entonces, se convirtió en una de las subunidades estructurales más comunes entre los productos químicos y compuestos de relevancia farmacéutica (Escribano, 2013). Además de los productos sintéticos, el indol está presente naturalmente en flores como el jazmín y los narcisos. Asimismo, el indol es un componente natural del sudor y el aliento humano (Gribble, 2016).

La biotransformación de indol en índigo se reportó por primera vez en 1928, cuando se identificó que la bacteria *Pseudomonas indoloxidans* era capaz de oxidar indol en índigo. En ese momento, se plantearon dos hipótesis para justificar la formación del colorante azul: la producción de una exo-enzima que se difunde en el medio de cultivo y cataliza síntesis de índigo fuera de la bacteria; o bien, la formación intracelular de un producto intermediario entre el indol y el índigo, que se difunde en el medio y es convertido posteriormente a índigo (Gray, 1928). Cuatro décadas después, Oshima *et al.* (1965) identificaron que la enzima indol-3-hidroxilasa de *Pseudomonas indoloxidans* cataliza la transformación de indol en indoxilo, un producto que se oxida fácilmente en índigo. A partir de este hallazgo, se reconoció que las enzimas con actividad oxigenasa pueden catalizar la síntesis de índigo y

colorantes derivados a partir de indol. En la Figura 5 se muestran algunos de los mecanismos propuestos para la síntesis enzimática de índigo.

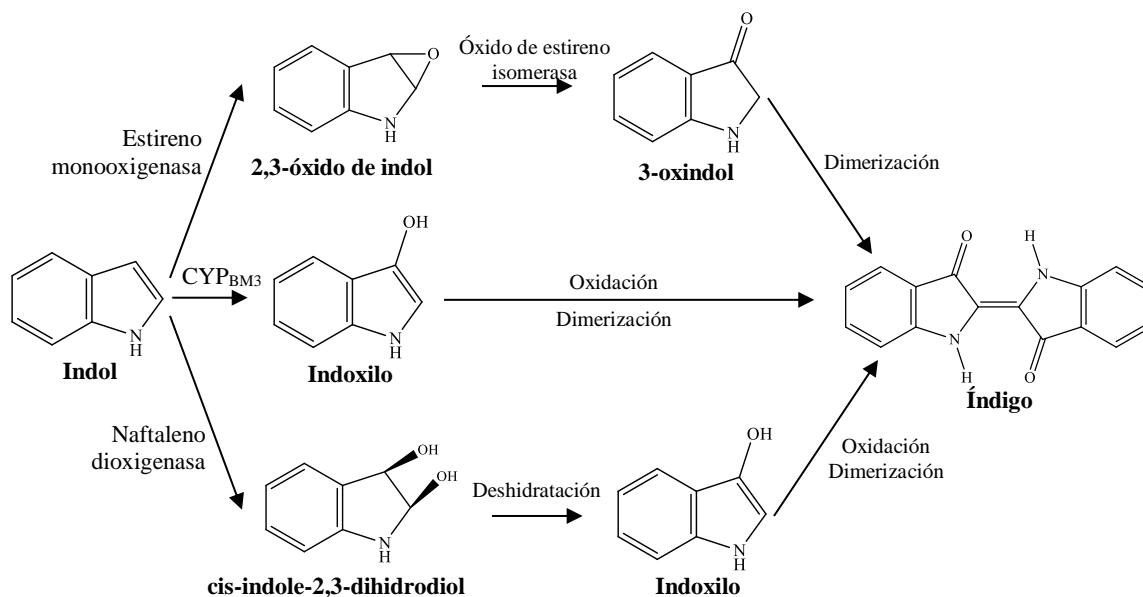


Figura 5. Mecanismos sugeridos para la síntesis enzimática de índigo a partir de indol: estireno monooxigenasa (O'Connor *et al.*, 1997), CYP_{BM3} (Hu *et al.*, 2010), y naftaleno dioxigenasa (Ensley *et al.*, 1983).

Enseguida se describen las enzimas oxigenasas que se han estudiado para catalizar la síntesis enzimática de índigo. De acuerdo al número de átomos de oxígeno que insertan en los sustratos, las oxigenasas se clasifican en monooxigenasas y dioxigenasas. Entre de las enzimas monooxigenasas, los CYP se tratan en un apartado específico.

2.1.1. Monooxigenasas

Las enzimas con actividad monooxigenasa catalizan la inserción de un átomo de oxígeno a los sustratos. Algunas monooxigenasas con especificidad relajada se han usado para catalizar la síntesis enzimática de índigo. Las rutas químicas propuestas para la formación de índigo mediante enzimas monooxigenasas involucran la hidroxilación de indol a indoxilo (3-hidroxiindol), o bien, la monooxigenación de indol a 3-oxindol. Al contacto con el aire del ambiente, estos compuestos se oxidan y dimerizan espontáneamente, resultando en la formación de índigo (Oshima *et al.*, 1965; Mermod *et al.*, 1986; O'Connor *et al.* 1997; McClay *et al.* 2005; Namgung *et al.*, 2019).

La primera monooxigenasa implicada en la síntesis de índigo fue la enzima indol-3-hidroxilasa de *Pseudomonas indoloxidans*. Oshima *et al.* (1965) descubrieron que este microorganismo es capaz de oxidar dos moléculas de indol en dos moléculas de indoxilo, produciendo así una molécula de índigo. Además, se identificó la incorporación de átomos de oxígeno provenientes de oxígeno molecular durante la transformación del indol en indoxilo, lo que confirmó la acción de una enzima con actividad monooxigenasa durante la reacción. Esta enzima se identificó como indol-3-hidroxilasa y se sugirió que requiere de un metal y un grupo sulfhidrilo como cofactores.

En un estudio similar, Mermod *et al.* (1986) encontraron que la enzima xileno oxigenasa de *Pseudomonas putida* también es capaz de hidroxilar indol y producir índigo. Normalmente, esta enzima es responsable del catabolismo oxidativo de compuestos aromáticos como el xileno y el tolueno que son transformados en precursores del ciclo de Krebs y brindan energía a la célula. No obstante, con base en la especificidad relajada de la enzima, el hecho de que la enzima cataliza tanto hidroxilaciones como monooxigenaciones, y la premisa de que el indol (compuesto aromático) es el precursor del índigo, Mermod *et al.* expresaron heterológamente la enzima en *Escherichia coli* K-12 y ensayaron la síntesis de índigo con resultados positivos. La producción estimada de índigo fue de 2.4 mg/L de medio de cultivo Luria-Bertani (LB).

Otra enzima capaz de catalizar la síntesis de índigo es la tolueno-4-monooxigenasa de *Pseudomonas mendocina*. Este microorganismo metaboliza el tolueno como fuente de carbono, en una ruta cuyo primer paso es la hidroxilación del tolueno a *p*-cresol por la acción de dicha enzima. Además del tolueno, se ha demostrado que la enzima puede actuar sobre una gran variedad de sustratos como la acetanilida, el clorobenceno, y el etilbenceno. Con esta información, Yen *et al.* (1991) evaluaron la producción de índigo a partir de indol en células de *Escherichia coli* HB101 transformadas con el grupo de genes que codifican para la tolueno-4-monooxigenasa. El colorante se produjo únicamente en las cepas transformadas, lo que confirmó que esta enzima cataliza la síntesis de índigo. Por lo tanto, Yen *et al.* concluyen que la producción de índigo puede servir como indicador de la presencia del grupo de genes que codifican para la expresión de esta enzima en estudios de biología molecular.

McClay *et al.* (2005) también estudiaron la enzima tolueno-4-monooxigenasa. Los autores realizaron diversas mutaciones a la enzima y evaluaron la síntesis de índigo a partir de indol. La mayoría de las mutantes mostró cambios en la proporción de los productos de oxidación del indol. Además, en algunas mutantes se identificó la formación de productos adicionales. Por ejemplo, la mutante G103L convirtió el 17% del indol agregado en 7-hidroxiindol y el 29% en índigo y otros tres pigmentos relacionados estructuralmente. Por su parte, la doble mutante G103L/A107G convirtió el 47% de indol en 7-hidroxiindol, pero no se detectaron productos coloreados. Rui *et al.* (2004) reportaron una distribución de productos similar al ensayar la transformación de indol con diversas mutantes de la enzima tolueno-2-monooxigenasa de *Burkholderia cepacia* G4. De esta forma, Rui *et al.* señalan que un cambio simple o doble de aminoácidos puede generar variantes enzimáticas, catalíticamente distintas, que hidroxilan el indol en diferentes posiciones regioespecíficas de los anillos de pirrol y benceno.

En otro estudio, O'Connor *et al.* (1997) se basaron en la similitud entre las estructuras químicas del estireno y el indol para evaluar la formación de índigo en microorganismos que expresan la enzima estireno monooxigenasa. Las cepas S12 y CA-3 de *Pseudomonas putida* produjeron índigo en las placas de cultivo cuando el medio se suplementó con indol. El mecanismo propuesto para la síntesis de índigo asume que la enzima estireno monooxigenasa transforma el indol en 2,3-óxido de indol. No obstante, este producto no se transforma fácilmente a índigo, ni a los precursores de éste. En este sentido, O'Connor *et al.* proponen que la enzima óxido de estireno isomerasa cataliza la conversión del 2,3-óxido de indol en su isómero indoxilo. Esta propuesta se confirmó al usar cepas que expresan únicamente actividad estireno monooxigenasa y que son incapaces de producir índigo.

Otro caso donde la síntesis de índigo implica la acción de un sistema multienzimático es el de la enzima flavin monooxigenasa de *Methylophaga sulfidovorans*. Regularmente, cuando se ensaya la síntesis enzimática de índigo a partir de indol, este compuesto es adicionado al medio de cultivo o al medio de reacción. Sin embargo, Choi *et al.* (2003) reportan la producción de índigo en cultivos de *Escherichia coli* DH5 α suplementados con triptófano (y no con indol) que expresan actividad flavin monooxigenasa. La explicación de

este fenómeno radica en la enzima triptofanasa presente en las células de *Escherichia coli*. Esta enzima hidroliza el triptófano en indol, piruvato y amoníaco. De este modo, el indol generado a partir del catabolismo del triptófano es oxidado en indoxilo por la flavin monooxigenasa para producir índigo posteriormente. Los cultivos evaluados produjeron índigo a razón de ~160 mg/L de medio LB suplementado con triptófano.

La enzima indol oxigenasa también se ha usado para catalizar la síntesis de índigo. El indol es una molécula que inhibe el crecimiento bacteriano al afectar diversas vías de señalización. Para hacer frente a la toxicidad inducida por el indol, muchas bacterias han desarrollado sistemas de defensa enzimáticos para convertir el indol en índigo, que no es tóxico para las bacterias. Lin *et al.* (2017) descubrieron que la bacteria *Acinetobacter baumannii* ATCC19606 utiliza un mecanismo novedoso de desintoxicación de indol que es modulado por la proteína IifC que expresa actividad indol oxigenasa. Las constantes catalíticas de IifC para la transformación de indol fueron K_m 0.20 mmol/L y k_{cat} 0.38 min⁻¹. Sadauskas *et al.* (2017) también midieron estas constantes para la IifC de *Acinetobacter* sp. O153, con resultados similares K_m 0.25 mmol/L y k_{cat} 0.11 min⁻¹.

2.1.1.1 Citocromos P450

Los citocromo P450 (CYP) son un grupo de monooxigenasas de interés para la síntesis de índigo. El grupo de investigación del profesor Peter Guengerich fue el primero en describir el uso de CYP para la síntesis enzimática de índigo. Guillam *et al.* (1999) expresaron heterológicamente la enzima CYP 2A6 humana en *Escherichia coli* y observaron la formación de índigo en los cultivos bacterianos. La formación de índigo se observó en ausencia de indol suplementario, pero siempre en presencia de NADPH-P450 reductasa. Además, se identificó que la adición de indol no condujo a un aumento en la producción de índigo. Ante esta observación, Guillam *et al.* sugieren que el medio rico de expresión usado proporciona suficiente indol como sustrato; esto a través de la degradación del triptófano por la enzima triptofanasa que también se expresa en el sistema.

Nakamura *et al.* (2001) evaluaron la síntesis de índigo y derivados usando cinco mutantes de la enzima CYP 2A6 humana: N297Q, L240C, L240C/N297Q, F209T, y N297H.

Las mutantes se expresaron heterológamente en *Escherichia coli* XL10 negativa a triptofanasa (TnaA). La síntesis de los colorantes se ensayó suplementando el medio de cultivo con 1 mM de sustrato y con un sistema generador de NADPH que contenía NADP⁺, glucosa 6-fosfato, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Los colorantes se extrajeron del medio de cultivo (precipitado bacteriano) con N,N-dimetilformamida. En la Figura 6 se muestran los extractos obtenidos con la CYP 2A6 nativa y las cinco mutantes evaluadas. Entre las mutantes, la doble mutante L240C/N297Q catalizó la síntesis de más productos coloreados. Sin embargo, el patrón de síntesis observado no es la suma de los patrones de las mutantes individuales N297Q y L240C. Por otra parte, las mutantes F209T y N297H no produjeron colorante alguno. Estos resultados indican que cambios pequeños en la secuencia del CYP 2A6 producen cambios abruptos en su especificidad catalítica.

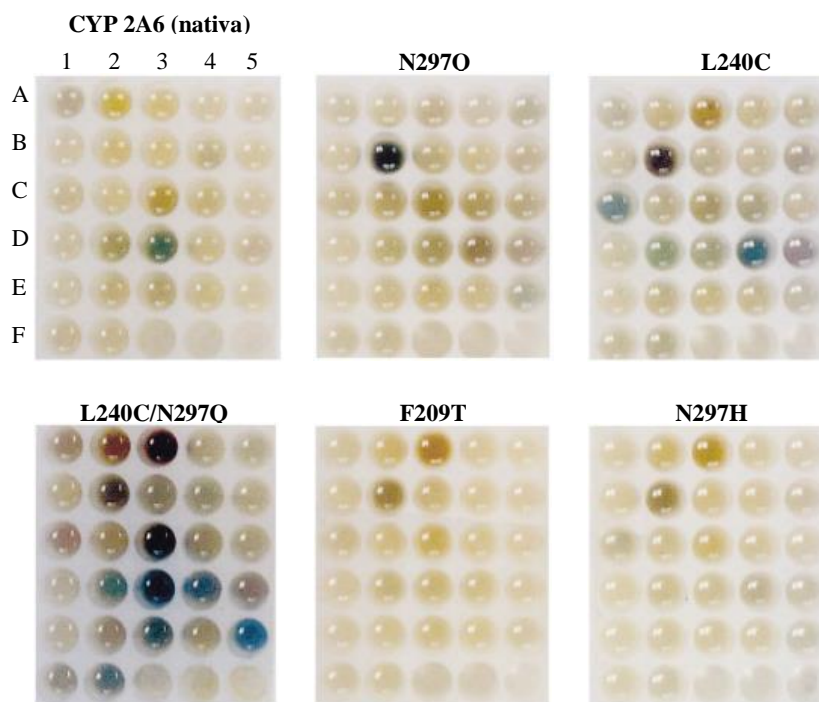


Figura 6. Síntesis enzimática de colorantes catalizada por la CYP 2A6 y cinco mutantes a partir de indoles sustituidos. Los sustratos usados fueron: (1A) indol, (2A) 7-nitroindol, (3A) 6-nitroindol, (4A) indole-5-ácido carboxílico, (5A) indol-4-ácido carboxílico metil éster, (1B) 5-fluoroindol, (2B) 5-nitroindol, (3B) indol-5-ácido carboxílico metil éster, (4B) 4-metoxiindole, (5B) 5-cianoindol, (1C) 5-bromoindol, (2C) 7-indol, (3C) 5-aminoindol, (4C) 4-nitroindol, (5C) 4-indol acetato de etilo, (1D) 5-cloroindol, (2D) 5-metoxiindol, (3D) 5-metil-indol, (4D) 6-cloroindol, (5D) 6-fluoroindol, (1E) 4-cloroindol, (2E) 7-cloroindol, (3E) 5,6-dimetoxiindol, (4E) 2-metil-indol, (5E) 4-metil-indol, (1F) 6-metil-indol, y (2F) 7-metil-indol. [Figura modificada de Nakamura *et al.*, 2001]

Con base en los resultados anteriores, Wu *et al.* (2005) generaron mediante mutagénesis dirigida la mutante CYP 2A6 N297Q/I300V. Esta nueva doble mutante demostró una capacidad ampliada para oxidar indoles sustituidos con grupos voluminosos, los cuales no son sustratos para la enzima CYP 2A6 nativa ni para la mutante L240C/N297Q. La nueva mutante fue capaz de oxidar los sustratos: indol, 4-cloroindol, 4-benciloxi-indol, y 5-benciloxi-indol. Las reacciones fueron dependientes de NADPH y resultaron en la formación de productos coloreados. Las constantes catalíticas para la transformación del indol fueron K_m 0.196 mM y k_{cat} 18 min⁻¹.

Los CYP de origen bacteriano también se han usado para catalizar la síntesis enzimática de índigo a partir de indol. Lu y Mei (2007) co-expresaron la CYP de *Bacillus megaterium* 3 (BM3) y la enzima glucosa deshidrogenasa en células de *Escherichia coli* BL21; esto con la finalidad de usar la enzima glucosa deshidrogenasa como fuente de NADPH, ya que esta enzima oxida la glucosa en glucolactona produciendo dicho cofactor. La síntesis de índigo se realizó agregando indol y glucosa al medio de cultivo después de inducir la expresión. La cantidad de índigo producida fue de 760.6 mg/L de medio.

Hu, *et al.* (2010) evaluaron la síntesis de índigo con la mutante cuaternaria CYP_{BM3} F87V/L188Q/A74G/E435T. Los ensayos de actividad catalítica se realizaron con la enzima libre purificada y adicionando NADPH comercial al medio de reacción. Las constantes catalíticas para la transformación de indol fueron: K_m 0.8 mmol y k_{cat} 1.6 s⁻¹. En otro estudio, Namgung *et al.* (2019) ensayaron la formación de colorantes derivados del índigo con la enzima CYP 102G4 de *Streptomyces avermitilis* expresada heterológicamente en *Escherichia coli* BL21. Los sustratos empleados fueron indoles mono-sustituidos, que se agregaron directamente al medio de cultivo. El análisis espectrofotométrico de los productos reveló la formación de índigos di-sustituidos. Cuando se usó 7-cloroíndigo como sustrato, los cultivos con actividad CYP 102G4 produjeron 7,7'-dicloroíndigo a razón de 15.4 mg/L de medio.

2.1.2. Dioxigenasas

Las enzimas con actividad dioxigenasa catalizan la inserción de dos átomos de oxígeno a los sustratos. De forma similar a las monooxigenasas, algunas dioxigenasas con

especificidad relajada se han usado para catalizar la síntesis de índigo. El producto intermediario de la actividad dioxigenasa en la transformación del indol es el cis-indole-2,3-dihidrodiol que se deshidrata espontáneamente y resulta en la formación de indoxilo que se oxida y dimeriza espontáneamente en índigo. El modelo más estudiado para la dioxigenación del indol es el de la enzima naftaleno dioxigenasa (dependiente de NADH) de *Pseudomonas putida* (Ensley *et al.*, 1983; Kim *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2013).

Ensley *et al.* (1983) expresaron heterológamente la enzima naftaleno dioxigenasa en células de *Escherichia coli* HB101 y ensayaron por primera vez la síntesis de índigo usando este sistema. La producción del colorante se incrementó con la adición de triptófano o indol, debido a la expresión de actividad triptofanasa. En un estudio similar, Kim *et al.* (2003) indujeron la expresión de la enzima naftaleno oxigenasa en *Escherichia coli* K-12 y ensayaron la transformación bacteriana de indol y derivados halogenados de éste. Los autores señalan que la actividad triptofanasa intrínseca de *Escherichia coli* K-12, da lugar a la formación basal de índigo y conduce a un juicio ambiguo del colorante formado por los derivados del indol. Para superar este problema, Kim *et al.* usaron una mutante de *Escherichia coli* K-12 que carece de actividad triptofanasa. Los indoles halogenados que se ensayaron dieron paso a la formación de productos coloreados cuya estructura no fue descrita, pero se sugirió que corresponden a derivados del índigo. Zhang *et al.* (2013) también evaluaron síntesis enzimática de índigo catalizada por actividad naftaleno dioxigenasa. La producción de índigo se estimó en 205 mg/L de medio de cultivo.

Otra dioxigenasa capaz de catalizar la síntesis de índigo es la enzima bifenilo dioxigenasa. Qu *et al.* (2013) expresaron heterológamente esta enzima en *Escherichia coli* BL21 (DE3) y evaluaron la transformación de indol. La producción del colorante fue de 44 mg/L de medio de cultivo. El mecanismo de formación del índigo implica la deshidratación espontánea del cis-indole-2,3-dihidrodiol, de forma análoga a lo que ocurre en el sistema de la naftaleno dioxigenasa. No obstante, Qu *et al.* proponen que la enzima bifenilo-2,3-dihidrodiol-2,3-deshidrogenasa, también expresada en el sistema, puede contribuir a la conversión del cis-indole-2,3-dihidrodiol en indoxilo, aumentando así la producción de índigo.

3. JUSTIFICACIÓN

El azul índigo es uno de los colorantes más usados en la industria textil (Ensley *et al.*, 1983; Mermoud *et al.*, 1986; Rui *et al.*, 2004). Desde la tinción de vestimentas en el antiguo Egipto hasta los pantalones de mezclilla actuales, el índigo ha servido para teñir textiles durante más de 3000 años. La mezclilla es una tela de algodón tejida con un patrón de rayas en diagonal y teñida de índigo que, por más de un siglo, se ha usado para la confección de pantalones y overoles. A través de los años, Levi Strauss & Co. (1853) ha desarrollado un papel fundamental en la industria de la mezclilla. En 1873, esta empresa patentó sus famosos pantalones con refuerzos de cobre en los bolsillos para brindar mayor resistencia y durabilidad. La popularidad de estos pantalones contribuyó de manera sustancial a elevar la demanda de índigo que comenzó a venderse bajo el nombre de Vat Blue 1 (Paul, 2017).

A diferencia de la mayoría de los colorantes, el índigo no se une covalentemente al algodón, sino que se adsorbe en las fibras. El índigo adsorbido es resistente a los detergentes que se usan para el lavado; sin embargo, se desprende tras abrasión constante, lo que brinda el aspecto desgastado que impera en los pantalones de mezclilla actuales. Esta combinación única de robustez ante los detergentes y la susceptibilidad a la abrasión hace que el índigo sea insustituible para teñir mezclilla. En este sentido, la producción de este colorante se estima en 50000 toneladas anuales, de las cuales el 95% se usa para teñir más de 4000 millones de prendas de mezclilla fabricadas anualmente (Hsu *et al.*, 2018). El porcentaje restante, se emplea principalmente como aditivo alimenticio, o bien, en la industria del plástico, donde curiosamente se emplea para teñir suturas médicas de poliéster (Paul, 2017).

Los colorantes derivados del índigo también poseen valor comercial. El tioíndigo, por ejemplo, se usa para teñir tejidos de poliéster. Por su parte, los índigos sustituidos con halógenos resaltan en la industria textil por su color brillante y su resistencia a los agentes blanqueadores (Fort y Lloyd, 2016). Además, el índigo y sus derivados se han estudiado por sus propiedades anticancerígenas (Kapadia *et al.*, 1998; Hoessel *et al.*, 1999), antioxidantes (Farias-Silva *et al.*, 2007), e incluso, por su uso potencial para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Leclerc *et al.*, 2001). Estas propiedades están directamente relacionadas con la inhibición de enzimas quinasas involucradas en estos padecimientos. En este sentido, los

colorantes derivados del índigo poseen un gran potencial terapéutico en el tratamiento de padecimientos crónicos como la enfermedad de Alzheimer, ciertas formas de cáncer y la hipersensibilidad retardada (Dua *et al.*, 2014). Además, recientemente se ha reportado la actividad antimicrobiana de los derivados cloro-sustituidos del índigo (Namgung *et al.*, 2019). Por otra parte, el índigo y algunos de sus derivados son semiconductores orgánicos ambipolares cuando se depositan como películas delgadas por evaporación al vacío. Esto sugiere que el índigo y sus derivados pueden jugar un papel importante en el desarrollo futuro de dispositivos electrónicos sustentables (Irimia-Vladu *et al.*, 2012).

Al día de hoy, las reacciones de síntesis química son la principal fuente de índigo y sus derivados en el mundo. Desafortunadamente, estas reacciones se han convertido en fuente de preocupación ambiental, debido al uso de recursos petroquímicos, catalizadores inorgánicos y agentes reductores que contaminan el ambiente (Namgung *et al.*, 2019). No obstante, la síntesis química de índigo y sus derivados no sólo representa riesgos para el ambiente, sino que también repercute negativamente en la salud de los trabajadores, debido al uso de materiales tóxicos como la anilina, el nitrobenzeno y las sales de metales pesados. Considerando que la preocupación por la protección del medio ambiente ha cobrado impulso en los últimos años, el interés radica en desarrollar métodos de química verde para la síntesis del índigo. Como resultado, la síntesis enzimática de índigo y sus derivados es preferible sobre la síntesis química (Dua *et al.*, 2014).

Por consiguiente, en este trabajo se plantea el uso de la enzima monooxigenasa CYP_{BM3} F87A para catalizar la síntesis enzimática de índigo y tres derivados di-sustituidos. Los sustratos ensayados fueron: indol, 4-bromoindol, 5-metoxiindol y 7-metoxiindol. La actividad catalítica de la CYP_{BM3} F87A en la transformación de estos sustratos se caracterizó mediante las constantes catalíticas k_{cat} y K_m . Los productos de reacción se caracterizaron mediante técnicas espectrométricas para confirmar su estructura química. Adicionalmente, en este trabajo se describe la inmovilización de la enzima CYP_{BM3} F87A en nanopartículas magnéticas (Fe₃O₄ NPs) recubiertas de dióxido de silicio (SiO₂). Las nanopartículas funcionalizadas se usaron para ensayar la síntesis enzimática de índigo como alternativa a la síntesis química convencional.

4. HIPÓTESIS

La variante del citocromo P450, CYP_{BM3} F87A, es una enzima capaz de catalizar la síntesis de índigo y otros colorantes de interés industrial derivados del índigo.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

- Evaluar la actividad catalítica de la variante CYP_{BM3} F87A en la síntesis enzimática de índigo, 4,4'-dibromoíndigo, 5,5'-dimetoxiíndigo y 7,7'-dimetoxiíndigo.

5.2. Objetivos específicos

- Purificar y caracterizar la enzima CYP_{BM3} F87A expresada heterológamente en *Escherichia Coli* DH5 α .
- Estudiar la actividad catalítica de la CYP_{BM3} F87A en la transformación de indol, 4-bromoindol, 5-metoxiindol y 7-metoxiindol.
- Purificar y caracterizar los colorantes obtenidos.
- Inmovilizar la CYP_{BM3} F87A en nanopartículas magnéticas recubiertas de dióxido de silicio.
- Estudiar la actividad catalítica de las nanopartículas funcionalizadas con CYP_{BM3} F87A.

6. METODOLOGÍA

6.1. Materiales

El indol, 4-bromoindol, 5-metoxiindol, 7-metoxiindol, clorhidrato de ácido δ -aminolevulínico (δ -ALA), clorhidrato de tiamina, albúmina sérica bovina (BSA), imidazol, cloruro de hierro (II) hexahidratado (FeCl₂·6H₂O), cloruro de calcio dihidratado (CaCl₂·2H₂O), (3-aminopropil) trimetoxi-silano (APTMS), tetraetoxisilano (TEOS), bromuro de hexadeciltrimetilamonio, hidróxido de amonio, 5-metoxi-2-nitrobenzaldehído, 3-metoxi-2-nitrobenzaldehído, 2,6-dimetoxifenol (DMP), y N,N-dimetilformamida (DMF)

se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE UU). La Bacto™ triptona, Bacto™ peptona y el extracto de levadura se adquirieron de Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, EE UU). El cloruro de sodio (NaCl), fosfato monopotásico (KH₂PO₄), fosfato dipotásico (K₂HPO₄), fosfato monosódico (NaH₂PO₄), ácido bórico (H₃BO₃), ácido clorhídrico (HCl), éter etílico, acetona, metanol, etanol, acetona, hexanos y glicerol se adquirieron de Fermont (Monterrey, NL, México). El cloruro de magnesio (MgCl₂), cloruro de zinc tetrahidratado (ZnCl₂·4H₂O), cloruro de cobalto (II) hexahidratado (CoCl₂·6H₂O), cloruro de cobre (II) (CuCl₂), hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de potasio (KOH) y molibdato de sodio dihidratado (Na₂MoO₄·2H₂O) se adquirieron de J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, EE UU). El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se adquirió de Fagalab (Mocorito, SL, México). La ampicilina sal sódica se adquirió de IBI Scientific (Peosta, IA, EE UU). El isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) se adquirió de GoldBio (St. Louis, MO, EE UU). El cóctel inhibidor de proteasas se adquirió de Hoffmann-La Roche (Basilea, Suiza).

Todos las soluciones se prepararon con agua Milli-Q (18.2 MΩ·cm), a menos que se especifique de otra forma. El pH de las soluciones se ajustó con un potenciómetro Jenway 3520 usando soluciones stock de HCl 10% v/v, o bien, de NaOH 2 M. El material y los medios para cultivo se esterilizaron por 25 min a 121°C y 15 psi. Las mediciones espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer series 836 ET con celdas de cuarzo Hellma Analytics 114B-QS de 1 mL.

6.2. Expresión de la CYP_{BM3} F87A

La CYP_{BM3} F87A se expresó en células de *Escherichia coli* DH5α transformadas con el vector de expresión inducible pCWori(+). La expresión se realizó siguiendo el método descrito por Cirino y Arnold (2002) con algunas modificaciones. Se preparó un preinóculo de *Escherichia coli* DH5α en 5 mL de medio LB con 0.2 µg/mL de ampicilina. Cada litro de medio LB contenía 10 g de Bacto™ triptona, 5 g de extracto de levadura, y 10 g de NaCl. El preinóculo se creció por 12 h a 37°C y 180 rpm.

A partir del preinóculo, se sembraron cinco inóculos en matraces Erlenmeyer de 250 mL. En cada matraz se inocularon 50 mL de medio TB con 500 μ L de preinóculo. Cada litro de medio TB contenía 6 g de Bacto™ triptona, 6 g de Bacto™ peptona, 24 g de extracto de levadura, 4 mL de glicerol, y 100 mL de buffer de fosfatos de potasio (KH_2PO_4 0.17 M y K_2HPO_4 0.72 M, pH 7.4). Los inóculos se suplementaron con 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina, clorohidrato de tiamina 0.5 mM y 100 μL de elementos traza. Los elementos traza se prepararon según lo reportaron Joo *et al.* (1999): en 100 mL de HCl 10% v/v se disolvieron 0.05 g de MgCl_2 , 3 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g de $\text{ZnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g de CuCl_2 , y 0.02 g de H_3BO_3 .

Los inóculos se crecieron por 22 h 30°C y 100 rpm. Posteriormente, se agregó IPTG 0.5 mM y δ -ALA 1 mM para inducir la expresión de la CYP_{BM3} F87A. La inducción transcurrió por 44 h a 30°C y 100 rpm. Después, los inóculos se centrifugaron por 45 min a 4°C y 3500 rpm. Se descartaron los sobrenadantes, y los precipitados bacterianos se guardaron a -20°C hasta su purificación.

6.3. Purificación de la CYP_{BM3} F87A

La CYP_{BM3} F87A se purificó mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC). Para ello, se pesaron los precipitados bacterianos y por cada gramo se añadieron 5 mL de solución de lisis (imidazol 20 mM, NaH_2PO_4 50 mM, y NaCl 300 mM, pH 8) y 100 μL de inhibidor de proteasas. La suspensión resultante se sonicó por ciclos para lisar las células. Los ciclos de sonicado se realizaron a 360 W en un baño de hielo. Cada ciclo consistió en 10 s de pulso por 10 s de descanso durante 2 min. En total, se aplicaron ocho ciclos. El homogenizado resultante se centrifugó por 45 min a 4°C y 3500 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se filtró con una membrana de celulosa de 0.22 μm .

El homogenizado filtrado se cargó en el equipo ÄKTAprime plus Protein Purification System (GE Healthcare). Se usó una columna HisTrap™ FF (GE Healthcare) de 5 mL precargada con níquel y se corrió el programa de purificación mediante etiqueta de histidinas preestablecido en equipo. En líneas generales, el programa consiste en un gradiente de concentración de imidazol de 20 a 500 Mm; que se genera a partir de las soluciones de lisis

y de elución (imidazol 500 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, y NaCl 300 mM, pH 8.2). Se eluyó con un flujo de 5 mL/min y se colectaron fracciones de 2.5 mL. Las fracciones coloreadas se concentraron mediante ultrafiltración Amicon® a través de una membrana de 30 kDa, hasta reducir el volumen a ~3 mL. El proceso de ultrafiltración se realizó a 20 psi en un baño de hielo. La solución de enzima concentrada se dializó contra 2 L de buffer de fosfatos de potasio 50 mM pH 8 por 12 h a 4°C. La solución stock de CYP_{BM3} F87A se guardó en alícuotas de 200 µL a -20°C con glicerol 10% v/v.

6.4. SDS-PAGE y cuantificación de la CYP_{BM3} F87A

La pureza de la CYP_{BM3} F87A se evaluó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). En este sentido, se preparó un gel de acrilamida/bisacrilamida al 12% y se cargó una dilución 1:10 de la solución stock de CYP_{BM3} F87A previamente desnaturalizada. El gel se corrió por ~1 h a 200 V, y posteriormente, se tiñó con InstantBlue™ Coomassie Protein Stain. Como marcador de peso molecular se usó Bio-Rad® Precision Plus Protein Standard.

La CYP_{BM3} F87A se cuantificó mediante el método de Bradford (1976) con una curva de calibración con estándar de BSA. De acuerdo con esto, se preparó un conjunto de diluciones de BSA con concentraciones de 0 a 10 µg/mL. En cada ensayo se mezclaron 800 µL de solución estándar de BSA con 200 µL de reactivo Bio-Rad® Bradford Protein Assay. Las diluciones se homogeneizaron con agitador vórtex, se incubaron por 5 min a 25°C y se midieron a 595 nm en un espectrofotómetro UV-Vis. Para obtener la curva de calibración, las mediciones de absorbancia se graficaron en función de la concentración de proteína en cada ensayo. La curva se generó en el software Origin Pro 8 (OriginLab Corporation) con una regresión lineal por mínimos cuadrados.

Para cuantificar la concentración de la muestra, se mezclaron 5 µL de una dilución 1:10 de la solución stock de CYP_{BM3} F87A con 795 µL de buffer de fosfatos de potasio 50 mM pH 8 y se adicionaron 200 µL de reactivo Bio-Rad® Bradford Protein Assay. La mezcla se homogenizó con agitador vórtex, se incubó por 5 min a 25°C y se midió la absorbancia a

595 nm. La cantidad de CYP_{BM3} F87A en la muestra se calculó a partir de la curva de calibración con estándar de BSA.

6.5. Síntesis enzimática de colorantes

La síntesis enzimática de colorantes derivados del índigo se ensayó con cuatro sustratos: indol, 4-bromoindol, 5-metoxiindol y 7-metoxiindol. El indol se disolvió en agua Milli-Q y los tres sustratos restantes se disolvieron en DMF. Los ensayos se realizaron en 1 mL de mezcla de reacción conteniendo 4.5 nmol de CYP_{BM3} F87A (10 μ L), 0.5 mM de sustrato (100 μ L), y 10 mM de peróxido de hidrógeno (5 μ L). Como medio de reacción se usó buffer de fosfatos de potasio 50 mM pH 8 (885 μ L). A los 5 min de iniciada la reacción, los ensayos se midieron en un espectrofotómetro UV-Vis en el rango de 200 a 800 nm. De este modo, se identificó el valor máximo de absorbancia en el espectro visible en la transformación de cada sustrato.

La cinética enzimática de la CYP_{BM3} F87A en la transformación de los indoles se determinó variando la concentración de sustrato hasta la saturación. Los ensayos se realizaron en 1 mL de mezcla de reacción con 4.5 nmol de CYP_{BM3} F87A (10 μ L), 0 a 0.5 mM de sustrato (100 μ L), y 10 mM de peróxido de hidrógeno (5 μ L). Como medio de reacción se usó buffer de fosfatos de potasio 50 mM pH 8 (885 μ L). Los ensayos se midieron espectrofotométricamente desde el inicio de la reacción por 4 min a 670 nm (indol), 605 nm (4-bromoindol), 630 nm (5-metoxiindol), y 635 nm (7-metoxiindol). La curva de absorbancia contra tiempo se graficó en Arithmetic (UV WinLabTM) y se calculó la pendiente de la curva ($\Delta A/\text{min}$).

Posteriormente, las constantes catalíticas K_m y k_{cat} se calcularon en el software CurveExpert Professional (Hyams Development) a partir de los valores de $\Delta A/\text{min}$ obtenidos para cada concentración de sustrato ensayada. Se usó el modelo matemático de Hill para cinética enzimática. Los coeficientes de extinción para calcular la cinética se obtuvieron de la literatura (Wu *et al.*, 2005; De Melo *et al.*, 2006), o bien, se calcularon como se detalla en el Anexo 1.

6.6. Extracción y purificación de los colorantes

Los colorantes se extrajeron de la mezcla de reacción mediante extracción líquido-líquido. Para ello, los colorantes se sintetizaron en 10 mL de volumen de reacción conteniendo 45 nmol de CYP_{BM3} F87A (100 μ L), 5 mM de sustrato (1000 μ L), y 100 mM de peróxido de hidrógeno (50 μ L). Como medio de reacción se usó buffer de fosfatos de potasio 50 mM pH 8 (8850 μ L). Los ensayos se incubaron por 30 min a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Posteriormente, la mezcla de reacción se cargó en un embudo de separación de 125 mL, se agregaron \sim 20 mL de NaCl 1 M, y se homogenizó la mezcla. Enseguida se agregaron \sim 50 mL de éter etílico y se homogenizó la mezcla nuevamente. El embudo de separación se dejó en reposo hasta la separación de las fases. Se descartó la fase acuosa y se recuperó la fase orgánica coloreada. El exceso de éter etílico se evaporó con flujo de nitrógeno hasta reducir el volumen a \sim 2 mL.

Los colorantes se purificaron por medio de cromatografía en capa fina. Para ello, los colorantes se cargaron en placas de gel de sílice como una banda continua. Las placas se eluyeron con una mezcla acidificada de hexanos y éter etílico (1:1 v/v), y se dejaron secar. La banda coloreada se marcó con lápiz y se raspó con espátula. El gel de sílice se colectó en tubos Eppendorff, se añadió 1 mL de metanol y se homogenizó con agitador vórtex. Los tubos se centrifugaron por 5 min a 12000 rpm. Se recuperó el sobrenadante coloreado y se descartó el precipitado de gel de sílice. Los colorantes purificados se guardaron a 4°C protegidos de la luz, hasta su caracterización.

6.7. Caracterización de los colorantes

Los colorantes sintetizados se caracterizaron mediante cromatografía en capa fina, espectrofotometría UV-Vis y espectrometría de masas. Para la caracterización cromatográfica, los colorantes se cargaron en una misma placa de gel de sílice como puntos definidos. La placa se eluyó con una mezcla acidificada de hexanos y éter etílico (1:1 v/v), se dejó secar, y se analizó bajo luz ultravioleta (254 nm). El factor de retención R_f de cada colorante se calculó a partir de la ecuación 1, donde d_m es la distancia recorrida por la

muestra desde el punto de aplicación y d_e es la distancia recorrida por el eluyente (fase móvil).

$$R_f = \frac{d_m}{d_e} \quad \text{Ec. 1}$$

Los colorantes también se caracterizaron mediante su perfil de absorbancia en DMF. En este sentido, se preparó una dilución 1:20 de cada colorante en DMF y se midió su absorbancia un espectrofotómetro UV-Vis en el rango de 350 a 750 nm. De este modo, se identificó la longitud de onda de absorbancia máxima para cada colorante. Adicionalmente, la estructura química de los colorantes se caracterizó por medio de espectrometría de masas con ionización química a presión atmosférica (APCI) en modo ion positivo (M+H)⁺. El análisis de masas se realizó en la *Molecular Mass Spectrometry Facility* de la Universidad de California en San Diego.

6.8. Síntesis de las nanopartículas magnéticas

Las nanopartículas magnéticas (Fe₃O₄ NPs) se sintetizaron de acuerdo al método descrito por Tada *et al.* (2003). Se prepararon 25 mL de solución 0.1 M de FeCl₂·6H₂O en agua Milli-Q y se ajustó el pH a 7.8 agregando la cantidad necesaria de KOH 1 M. Cuando el color de la solución cambió a verde oscuro, se agregaron 250 µL de H₂O₂ 3 wt% gota a gota y la solución se agitó vigorosamente por 5 min. Se observó la formación de un precipitado color negro. El precipitado (Fe₃O₄ NPs) se colectó mediante decantación magnética y se lavó con 20 mL de agua Milli-Q (×3) y 10 mL de acetona (×1). Las Fe₃O₄ NPs se secaron en aire a temperatura ambiente.

6.9. Funcionalización de las nanopartículas magnéticas

Las Fe₃O₄ NPs se funcionalizaron en tres pasos: funcionalización con dióxido de silicio (SiO₂), funcionalización con grupos amino (NH₂), y funcionalización con CYP_{BM3} F87A. En la Figura 7 se ilustra esquemáticamente el procedimiento realizado.

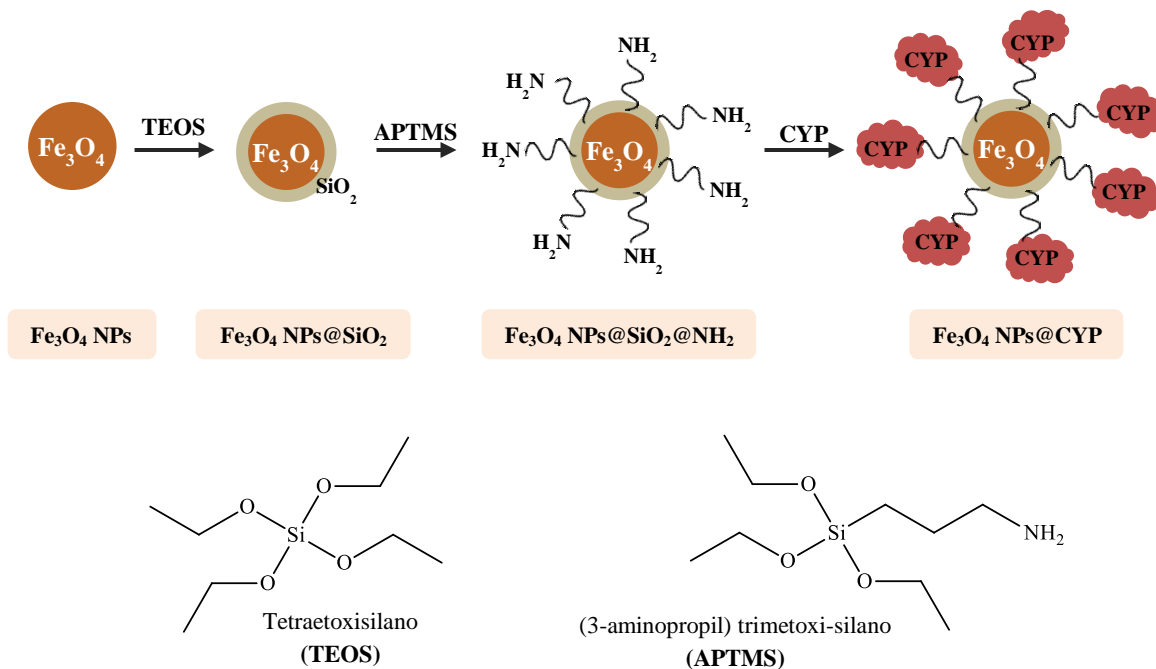


Figura 7. Funcionalización de las nanopartículas magnéticas

6.9.1. Funcionalización con dióxido de silicio

Las Fe₃O₄ NPs se funcionalizaron con SiO₂ de acuerdo al método descrito por Sengar *et al.* (2018) con algunas modificaciones. Se dispersaron 75 mg de Fe₃O₄ NPs en 50 mL de etanol al 70% v/v mediante sonicación a 500 W por 30 min. Se agregó 1 mL de hidróxido de amonio 28% w/v. Enseguida se agregaron 12 µL de tetraetoxisilano gota a gota. La dispersión se agitó vigorosamente por 6 h. Posteriormente, las nanopartículas se colectaron mediante decantación magnética y se lavaron con 20 mL de agua Milli-Q (×2) y 20 mL de etanol al 70% v/v. Las nanopartículas se secaron en aire a temperatura ambiente.

Para optimizar la funcionalización, las nanopartículas se redispersaron en 140 mL de etanol al 70% v/v conteniendo 0.15 g de bromuro de hexadeciltrimetilamonio y 1 mL de hidróxido de amonio 28% w/v. La dispersión se agitó vigorosamente por 30 min. Después, se agregaron 80 µL de tetraetoxisilano gota a gota. La dispersión se agitó vigorosamente por 8 h. Las nanopartículas se colectaron mediante decantación magnética y se lavaron con 20 mL de agua Milli-Q (×2) y 20 mL de etanol al 70% v/v. Las nanopartículas funcionalizadas (Fe₃O₄ NPs@SiO₂) se secaron en aire a 80°C por 8 h.

6.9.2. Funcionalización con grupos amino

Las Fe₃O₄ NPs@SiO₂ se funcionalizaron con grupos amino de acuerdo al método descrito por Rossi *et al.* (2004) con algunas modificaciones. Se dispersaron 15 mg de nanopartículas en 50 mL de etanol al 70% v/v mediante sonicación a 500 W por 30 min. Se agregaron 70 µL de (3-aminopropil) trimetoxi-silano gota a gota. La dispersión se agitó vigorosamente por 12 h. Posteriormente, las nanopartículas se colectaron mediante decantación magnética y se lavaron con 20 mL de etanol al 70% v/v (×2). Las nanopartículas funcionalizadas (Fe₃O₄ NPs@SiO₂@NH₂) se secaron en aire a temperatura ambiente.

6.9.3. Funcionalización con CYP_{BM3} F87A

La CYP_{BM3} F87A se inmovilizó covalentemente en las Fe₃O₄ NPs@SiO₂@NH₂ de acuerdo al método descrito por Rossi *et al.* (2004) con algunas modificaciones. Se dispersaron 8 mg de nanopartículas en 8 mL de buffer de fosfatos de potasio 50 mM pH 6 con glutaraldehído 10% v/v. La dispersión se agitó vigorosamente por 1 h. Las nanopartículas se colectaron mediante decantación magnética, se lavaron con 5 mL de agua Milli-Q (×4) y se redispersaron en 8 mL de buffer de fosfatos de potasio 50 mM pH 6. Posteriormente, se prepararon 6 mL de solución de CYP_{BM3} F87A (1 mg/mL) en buffer de fosfatos de potasio 50 mM pH 6. La solución de enzima se agregó a la dispersión de nanopartículas. La mezcla de reacción se agitó suavemente por 12 h a 4°C. Las nanopartículas se colectaron mediante decantación magnética y se lavaron con 5 mL de buffer de fosfatos de potasio 50 mM pH 6 (×4). Finalmente, las nanopartículas funcionalizadas con enzima (Fe₃O₄ NPs@CYP) se resuspendieron en 8 mL de buffer de fosfatos de potasio 50 mM pH 8 y se guardaron a 4°C.

6.10. Caracterización de las nanopartículas magnéticas

El diámetro hidrodinámico (*Z-average diameter*) y potencial zeta (*Z-potential*) de las nanopartículas se caracterizó mediante dispersión dinámica de luz (DLS). Para preparar las muestras, se dispersó 1 mg de nanopartículas en 1 mL de agua Milli-Q, se preparó una dilución 1:100 en agua Milli-Q y se sonicó por 30 min a 80 W. Las muestras se cargaron en celdas capilares plegadas DTS1070 de 1 mL y se midieron en el equipo Zetasizer Nanoseries (Nano-ZS, Malvern Instruments). En las mediciones se consideró el índice de refracción $n =$

2.98 y coeficiente de absorción 0.32 del óxido de hierro (II, III) Fe_3O_4 a 25°C . Todas las mediciones se realizaron por triplicado y se calculó la media aritmética.

La morfología y tamaño de las nanopartículas se caracterizó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Para preparar las muestras, se dispersó 1 mg de nanopartículas en 1 mL de agua Milli-Q, se preparó una dilución 1:200 en agua Milli-Q y se sonicó por 30 min a 80 W. Las muestras se depositaron en rejillas de *lacey carbon* y se caracterizaron en el microscopio JEM-2100F (JEOL) a 200 kV. Las imágenes se adquirieron digitalmente usando el software DigitalMicrograph 3.7.4 (Gatan). Adicionalmente, la estructura cristalina de las nanopartículas se caracterizó mediante difracción de rayos X (XRD) en el difractor AERIS Cu K- α (Malvern PANalytical). El área superficial de las nanopartículas se determinó utilizando el método de Brunauer-Emmett-Teller (BET), en el equipo Micromeritics TriStar II 320 (Micromeritics Instrument Ltd.).

La actividad catalítica de las nanopartículas se caracterizó espectrofotométricamente. Los ensayos se realizaron en 1 mL de mezcla de reacción con 500 μL de Fe_3O_4 NPs@CYP, 0 a 0.5 mM de indol (100 μL), y 10 mM de peróxido de hidrógeno (5 μL). Como medio de reacción se usó buffer de fosfatos de potasio 50 mM pH 8 (395 μL). Los ensayos se realizaron en tubos Eppendorff. Cada ensayo se incubó por 4 min a temperatura ambiente y protegido de la luz. Inmediatamente después, los ensayos se centrifugaron a 12000 rpm por ~ 5 s y se midieron en un espectrofotómetro UV-Vis a 670 nm. El cambio absorbancia en el tiempo ($\Delta A/\text{min}$) se calculó a partir del cociente entre el valor de absorbancia medido y los minutos que se incubaron los ensayos. Para determinar la cinética de esta transformación, la cantidad de CYP_{BM3} F87A inmovilizada se calculó asumiendo la misma actividad específica que para la enzima libre (Anexo 2). Las constantes catalíticas K_m y k_{cat} se calcularon en el software CurveExpert Professional (Hyams Development) a partir de los valores de $\Delta A/\text{min}$ obtenidos para cada concentración de sustrato ensayada. Se usó el modelo matemático de Hill para cinética enzimática.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Expresión y purificación de la CYP_{BM3} F87A

La variante CYP_{BM3} F87A corresponde a los primeros 463 residuos de aminoácidos que constituyen el dominio hemo de la enzima nativa CYP_{BM3} más 6 residuos correspondientes a una etiqueta de 6 histidinas al final de la cadena. De este modo, la variante CYP_{BM3} F87A es una proteína de 469 residuos de aminoácidos (sin incluir la metionina inicial, que se considera como el residuo cero) carente del dominio NADPH reductasa (Arnold y Cirino, 2008). La expresión de la CYP_{BM3} F87A se realizó en células de *Escherichia coli* transformadas con el vector de expresión pCWori(+) inducible con IPTG. Este vector está bajo el control del doble promotor Ptac y contiene una región que codifica para resistencia a ampicilina, lo que permite asegurarse que únicamente se están cultivando las células que contienen dicho vector de expresión genética. En la Figura 8 se muestran los cultivos de *Escherichia coli* donde se expresó la CYP_{BM3} F87A heterológamente.

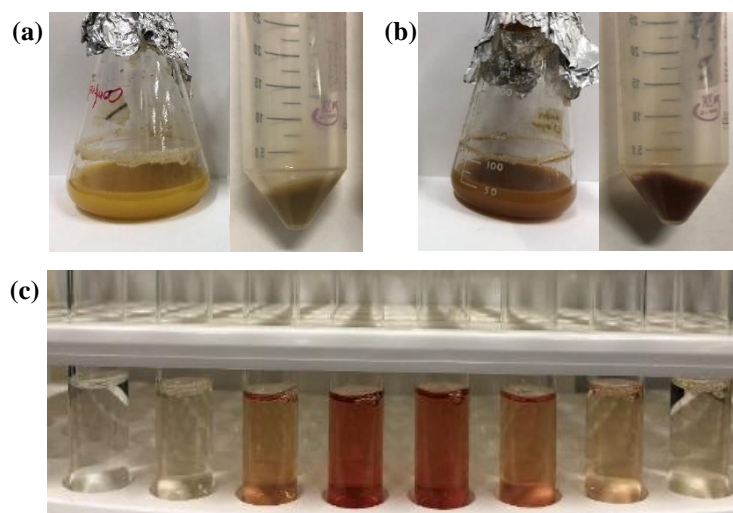


Figura 8. Expresión y purificación de la CYP_{BM3} F87A: (a) cultivo no inducido, (b) cultivo inducido, y (c) fracciones eluidas de la FPLC.

En la Figura 8a se muestra el cultivo no inducido y en la Figura 8b el cultivo inducido con IPTG. Adicionalmente, en la Figura 8c se muestran las fracciones eluidas de la FPLC de menor a mayor concentración de imidazol (izquierda a derecha). Se observa que el cultivo inducido y las fracciones colectadas presentaron un color rojizo, que es atribuible al grupo

prostético hemo presente en la CYP_{BM3} F87A. El grupo hemo consiste en un átomo de hierro (Fe²⁺) contenido en el centro de un anillo tetrapirrólico con sustituyentes laterales llamado porfirina. La estructura química de la porfirina constituye un gran sistema de enlaces conjugados, es decir, un sistema donde los átomos están unidos entre sí mediante uniones covalentes con enlaces simples y múltiples alternados. El resultado de este sistema conjugado es una fuerte absorción en la región visible del espectro electromagnético, lo que se manifiesta visiblemente con un intenso color rojizo.

La etiqueta de 6 histidinas (His-Tag) en el extremo terminal de la CYP_{BM3} F87A permite su purificación mediante FPLC usando una columna de afinidad a níquel. El principio de esta técnica se basa en el enlace coordinado del ion metálico Ni²⁺ con una proteína que contiene etiqueta de histidinas (Figura 9). El ion Ni²⁺ regularmente se une por coordinación a un agente quelante, que a su vez está unido a un soporte sólido. En la columna HisTrap™ FF usada dicho soporte es la Sepharose®, una preparación comercial de agarosa reticulada en forma de perlas. De este modo, cuando se cargó el lisado celular en la columna, las histidinas de la etiqueta contenida en la CYP_{BM3} F87A se unieron a los iones Ni²⁺ inmovilizados en la columna y las proteínas no unidas se eluyeron. Finalmente, la CYP_{BM3} F87A se recuperó por elusión con un gradiente de imidazol, una molécula con estructura similar a la histidina que compite por sitios de unión Ni²⁺.

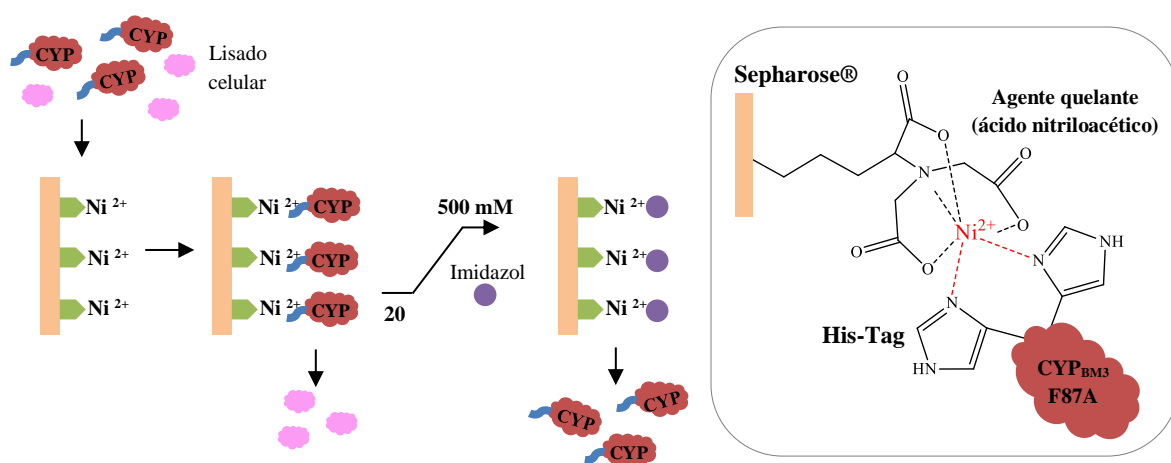


Figura 9. Purificación de la CYP_{BM3} F87A mediante cromatografía de afinidad. Los rectángulos anaranjados representan el soporte de Sepharose®, los pentágonos verdes el agente quelante, las líneas azules la etiqueta de 6 histidinas, las nubes rojas la CYP_{BM3} F87A, las nubes rosadas las proteínas que no son de interés, y los círculos púrpura las moléculas de imidazol.

La pureza de la CYP_{BM3} F87A se evaluó mediante una electroforesis SDS-PAGE. En la Figura 10a se muestra el gel de electroforesis en poliacrilamida obtenido. En el primer carril (izquierda a derecha) se cargó el marcador de peso molecular (MPM) y en el segundo carril la CYP_{BM3} F87A purificada. En el segundo carril se observa una única banda ligeramente arriba del marcador de 50 kDa. Esta banda corresponde a la CYP_{BM3} F87A, cuyo peso molecular es de 55 kDa. Lo anterior significa que la proteína de interés se purificó exitosamente en la columna de afinidad a níquel. En relación con esto, Munro y Lindsay (1996) señalan que los CYP de origen bacteriano son más fáciles de purificar y manipular en el laboratorio que los CYP provenientes de eucariontes, debido a que son solubles en medios acuosos por no estar asociados a membrana, además de exhibir alta estabilidad.

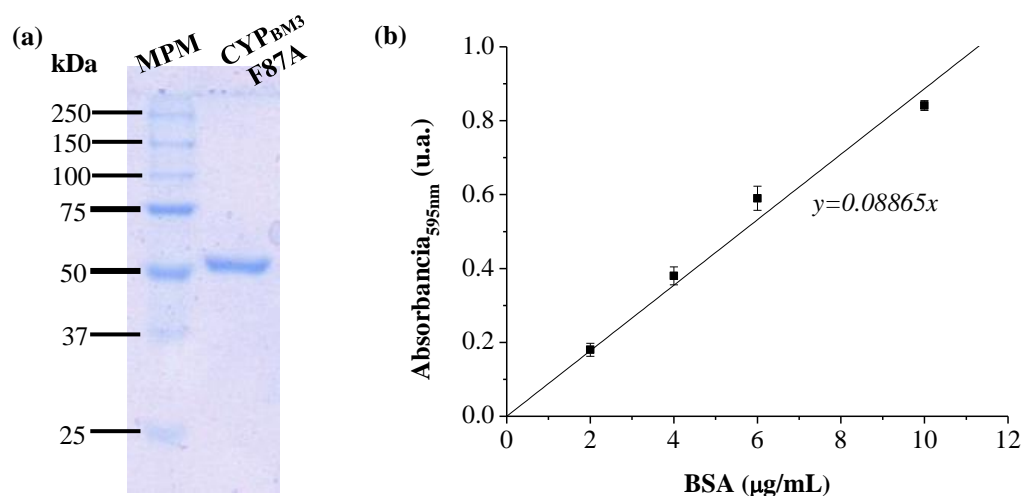


Figura 10. Caracterización de la CYP_{BM3} F87A: (a) Perfil de SDS-PAGE obtenido para la CYP_{BM3} F87A purificada. (b) Curva de calibración con estándar de BSA

La cantidad de CYP_{BM3} F87A purificada se cuantificó mediante el método de Bradford usando una curva de calibración estándar de BSA (Figura 10b). La ecuación de la curva de mejor ajuste ($R = 0.9934$) se usó para calcular la producción de CYP_{BM3} F87A. En este sentido, el sistema de cultivos empleado produjo ~122 mg de CYP_{BM3} F87A por litro de medio de cultivo TB. El ensayo de Bradford se basa en la observación de que el reactivo Coomassie Brilliant Blue G-250 se une a los residuos de aminoácidos que integran a las proteínas. La unión del colorante a una proteína provoca un cambio en el máximo de absorbancia del colorante de 465 a 595 nm. De esta forma, aumento de la absorción a 595 nm permite determinar la concentración de proteína en una muestra (Bradford, 1976).

7.2. Síntesis enzimática de colorantes

La síntesis enzimática de colorantes se ensayó con cuatro sustratos cuya transformación se midió espectrofotométricamente a: 670 nm (índol), 605 nm (4-bromoíndol), 630 nm (5-metoxiíndol), y 635 nm (7-metoxiíndol). La cinética enzimática de la transformación de los indoles se determinó variando la concentración de sustrato hasta la saturación. En la Figura 11 se presenta la cinética enzimática medida para la síntesis de cuatro colorantes derivados del índigo. La actividad específica se expresa como el cociente entre los moles de producto formado por minuto, y los moles de CYP_{BM3} F87A añadidos a la reacción; por lo que las unidades de actividad específica son min^{-1} .

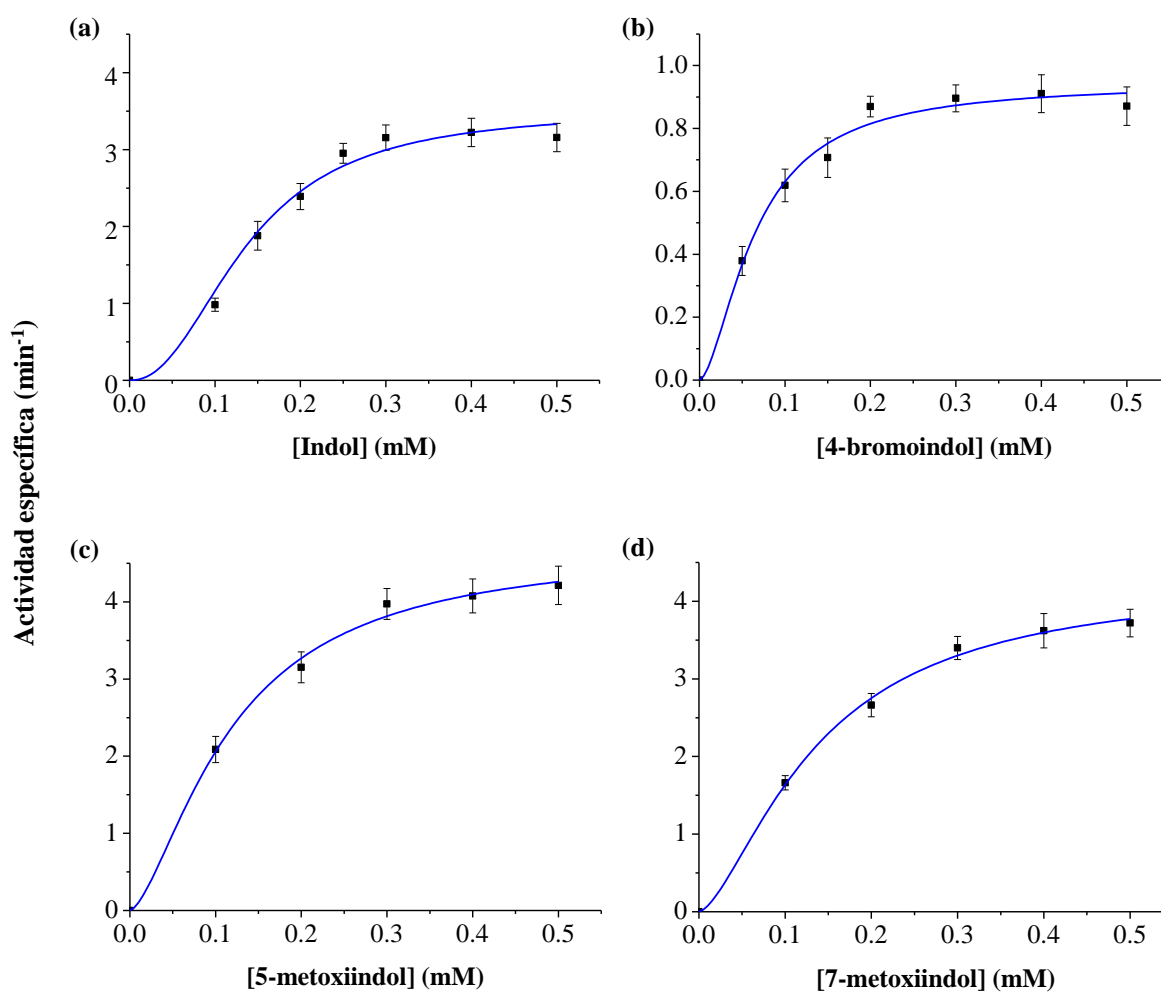


Figura 11. Cinética enzimática de la transformación de (a) índol, (b) 4-bromoíndol, (c) 5-metoxiíndol, y (d) 7-metoxiíndol por acción de la CYP_{BM3} F87A. Cada punto representa la media aritmética de ensayos por triplicado. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de las réplicas.

De manera interesante, los datos de la Figura 11 se ajustaron mejor al modelo matemático de Hill para cinética enzimática. La ecuación de Hill (ecuación 2) suele indicar una unión cooperativa del sustrato al sitio activo de la enzima, es decir, que la unión de una molécula de sustrato al sitio activo influye en la unión de las moléculas de sustrato posteriores. En la ecuación de Hill: V es la velocidad inicial a una concentración de sustrato dada, V_{max} es la velocidad máxima, $[S]$ representa una concentración de sustrato fija, K_m es la concentración de sustrato que produce una velocidad semimáxima y corresponde al punto de inflexión de la curva sigmoidea, y n es el coeficiente de Hill.

$$V = \frac{V_{max}[S]^n}{(K_m)^n + [S]^n} \quad \text{Ec. 2}$$

El cooperativismo enzimático puede ser positivo ($n > 1$) o negativo ($n < 1$). La cooperatividad positiva ocurre cuando la primera molécula de sustrato unida incrementa la afinidad de la enzima por el sustrato. Por el contrario, la cooperatividad negativa ocurre cuando la primera molécula de sustrato unida disminuye la afinidad de la enzima por nuevas moléculas de sustrato. Nótese que para el caso $n = 1$, la ecuación de Hill se reduce a la ecuación de Michaelis-Menten (no cooperatividad). En la Tabla I se presentan las constantes catalíticas para la transformación de los cuatro sustratos ensayados.

Tabla I. Constantes catalíticas de la transformación de indol, 4-bromoindol 5-metoxiindol, y 7-metoxiindol

Sustrato	k_{cat} (min ⁻¹)	K_m (mM)	$\frac{k_{cat}}{K_m}$ (min ⁻¹ mM ⁻¹)	Coefficiente de Hill n	Coefficiente de correlación R^2
Indol	3.51 (±0.28)	0.13 (±0.01)	27	2.23 (±0.48)	0.95
4-bromoindol	0.94 (±0.02)	0.06 (±0.01)	16	1.65 (±0.36)	0.95
5-metoxiindol	4.72 (±0.45)	0.11 (±0.01)	43	1.54 (±0.41)	0.97
7-metoxiindol	4.28 (±0.36)	0.13 (±0.01)	33	1.54 (±0.30)	0.98

La CYP_{BM3} F87A exhibió coeficientes de Hill mayores a 1 para todos los indoles ensayados, lo que indica cooperativismo positivo. En este sentido, la reacción enzimática dio lugar a una curva sigmoidea, donde la pendiente inicial es pequeña ya que la afinidad por el

sustrato era baja; el aumento en la pendiente significa que la unión de la primera molécula de sustrato facilitó la unión de otra molécula de sustrato al sitio activo de la enzima, y así sucesivamente hasta llegar a la saturación. De esta forma, de acuerdo al modelo de Hill usado, la primera molécula de sustrato unida incrementó la afinidad de la enzima por el sustrato.

Con relación a las constantes catalíticas calculadas, los valores de k_{cat} obtenidos reflejan la velocidad máxima de formación de producto cuando la enzima se saturó con sustrato; mientras que los valores de K_m representan la concentración de sustrato que produjo una transformación a la mitad de la velocidad máxima. Además, la razón k_{cat}/k_m (a veces denominada constante de especificidad) es una medida de la eficiencia con la que la enzima transforma un sustrato en producto. De este modo, es posible sugerir que la especificidad de la CYP_{BM3} F87A por los indoles ensayados es: 5-metoxiindol > 7-metoxiindol > indol > 4-bromoindol.

Por otra parte, cabe señalar que las constantes catalíticas de la Tabla I se encuentran en el mismo orden de magnitud que las constantes reportadas para la transformación de indoles por otros CYP. Por ejemplo, Wu *et al.* (2007) señalan que los parámetros cinéticos para la transformación de indol por la CYP 2A6 N297Q/I300V son: K_m 0.196 mM y k_{cat} 18 min⁻¹, que son similares a los obtenidos con la CYP_{BM3} F87A. Lo anterior es relevante si se considera que para los ensayos con la CYP_{BM3} F87A se usó peróxido de hidrógeno como cofactor, en lugar de NADPH como ocurre en el caso de la CYP 2A6 N297Q/I300V. Esto sugiere que el cambio de cofactor no repercute en la cinética de transformación del indol. No obstante, el uso de peróxido de hidrógeno como fuente de oxígeno molecular reduce significativamente los costos, ampliando así las posibilidades de escalamiento industrial.

7.3. Caracterización de los colorantes

Los colorantes sintetizados se extrajeron del medio de reacción mediante extracción líquido-líquido, se purificaron y se caracterizaron mediante espectrometría de masas. En la Figura 12 se presentan los espectros de masas obtenidos en los ensayos con cada sustrato.

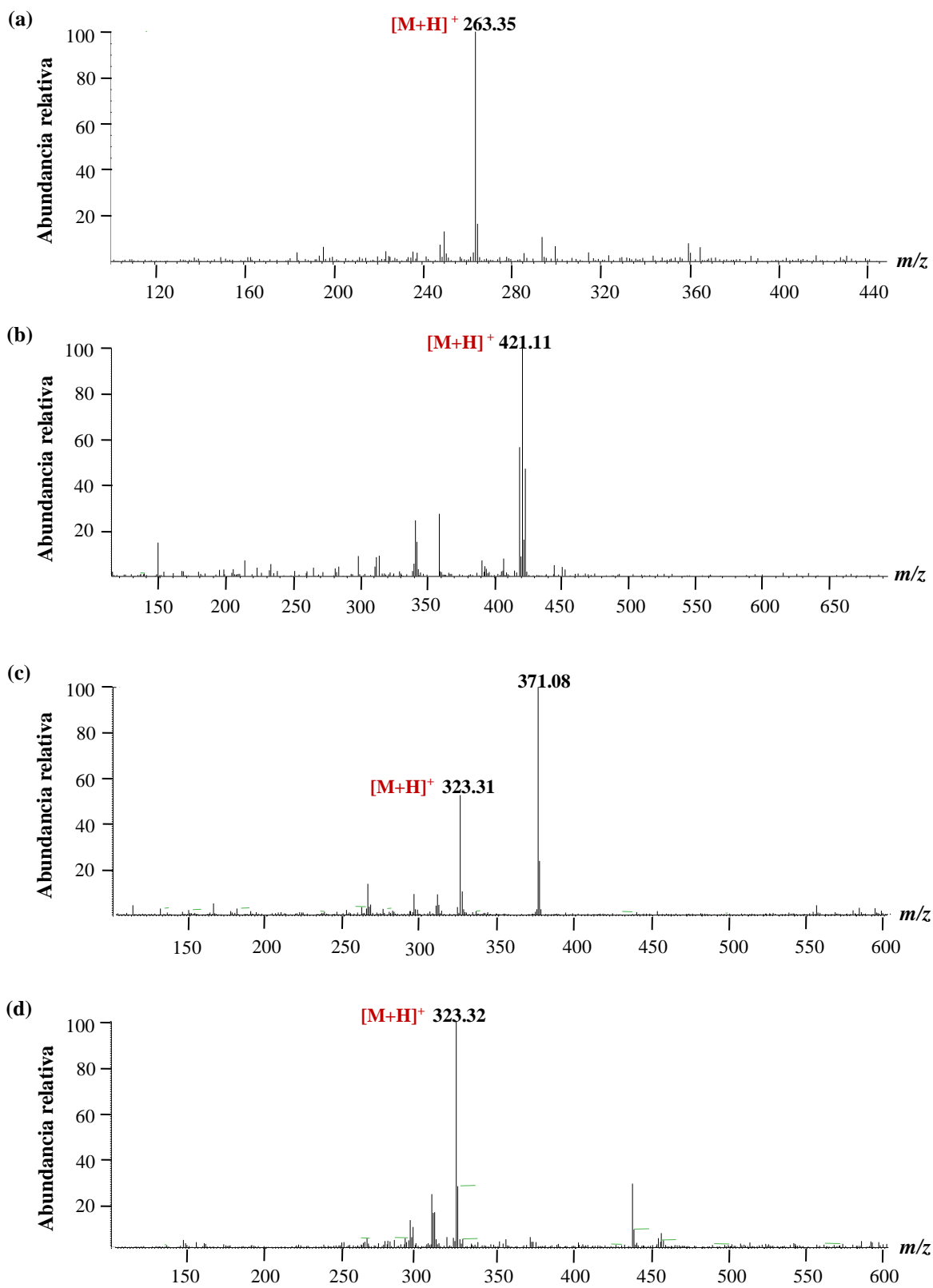
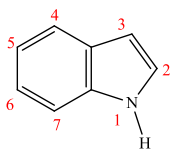
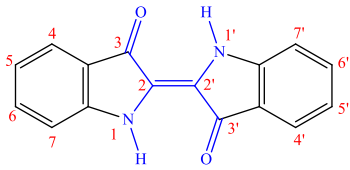

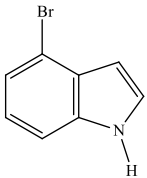
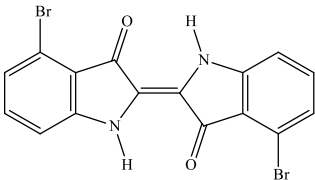

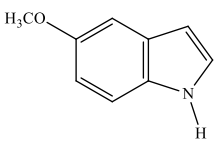
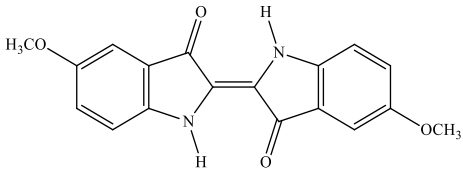

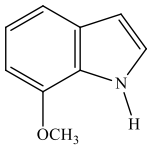
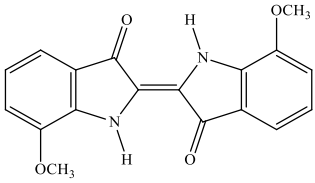



Figura 12. Espectros de masas de los colorantes sintetizados. Los sustratos usados fueron: (a) indol, (b) 4-bromoindol, (c) 5-metoxiindol, y (d) 7-metoxiindol

A partir de los espectros de masas obtenidos, se identificaron los productos de reacción mostrados en la Tabla II. En todos los casos se obtuvieron colorantes derivados del índigo, cuya estructura corresponde a índigos di-sustituídos de color azul. El hecho de que moléculas como el índigo y muchos de sus derivados sean compuestos coloreados se debe a estructuras denominadas cromóforos, que se definen como el conjunto de átomos en una molécula que es responsable de su color y donde la diferencia de energía entre dos orbitales moleculares separados cae dentro del rango del espectro visible. El cromóforo fundamental del índigo y sus derivados está conformado por el doble enlace central que conecta los dos anillos, y los grupos nitrógeno (NH) y carbonilo (C=O). Este cromóforo se suele denominar cromóforo H por su simetría en forma de letra hache mayúscula (Christie, 2007).

Tabla II. Productos de reacción identificados en la transformación enzimática de indoles

Sustrato	Producto de reacción		
	Estructura química	<i>m/z</i>	Fotografía
 Indol	 Índigo*	262.3	
 4-bromoindol	 4,4'-dibromoíndigo	420.1	
 5-metoxiindol	 5,5'-dimetoxiíndigo	322.3	
 7-metoxiindol	 7,7'-dimetoxiíndigo	322.3	

*En azul se ilustra el cromóforo H responsable de dar color al índigo y sus derivados.

De acuerdo con los productos de reacción identificados, en la Figura 13 se presenta un posible mecanismo para la síntesis enzimática de los colorantes. El primer paso de la reacción es la hidroxilación regioselectiva en la posición C3 del indol por acción de la CYP_{BM3} F87A en presencia de peróxido de hidrógeno, lo que resulta en la formación de indoxilo como producto intermediario. Enseguida, el grupo funcional hidroxilo activa el átomo de carbono C2 y, en presencia de un agente oxidante suave como el oxígeno del aire, se produce una oxidación y dimerización consecutivas que resultan en la formación de índigo como producto final. El mismo mecanismo se sugiere para la síntesis enzimática de los índigos di-sustituídos.

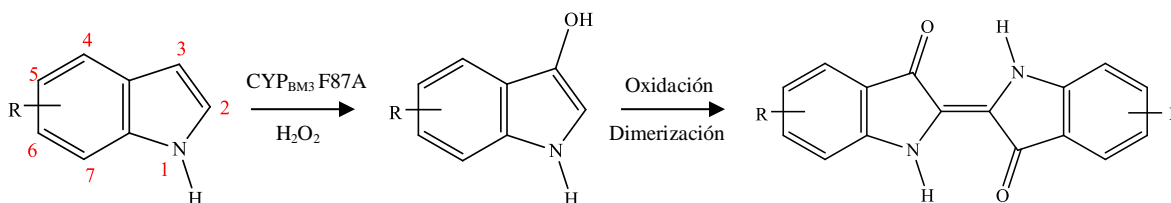


Figura 13. Mecanismo propuesto para la síntesis enzimática de colorantes derivados del índigo. La letra R denota el grupo sustituyente en el anillo bencénico.

Aunado a la espectrometría de masas, los colorantes sintetizados se caracterizaron mediante espectrofotometría UV-Vis. En la Figura 14a se muestra el perfil de absorbancia en DMF de los colorantes en el rango de los 350 a 750 nm. Se identificó que la longitud de onda de absorbancia máxima en el espectro visible para el índigo, 4,4'-dibromoíndigo, 5,5'-dimetoxiíndigo y 7,7'-dimetoxiíndigo es de 610, 615, 648, y 625 nm, respectivamente. Este fenómeno se denomina efecto batocrómico y se manifiesta cuando el espectro de absorbancia de una sustancia se desplaza hacia longitudes de onda más grandes (es decir, de menor energía) por efecto del solvente o por la presencia de distintos sustituyentes químicos. El fenómeno opuesto, es decir el desplazamiento del espectro de absorbancia de una sustancia hacia longitudes de onda menores, se denomina efecto hipsocrómico. Se ha demostrado que el índigo debe su alta batocromicidad a la orientación especial de los grupos NH (donador electrónico) y C=O (aceptor electrónico) que constituyen al cromóforo H. En este sentido, según la naturaleza electrónica del sustituyente, la diferencia de energía entre los orbitales moleculares del cromóforo da lugar a desplazamientos de mayor o menor intensidad en el espectro de absorbancia visible de los colorantes (De Melo *et al.*, 2006).

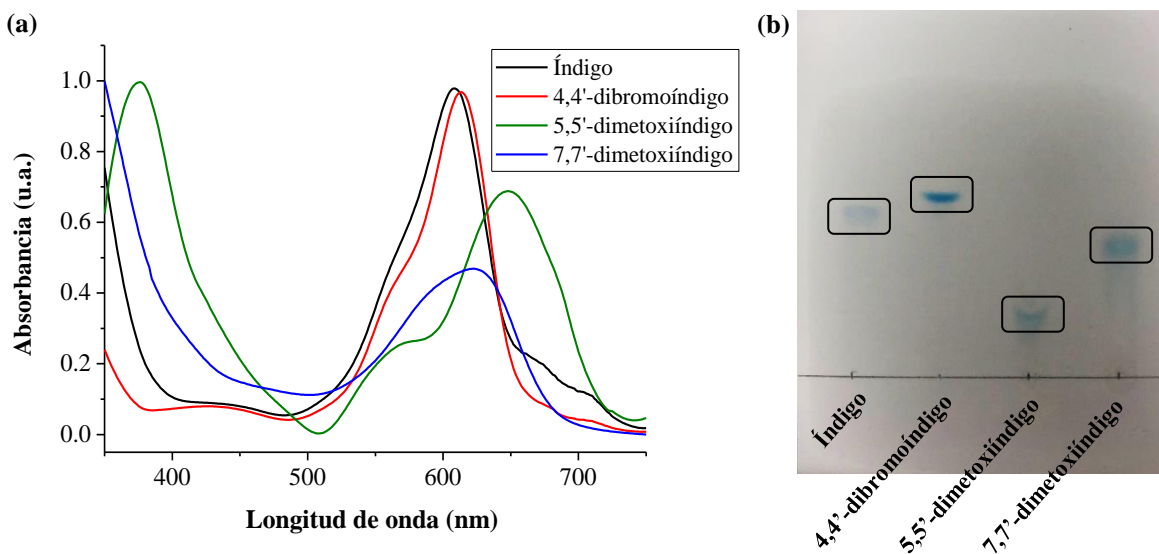


Figura 14. Caracterización de los colorantes: (a) perfil de absorbancia en DMF, y (b) perfil de TLC (hexanos: éter etílico, 1:1 v/v)

Por otra parte, los colorantes también se caracterizaron mediante cromatografía en capa fina (TLC) en un sistema de hexanos y éter etílico (1:1 v/v). En la Figura 14b se muestra el perfil de TLC de los colorantes sintetizados. Se observa que los cuatro colorantes recorrieron distancias diferentes desde el punto de aplicación. Esto se debe a la afinidad relativa de los compuestos hacia la fase estacionaria (gel de sílice) y la fase móvil (sistema de solventes). Cuando se utilizan placas de gel de sílice (polar) como fase estacionaria, entonces los compuestos más polares tienen una interacción fuerte con la sílice y, por lo tanto, se desplazan poco en la placa. Contrariamente, los compuestos menos polares tienen una interacción más fuerte con la fase móvil y se desplazan más arriba en la placa. De esta forma, se sugiere que la polaridad de los colorantes aumenta en el orden: 4,4'-dibromoindigo < índigo < 7,7'-dimetoxiindigo < 5,5'-dimetoxiindigo. En este caso, la polaridad está influenciada por la cantidad, posición y naturaleza química de los átomos sustituyentes en el anillo bencénico de los colorantes.

El cociente entre la distancia recorrida por la muestra desde el punto de aplicación y la distancia recorrida por la fase móvil, se denomina factor de retención R_f . El valor de R_f es constante para cada compuesto en condiciones cromatográficas determinadas. En la Tabla III se presentan los factores de retención obtenidos para los colorantes sintetizados.

Tabla III. Factores de retención de los colorantes sintetizados (hexanos: éter etílico, 1:1 v/v)

Colorante	Factor de retención R_f
Índigo	0.44
4,4'-dibromoíndigo	0.53
5,5'-dimetoxiíndigo	0.21
7,7'-dimetoxiíndigo	0.38

De acuerdo con la Tabla III, el orden de los factores de retención es: 4,4'-dibromoíndigo > índigo > 7,7'-dimetoxiíndigo > 5,5'-dimetoxiíndigo. La distinción entre los compuestos en TLC se basó en la comparación entre los valores de R_f obtenidos para las muestras analizadas. No obstante, los valores de R_f generalmente no son reproducibles con exactitud, de modo que no deben considerarse como un parámetro intrínseco de los compuestos, sino más bien como guías para distinguir las distancias de migración relativas. (Sherma y Fried, 2003). Además, se sugiere que la comparación entre muestras se realice eluyéndolas en la misma placa, tal y como se realizó en este trabajo, para evitar variaciones.,.

7.4. Inmovilización de la CYP_{BM3} F87A

La inmovilización enzimática permite la obtención de sistemas enzimáticos robustos y resistentes, cuya heterogeneidad permite una recuperación fácil de la enzima y los productos (Homaei *et al.*, 2013). En este sentido, la CYP_{BM3} F87A se inmovilizó en nanopartículas magnéticas (Fe₃O₄ NPs). Las Fe₃O₄ NPs se sintetizaron mediante un método de química húmeda donde una suspensión acuosa de hidróxido de hierro (II) se oxidó con peróxido de hidrógeno, lo que resultó en la precipitación de nanopartículas de ~30 nm de diámetro como se verificó mediante microscopía electrónica de transmisión TEM (Figura 15a). En este contexto, el término ‘química húmeda’ alude al uso de fases líquidas en el proceso de síntesis y se aplica en contraposición a los métodos de síntesis en estado sólido. Además, el método de síntesis usado es del tipo *bottom-up* (de abajo a arriba), ya que las Fe₃O₄ NPs se generaron a partir de subunidades más pequeñas (átomos y moléculas). Los métodos de *bottom-up* son ventajosos porque producen estructuras con pocos defectos y de composición química homogénea, debido a que la síntesis ocurre átomo por átomo o molécula por molécula (Cao, 2018).

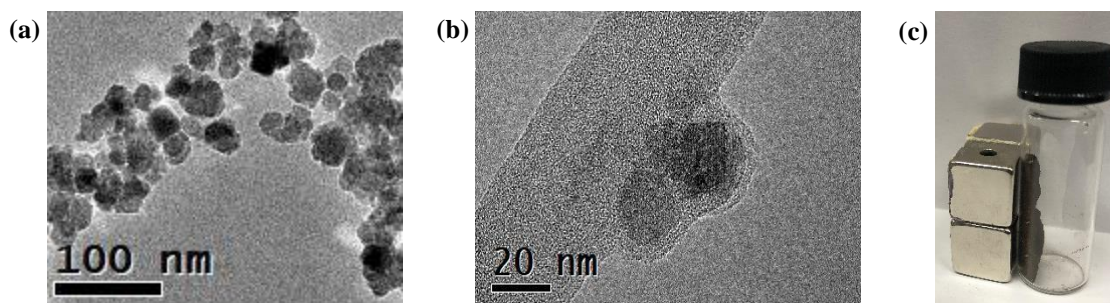


Figura 15. Caracterización de las nanopartículas magnéticas: (a) micrografía TEM de las Fe_3O_4 NPs, (b) micrografía TEM de las Fe_3O_4 NPs@ SiO_2 , y (c) carácter magnético de las NPs

La funcionalización con tetraetoxisilano dio lugar a la formación de una capa de ~ 5 nm de espesor de dióxido de silicio alrededor de las nanopartículas (Figura 15b), cuyo carácter magnético se confirmó al acercar un imán de neodimio a una muestra de nanopartículas y observar una fuerte atracción magnética (Figura 15c). Por otro lado, el análisis de dispersión dinámica de luz reveló que, en solución acuosa, el diámetro hidrodinámico (*Z*-average diameter) de las Fe_3O_4 NPs fue de 125.8 nm (PId 0.214). Este valor es varias decenas más grande que el diámetro medido por TEM. Esto se justifica porque cuando un medio líquido desplaza una partícula dispersa, se genera una capa eléctrica dipolar en su superficie que también se desplaza junto a la partícula; de modo que, en efecto, el tamaño de la partícula aumenta considerablemente. Aunado a esto, las mediciones de parámetros hidrodinámicos son sensibles a la formación de agregados y a la fuerza iónica del medio de dispersión.

El análisis de dispersión dinámica de luz también permitió medir el potencial zeta (*Z*-potential) de las nanopartículas. En la Tabla IV se presentan los valores de potencial zeta medidos para las nanopartículas en las diferentes etapas del proceso de funcionalización. El potencial zeta es una medida de la repulsión electrostática entre partículas: cuanto mayor es el potencial zeta (sea negativo o positivo), más fuerte es la repulsión y más estable es el sistema. En otras palabras, a mayor potencial zeta (valor absoluto), mayor dispersión de las partículas. De acuerdo con la Tabla IV, los valores absolutos de potencial zeta fueron mayores a 20 mV en todos los casos, lo que indica sistemas con alta dispersión. Adicionalmente, el cambio de un potencial negativo en las Fe_3O_4 NPs@ SiO_2 a uno positivo en las Fe_3O_4 NPs@ SiO_2 @ NH_2 , confirmó la funcionalización con grupos amino (NH_2).

Tabla IV. Potencial zeta de las nanopartículas funcionalizadas

Muestra	Potencial zeta (mV)
Fe ₃ O ₄ NPs	-31.3 (±3.5)
Fe ₃ O ₄ NPs@SiO ₂	-28.9 (±4.1)
Fe ₃ O ₄ NPs@SiO ₂ @NH ₂	24.8 (±3.4)

La estructura cristalina y composición de las nanopartículas se caracterizó mediante difracción de rayos X (XRD). En la Figura 16a se muestra el difractograma de XRD de las Fe₃O₄ NPs. El difractograma se indexó con base en la carta cristalográfica 9005839 COD (*Crystallography Open Database*) de la magnetita, verificándose así la estructura cristalina en espinela inversa de la magnetita. Químicamente, la magnetita está conformada por óxido de hierro (II, III) Fe₃O₄ cristalizado en el sistema cúbico. El fuerte carácter magnético de la magnetita se debe a un fenómeno conocido como ferrimagnetismo, según el cual los momentos magnéticos de los cationes de hierro en el sistema (Fe²⁺ y Fe³⁺) están fuertemente acoplados, pero de forma que en cada celda unitaria resulta un momento magnético neto no compensado. Por otra parte, el área superficial (BET) de las Fe₃O₄ NPs@SiO₂ fue de 67.05 m²/g, un valor elevado característico de estructuras nanométricas.

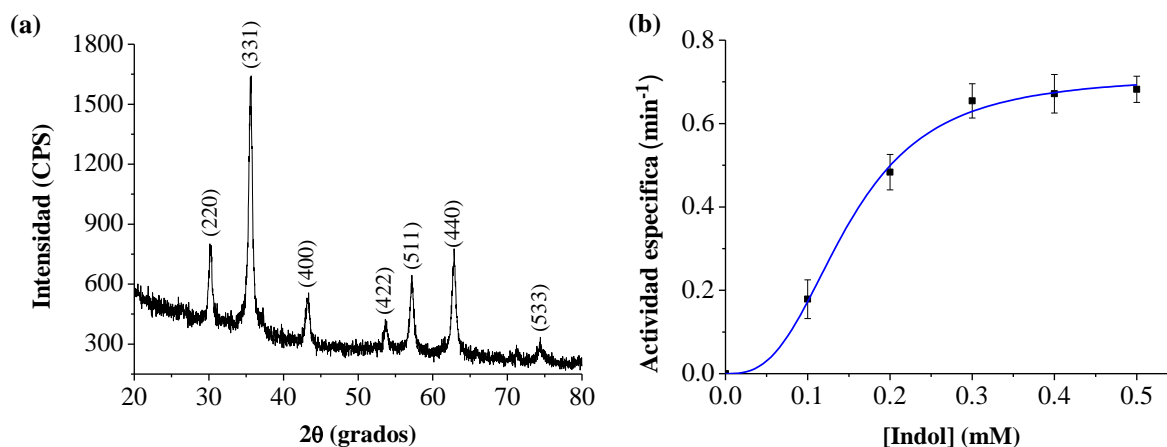


Figura 16. Caracterización de las nanopartículas magnéticas: (a) Difractograma de XRD de las Fe₃O₄ NPs. (b) Cinética enzimática de la transformación de indol por acción de las Fe₃O₄ NPs@CYP. Cada punto representa la media aritmética de ensayos por duplicado. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de las réplicas.

La actividad catalítica de las Fe₃O₄ NPs@CYP se ensayó usando indol como sustrato. En la Figura 16b se muestra la cinética enzimática medida para la síntesis de índigo a partir de indol por acción de las Fe₃O₄ NPs@CYP. La actividad específica se expresó como el cociente entre los moles de producto formado por minuto, y los moles de CYP_{BM3} F87A añadidos a la reacción; por lo que las unidades de actividad específica son los min⁻¹. Para determinar la cinética de esta transformación, la cantidad de CYP_{BM3} F87A inmovilizada se calculó asumiendo la misma actividad específica que para la enzima libre. Se determinó que el 14.97% de la CYP_{BM3} F87A usada para funcionalizar se inmovilizó activamente en la superficie de las nanopartículas. Este valor de enzima inmovilizada es consistente con el valor reportado para la inmovilización covalente de glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4) tipo II-S de *Aspergillus niger* en nanopartículas magnéticas de ~20 nm de diámetro siguiendo el mismo método de funcionalización (Rossi *et al.*, 2004).

En la Tabla V se presenta la comparación entre las constantes catalíticas de la transformación de indol con la enzima libre y las Fe₃O₄ NPs@CYP. El valor de k_{cat} es ligeramente menor en las nanopartículas biocatalíticas que con la enzima libre. Por otro lado, el valor de K_m es ligeramente mayor en las nanopartículas que con la enzima libre. Este ligero aumento de K_m podría atribuirse a las limitaciones de transferencia de masa causadas por el acceso limitado del sustrato indólico al sitio activo de la enzima inmovilizada. Con relación a la razón k_{cat}/K_m , su valor indica que las nanopartículas mostraron el ~20% de la actividad específica respecto a la enzima libre.

Tabla V. Constantes catalíticas de la transformación de indol con la CYP libre y las Fe₃O₄ NPs@CYP

Sistema	k_{cat} (min ⁻¹)	K_m (mM)	$\frac{k_{cat}}{K_m}$ (min ⁻¹ mM ⁻¹)	Coefficiente de Hill n	Coefficiente de correlación R^2
CYP libre	3.51 (±0.28)	0.13 (±0.01)	27	2.23 (±0.48)	0.95
Fe ₃ O ₄ NPs@CYP	0.72 (±0.11)	0.15 (±0.01)	5	2.85 (±0.36)	0.98

Con fundamento en la Tabla V, es posible confirmar que las Fe₃O₄ NPs@CYP aquí descritas fueron biocatalíticamente activas y capaces de catalizar la síntesis del colorante índigo a partir de indol. Esto sugiere que las Fe₃O₄ NPs@CYP también son capaces de hidroxilar otros indoles sustituidos y producir así diversos colorantes derivados del índigo.

8. CONCLUSIONES

En este trabajo se expresó y purificó la enzima CYP_{BM3} F87A en *Escherichia coli* DH5 α . En total, el sistema de cultivos empleado produjo ~ 122 mg de CYP_{BM3} F87A por litro de medio de cultivo TB. La CYP_{BM3} F87A purificada mostró actividad catalítica en la transformación de los sustratos: indol, 4-bromoindol, 5-metoxiindol y 7-metoxiindol. Los datos cinéticos se ajustaron mejor al modelo matemático de Hill para cinética enzimática con $n > 1$, lo que indica cooperativismo positivo. Se obtuvieron valores de k_{cat}/K_M de 27, 16, 43 y 33 $\text{min}^{-1} \text{mM}^{-1}$ para la transformación de los sustratos, respectivamente.

La caracterización de los productos reveló la formación de compuestos coloreados que se identificaron como: índigo, 4,4'-dibromoíndigo, 5,5'-dimetoxiíndigo y 7,7'-dimetoxiíndigo. La longitud de onda de absorbancia máxima en DMF para estos productos fue de 610, 615, 648, y 625 nm, respectivamente. Además, los factores de retención R_f medidos en TLC (hexanos-éter etílico, 10% v/v) fueron 0.44, 0.53, 0.21, y 0.38 para cada producto, respectivamente.

Con respecto a la inmovilización de la CYP_{BM3} F87A en Fe₃O₄ NPs, las nanopartículas demostraron ser biocatalíticamente activas en la transformación de indol en índigo. Las constantes catalíticas para esta transformación fueron $K_m 0.15 \pm 0.01$ mM y $k_{cat} 0.72 \pm 0.11$ min^{-1} , con una razón k_{cat}/K_M de 5 $\text{min}^{-1} \text{mM}^{-1}$. Esto sugiere que las nanopartículas biocatalíticas también son capaces de transformar otros indoles sustituidos y producir así diversos colorantes derivados del índigo.

Por lo anterior, el uso de matrices nanométricas para la inmovilización de enzimas constituye una herramienta efectiva para la producción de biocatalizadores que pueden usarse de manera más práctica y conveniente en la industria. Además, la introducción de mutaciones en la secuencia genética de las enzimas permite obtener variantes como la CYP_{BM3} F87A, que es estable en peróxido y supera así a la CYP_{BM3} nativa en cuanto al requerimiento de cofactores costosos e inestables como el NADPH. En conjunto, esto hace de la síntesis enzimática de colorantes una alternativa plausible a la síntesis química convencional, pero de menor impacto ambiental y económicamente atractiva.

9. OTRAS POSIBILIDADES

La habilidad de las enzimas CYP para transformar sustratos indólicos abre una ventana extensa de posibilidades para la obtención de compuestos indólicos oxigenados, que se extiende más allá de la síntesis de colorantes derivados del índigo. Por ejemplo, se ha identificado que los CYP desempeñan papeles importantes en la biosíntesis de flavonoides y derivados, los cuales son las principales antocianinas que dan color a las flores. En este sentido, la expresión selectiva de estas enzimas en plantas ha permitido obtener, por ejemplo, rosas (*Rosa hybrida*) y claveles (*Dianthus caryophyllus*) de color azul o violeta, que son comercializados exitosamente (Tanaka y Brugliera, 2013). Otra perspectiva son los medicamentos, en el sentido de que diversos indoles sustituidos son productos farmacéuticos, como la indometacina y el sumatriptán (Nakamura *et al.*, 2001). En este caso, los CYP podrían contribuir potencialmente al desarrollo de fármacos obtenidos enzimáticamente.

Por otra parte, además de los CYP, existen otros sistemas enzimáticos relevantes en la industria del índigo. Por ejemplo, debido a la baja solubilidad de este colorante en agua, el índigo debe ser reducido a una forma soluble (leuco índigo) antes de ser usado para teñir textiles. La estrategia industrial más común para la reducción del índigo es el uso de agentes reductores como la ditionita de sodio. No obstante, durante el proceso, la ditionita de sodio se descompone en sulfatos y sulfitos que son fuente de preocupación ambiental. En respuesta, se han propuesto tecnologías enzimáticas basadas en deshidrogenasas y azoreductasas para la reducción diversos colorantes industriales con resultados positivos (Paul, 2005).

Los procesos de deslavado de la mezclilla también han sido testigo de alternativas enzimáticas. Diversas mezclas de enzimas celulasas y lacasas se han usado exitosamente para deslavar tejidos de mezclilla y brindar así la apariencia característica de muchas prendas de mezclilla comerciales (Paul, 2015). Esta técnica constituye una alternativa ecológica al deslavado con agentes blanqueadores, o bien, al denominado lavado a la piedra. Aunado a esto, las enzimas lacasas de hongos ligninolíticos también se estudiado para la degradación de índigo (Campos *et al.*, 2001) y otros colorantes industriales (Rodríguez *et al.*, 1999); de modo que esta aproximación es útil para el tratamiento del agua de desecho que se genera en las fábricas de la industria textil.

10. REFERENCIAS

- Arnold, F. y Cirino, P. (2008). *U.S. Patent No. 7435570B2*. Thermostable peroxide-driven cytochrome P450 oxygenase variants and methods of use, Pasadena: U.S. Patent and Trademark Office
- Baeyer, A., y Drewsen, V. (1882). Darstellung von Indigblau aus Orthonitrobenzaldehyd. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, **15** (2), 2856–2864. doi: 10.1002/cber.188201502274
- Balfour-Paul, J. (1998). *Indigo*. Londres: British Museum Press
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72** (1-2), 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Campos, R., Kandelbauer, A., Robra, K. ., Cavaco-Paulo, A., & Gübitz, G. . (2001). Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Biotechnology*, **89** (2-3), 131–139. doi:10.1016/s0168-1656(01)00303-0
- Cao, H. (2018). *Synthesis and applications of inorganic nanostructures*. Weinheim: Wiley-VCH
- Choi, H., Kim, J., Cho, E., Kim Y., Kim, J., y Kim S. (2003). A novel flavin-containing monooxygenase from *Methylophaga* sp. strain SK1 and its indigo synthesis in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **306**, 930–936. doi: 10.1016/S0006-291X(03)01087-8
- Christie, R. (2001). *Colour Chemistry*. 2 ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry
- Christie, R. (2007). Why is indigo blue? *Biotechnic & Histochemistry*, **82** (2), 51–56. doi:10.1080/00958970701267276
- Cirino, P. y Arnold, F. (2002). Regioselectivity and activity of cytochrome P450 BM-3 and mutant F87A in reactions driven by hydrogen peroxide. *Advanced Synthesis & Catalysis*, **344** (9), 932–937. doi: 10.1002/1615-4169(200210)344:9<932::AID-ADSC932>3.0.CO;2-M
- Cirino, P., y Arnold, F. (2003). A self-sufficient peroxide-driven hydroxylation biocatalyst. *Angewandte Chemie - International Edition*, **42** (28), 3299–3301. doi: 10.1002/anie.200351434
- Clark, R., Cooksey, C., Daniels, M., y Withnall, R. (1993). Indigo, woad, and tyrian purple: important vat dyes from antiquity to the present. *Endeavour*, **17** (4), 191–199. doi: 10.1016/0160-9327(93)90062-8
- Coronas-Ceresuela, J. (2013). *Química básica para ingenieros*. Zaragoza: Prensas de la Universidad de Zaragoza
- De Melo, J, Rondão, R., Burrows, H., Melo, M., Navaratnam, S., Edge, R., ... Voss, G. (2006). Spectral and photophysical studies of substituted indigo derivatives in their keto forms. *ChemPhysChem*, **7** (11), 2303–2311. doi:10.1002/cphc.200600203
- Dua, A., Chauhan, K., y Pathak, H. (2014). Biotransformation of indigo pigment by indigenously isolated *Pseudomonas* sp. HAV-1 and assessment of its antioxidant property. *Biotechnology Research International*, **2014**, 1–6. doi:10.1155/2014/109249

- Ensley, B., Ratzkin, B., Osslund, T., Simon, M., Wackett, L., y Gibson, D. (1983). Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo. *Science*, **222** (4620), 167–169. doi:10.1126/science.6353574
- Escribano, A. (2013). New gold-catalyzed reactions and applications for the synthesis of alkaloids. PhD thesis from the Institut of Chemical Research of Catalonia, Spain. Sringler Cham Heidelberg, New York.
- Farias-Silva, E., Cola, M., Calvo, T., Barbastefano, V., Ferreira A., Michelatto, D., ... Souza Brito, A. (2007). Antioxidant activity of indigo and its preventive effect against ethanol-induced DNA damage in rat gastric mucosa. *Planta Medica*, **73** (12), 1241–1246. doi: 10.1055/s-2007-981613
- Fort, M., y Lloyd, L. (2016). *Chemistry of dyestuffs. A manual for students of chemistry and dyeing*. Cambridge: Cambridge University Press
- Friedlaender, P., y Schenck, O. (1914). Über hydroxyl-derivate des indigblaus. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, **47** (3), 3040–3052. doi: 10.1002/cber.191404703103
- Friedländer, P. (1907). Ueber thionaphtenderivate und thioindigo. *Justus Liebig's Annalen Der Chemie*, **351** (1–3), 390–420. doi: 10.1002/jlac.19073510131
- Friedländer, P., Bruckner, S., y Deutsch, G. (1912). Über brom- und methoxyderivate des indigos. *Justus Liebig's Annalen Der Chemie*, **388** (1), 23–49. doi: 10.1002/jlac.19123880103
- Gillam, E., Aguinaldo, A., Notley, L., Kim, D., Mundkowski, R., Volkov, A., ... Guengerich, F. (1999). Formation of indigo by recombinant mammalian cytochrome P450. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **265** (2), 469–472. doi:10.1006/bbrc.1999.1702
- Gray, P. (1928). The formation of indigotin from indol by soil bacteria. *Proceedings of the Royal Society of London B*, **102**, 263–280
- Gribble, G. (2016). Indole ring synthesis: from natural products to drug discovery. Chichester: John Wiley & Sons
- Gürses, A., Açıkyıldız, M., Güneş, K., y Gürses, M. (2016). *Dyes and Pigments*. Basilea: Springer International Publishing
- Heumann, K. (1890). Neue synthesen des indigos und verwandter farbstoffe. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, **23** (2), 3043–3045. doi: 10.1002/cber.189002302235
- Hoessel, R., Leclerc, S., Endicott, J., Nobel, M., Lawrie, A., Tunnah, P., ... Meijer L. (1999) Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. *Nature Cell Biology*, **1** (1), 60–67. doi: 10.1038/9035
- Homaei, A., Sariri, R., Vianello, F., y Stevanato, R. (2013). Enzyme immobilization: an update. *Journal of Chemical Biology*, **6** (4), 185–205. doi: 10.1007/s12154-013-0102-9
- Hsu, T., Welner, D., Russ, Z., Cervantes, B., Prathuri, R., Adams, P., ... Dueber, J. (2018). Employing a biochemical protecting group for a sustainable indigo dyeing strategy. *Nature Chemical Biology*, **14** (3), 256–261. doi:10.1038/nchembio.2552
- Hu, S., Huang, J., Mei, L., Yu, Q., Yao, S., y Jin, Z. (2010). Altering the regioselectivity of cytochrome P450 BM-3 by saturation mutagenesis for the biosynthesis of indirubin. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **67** (1–2), 29–35. 10.1016/j.molcatb.2010.07.001

- Hunger, K. (2003). *Industrial dyes: chemistry, properties, applications*. Weinheim: Wiley-VCH
- Irimia-Vladu, M., Głowacki, E., Troshin, P., Schwabegger, G., Leonat, L., Susarova, D., ... Sariciftci, N. (2011). Indigo - A natural pigment for high performance ambipolar organic field effect transistors and circuits. *Advanced Materials*, **24** (3), 375–380. doi:10.1002/adma.201102619
- Joo, H., Arisawa, A., Lin, Z., y Arnold, F. (1999) High-throughput digital imaging screen for the discovery and directed evolution of oxygenases. *Chemical Biology*, **6** (10), 699–706. doi: 10.1016/s1074-5521(00)80017-4
- Kapadia, G., Tokuda, H., Sridhar, R., Balasubramanian, V., Takayasu, J., Bu, P., ... Nishino, H. (1998). Cancer chemopreventive activity of synthetic colorants used in foods, pharmaceuticals and cosmetic preparations. *Cancer Letters*, **129** (1), 87–95. doi: 10.1016/S0304-3835(98)00087-1
- Kim, J., Lee, K., Kim, Y., Kim, C., y Lee, K. (2003). Production of dyestuffs from indole derivatives by naphthalene dioxygenase and toluene dioxygenase. *Letters in Applied Microbiology*, **36**, 343–348. doi: 10.1046/j.1472-765X.2003.01279.x
- Kotz, J., Treichel, P., y Weaver, C. (2006). *Chemistry & Chemical Reactivity*. 6 ed. Belmont: Thomson Brooks/Cole
- Koyani, R., y Vazquez-Duhalt, R. (2017). Enzymatic activation of the emerging drug resveratrol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **185** (1), 248–256. doi: 10.1007/s12010-017-2645-7
- Leclerc, S., Garnier, M., Hoessel, R., Marko, D., Bibb, J., Snyder, G., ... Meijert, L. (2001). Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 β and CDK5/P25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. A property common to most cyclin-dependent kinase inhibitors? *Journal of Biological Chemistry*, **276** (1), 251–260. doi: 10.1074/jbc.M002466200
- Lin, G., Chen, H., y Shu, H. (2015). Detoxification of indole by an indole-induced flavoprotein oxygenase from *Acinetobacter baumannii*. *PLoS ONE*, **10** (9). doi: e0138798. doi:10.1371/journal.pone.0138798
- Lobedanz, S., Damhus, T., Borchert, T., Hansen, T., Lund, H., Lai, W., ... Kirk, O. (2016). Enzymes in industrial biotechnology. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 1–73. doi: 10.1002/0471238961.091404211409
- Lu, Y. y Mei, L. (2007). Co-expression of P450 BM3 and glucose dehydrogenase by recombinant *Escherichia coli* and its application in an NADPH-dependent indigo production system. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **34** (3), 247–253. doi: 10.1007/s10295-006-0193-1
- Luis-Lafuente, S., Burguete-Azcárate, M. y Altava-Benito, B. (1997). *Introducción a la química orgánica*. Castelló de la Plana: Universitat Jaume I
- McClay, K., Boss, C., Keresztes, I., y Steffan, R. (2005). Mutations of toluene-4-monooxygenase that alter regiospecificity of indole oxidation and lead to production of novel indigoid pigments. *Applied and Environmental Microbiology*, **71** (9), 5476–5483. doi: 71, 5476–5483. 10.1128/AEM.71.9.5476-5483.2005
- Mermod, N., Harayama, S., y Timmis, K. (1986). New route to bacterial production of indigo. *Nature Biotechnology*, **4**, 321–324. doi: 10.1038/nbt0486-321

- Munro, A. y Lindsay, J. (1996). Bacterial cytochromes P-450. *Molecular Microbiology*, **20** (6), 1115–1125. doi:10.1111/j.1365-2958.1996.tb02632.x
- Nakamura, K., Martin, M., y Guengerich, F. (2001). Random mutagenesis of human cytochrome P450 2A6 and screening with indole oxidation products. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **395** (1), 25–31. doi: 10.1006/abbi.2001.2569
- Namgung, S., Park, H., Kim, J., Lee, P., Kim, B., Yang, Y., ... Choi, K. (2019). Ecofriendly one-pot biosynthesis of indigo derivative dyes using CYP102G4 and PrnA halogenase. *Dyes and Pigments*, **162**, 80–88. doi: 10.1016/j.dyepig.2018.10.009
- Nelson, D. y Cox, M. (2009). *Lehninger Principios de bioquímica*. 5 ed. Barcelona: Omega
- O'Connor, K., Dobson, A., y Hartmans, S. (1997). Indigo formation by microorganisms expressing styrene monooxygenase activity. *Applied and Environmental Microbiology*, **63** (11), 4287–4291
- Oshima, T., Kawai, S., y Egami, F. (1965). Oxidation of indole to indigotin by *Pseudomonas indoloxidans*. *Journal of Biochemistry*, **58** (3), 259–263. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a1281
- Paul, R. (2015). *Denim: Manufacture, Finishing and Applications*. Cambridge: Woodhead Publishing
- Qu, Y., Xu, B., Zhang, X., Ma, Q., Zhou, H., Kong, C., ... Zhou, J. (2013). Biotransformation of indole by whole cells of recombinant biphenyl dioxygenase and biphenyl-2, 3-dihydrodiol-2, 3-dehydrogenase. *Biochemical Engineering Journal*, **72**, 54–60. doi: 10.1016/j.bej.2012.12.021
- Quester, K., Juarez-Moreno, K., Secundino, I., Roseinstein, Y., Alejo, K., Huerta-Saquero, A., ... Vazquez-Duhalt, R. (2017). Cytochrome P450 bioconjugate as a nanovehicle for improved chemotherapy treatment. *Macromolecular Bioscience*, **17** (5). doi: 10.1002/mabi.201600374
- Reed, P. (1992). The British chemical industry and the indigo trade. *The British Journal for the History of Science*, **25** (1), 113–125. doi: 10.1017/S0007087400045350
- Rodríguez, E., Pickard, M., y Vazquez-Duhalt, R. (1999). Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Current Microbiology*, **38** (1), 27–32. doi:10.1007/pl00006767
- Rossi, L., Quach, A., y Rosenzweig, Z. (2004). Glucose oxidase magnetite nanoparticle bioconjugate for glucose sensing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **380** (4), 606–613. doi: 10.1007/s00216-004-2770-3
- Rui, L., Reardon, K., y Wood, T. (2004). Protein engineering of toluene ortho-monooxygenase of *Burkholderia cepacia* G4 for regiospecific hydroxylation of indole to form various indigoid compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **66** (4), 422–429. doi:10.1007/s00253-004-1698-z
- Sadauskas, M., Vaitekunas, J., Gasparaviciute, R., y Meškys, R. (2017). Indole biodegradation in *Acinetobacter* sp. strain O153, genetic and biochemical characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, **83** (19), e01453–17. doi: e01453–e01417. 10.1128/AEM.01453-17
- Sanchez-Sanchez, L., Roman, R., y Vazquez-Duhalt, R. (2012). Pesticide transformation by a variant of CYPBM3 with improved peroxygenase activity. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **102** (2): 169–74. doi:10.1016/j.pestbp.2011.12.010

- Sengar, P., Juárez, P., Verdugo-Meza, A., Arellano, D., Jain, A. Chauhan, K., ... Fournier, P. (2018). Development of a functionalized UV-emitting nanocomposite for the treatment of cancer using indirect photodynamic therapy. *Journal of Nanobiotechnology*, **16** (19). doi: 10.1186/s12951-018-0344-3
- Sherma, J. y Fried, B. (2003). *Handbook of thin-layer chromatography*. New York: Marcel Dekker
- Soladoye, M., Sonibare, M. y Chukwuma, E. (2010). Morphometric study of the genus *Indigofera* linn. (Leguminosae-Papilionoideae) in south-western Nigeria. *International Journal of Botany*, **6** (3), 343–350. doi: 10.3923/ijb.2010.343.350
- Tada, M., Hatanaka, S., Sanbonsugi, H., Matsushita, N., y Abe, M. (2003). Method for synthesizing ferrite nanoparticles ~30 nm in diameter on neutral pH condition for biomedical applications. *Journal of Applied Physics*, **93** (10), 7566–7568. doi:10.1063/1.1558676
- Tanaka, Y., y Brugliera, F. (2013). Flower colour and cytochromes P450. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **368** (1612), 20120432. doi:10.1098/rstb.2012.0432
- Teanglum, A., Teanglum, S., y Saithong, A. (2012). Selection of indigo plant varieties and other plants that yield indigo dye. *Procedia Engineering*, **32**, 184–190. doi:10.1016/j.proeng.2012.01.1255
- Warzecha, H., Frank, A., Peer, M., Gillam, E., Guengerich, F., y Unger, M. (2007). Formation of the indigo precursor indican in genetically engineered tobacco plants and cell cultures. *Plant Biotechnology Journal*, **5** (1), 185–191. doi:10.1111/j.1467-7652.2006.00231.x
- Wenner, N. (2017). The production of indigo dye from plants. Consultado el 5 de mayo de 2019, en: <http://www.fibershed.com/wp-content/uploads/2017/12/production-of-indigo-dye-dec2017.pdf>
- Werck-Reichhart, D., y Feyereisen, R. (2000). Cytochromes P450: a success story. *Genome Biology*, **1** (6). doi:10.1186/gb-2000-1-6-reviews3003
- Wu, Z., Podust, L., y Guengerich, F. (2005). Expansion of substrate specificity of cytochrome P450 2A6 by random and site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, **280** (49), 41090–41100. doi:10.1074/jbc.m508182200
- Yen, K., Karl, M., Blatt, L., Simon, M., Winter, R., Fausset, P., ... Chen, K. (1991). Cloning and characterization of a *Pseudomonas mendocina* KR1 gene cluster encoding toluene-4-monooxygenase. *Journal of Bacteriology*, **173** (17), 5315–5327. doi: 10.1128/jb.173.17.5315-5327.1991
- Yusuf, M., Shabbir, M. y Mohammad, F. (2017). Natural colorants: Historical, processing and sustainable prospects. *Natural Products and Bioprospecting*, **7**, 123–145. doi: 10.1007/s13659-017-0119-9
- Zhang, X., Qu, Y., Ma, Q., Zhou, H., Li, X., Kong, C., ... Zhou, J. (2013). Cloning and expression of naphthalene dioxygenase genes from *Comamonas* sp. MQ for indigoids production. *Process Biochemistry*, **48**, 581–587. doi: 10.1016/j.procbio.2013.02.008

11. ANEXOS

11.1. Coeficientes de extinción

Para calcular las constantes catalíticas en la transformación de los indoles, los valores de $\Delta A/min$ medidos se convirtieron en moles de sustrato transformados por minuto (mol/min). Para ello se usó la ley de Beer-Lambert (ecuación 3), donde: $\Delta A/min$ es el cambio de absorbancia en el tiempo, $\Delta C/min$ es el cambio de concentración en el tiempo, ϵ es el coeficiente de extinción del absorbente, y l es la longitud atravesada por la luz en la celda.

$$\Delta A/min = \Delta C/min \cdot \epsilon \cdot l \quad \text{Ec. 3}$$

El coeficiente ϵ relaciona la concentración y la absorbancia del absorbente, por lo que permite conocer la cantidad de producto formado en las reacciones medidas espectrofotométricamente. Tras caracterizar los productos de reacción, se determinó que los productos de la transformación de indol, 4-bromoindol, 5-metoxiindol, y 7-metoxiindol, fueron: índigo, 4',4-dibromoíndigo, 5,5'-dimetoxiíndigo, y 7,7'-dimetoxiíndigo. El coeficiente ϵ del índigo en agua es de **3,900 M⁻¹cm⁻¹** a 670 nm (Wu *et al.*, 2007). El coeficiente ϵ del 4,4-dibromoíndigo en DMF es de 25,771 M⁻¹cm⁻¹ a 616 nm (De Melo *et al.*, 2006). Este valor se usó para calcular la concentración de una muestra de 4,4-dibromoíndigo sintetizada enzimáticamente que fue purificada y resuspendida en DMF. Posteriormente, se tomó una alícuota de 100 μ L de dicha muestra con concentración conocida y se agregaron 900 μ L de agua. La solución final de 4,4-dibromoíndigo en DMF 10% v/v con concentración conocida se usó para calcular el coeficiente ϵ . Así, se determinó que el coeficiente ϵ del 4,4-dibromoíndigo en DMF 10% v/v es de **14,089 M⁻¹cm⁻¹** a 605 nm.

Con referencia a los dimetoxiíndigos, el coeficiente ϵ del 5,5-dimetoxiíndigo y del 7,7-dimetoxiíndigo se calcularon con la ecuación 3, a partir de una muestra con concentración conocida. Para ello, los dimetoxiíndigos se obtuvieron mediante síntesis química usando el método de Baeyer-Drewson (1882), como se muestra en la Figura 17. En ambos casos, como precursor se usó nitrobenzaldehído sustituido correspondiente.

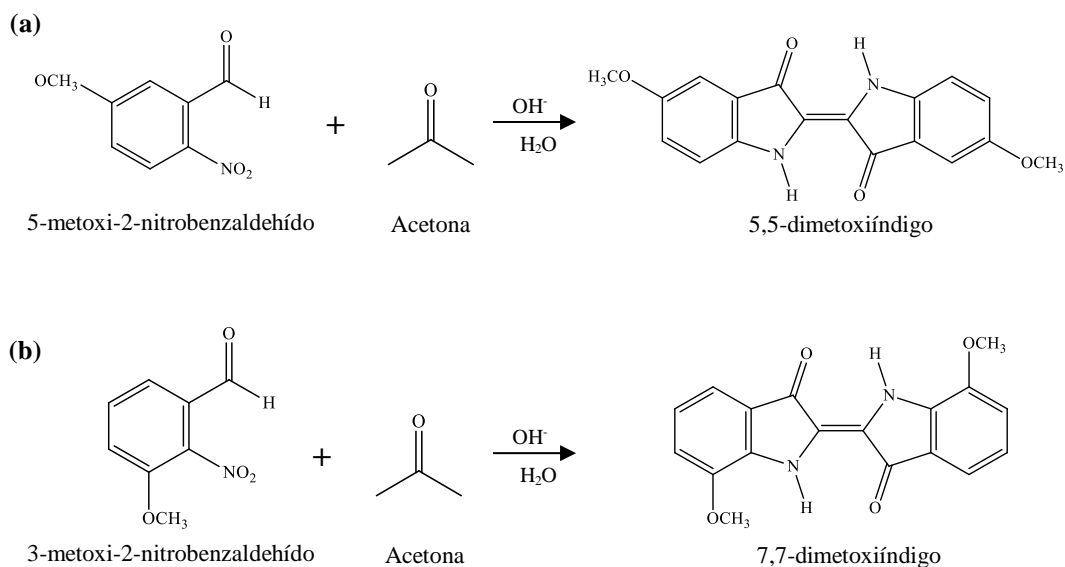


Figura 17. Síntesis química de dimetoxiíndigos: (a) 5,5-dimetoxiíndigo y (b) 7,7-dimetoxiíndigo

Para la síntesis, se disolvieron 0.5 g de 5-metoxi-2-nitrobenzaldehído en 5 mL de acetona. Se adicionaron 5 mL de agua y se agitó usando una varilla de agitación. Luego, se agregaron 2.5 mL de NaOH 1 M gota a gota. La reacción se incubó por 5 min a temperatura ambiente y protegida de la luz. El producto coloreado se recuperó mediante filtración al vacío y se lavó con 20 mL de agua Milli-Q y 10 mL de etanol al 70% v/v. El 5,5-dimetoxiíndigo se dejó secar a temperatura ambiente y protegido de la luz. El 7,7-dimetoxiíndigo se sintetizó siguiendo el mismo procedimiento. Se determinó que el coeficiente ϵ del 5,5-dimetoxiíndigo en DMF 10% v/v es de $2,652 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 630 nm, mientras que para el 7,7-dimetoxiíndigo en DMF 10% v/v es de $4,312 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 635 nm.

11.2. Porcentaje de CYP_{BM3} F87A inmovilizada

En la reacción de funcionalización, se agregaron 6 mg de CYP y, al final, las NPs se resuspendieron en 8 mL de buffer. Entonces, asumiendo que toda la CYP se inmovilizó en las NPs, la concentración de CYP en el stock de NPs@CYP es:

$$\frac{6 \text{ mg CYP}}{8 \text{ mL}} = 0.75 \frac{\text{mg CYP}}{\text{mL}}$$

Además, la concentración de NPs en el stock es:

$$\frac{8 \text{ mg NPs}}{8 \text{ mL}} = 1 \frac{\text{mg NPs}}{\text{mL}}$$

La cantidad de CYP_{BM3} F87A inmovilizada se calculó asumiendo la misma actividad específica que para la enzima libre. Para medir la actividad, se usó 2,6-dimetoxifenol como sustrato ($\epsilon = 14,800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 468 nm). El ensayo con las NPs se realizó en 1 mL de mezcla de reacción conteniendo: 100 μL de NPs@CYP, 0.5 mM de sustrato (100 μL), y 10 mM de peróxido de hidrógeno (5 μL). Como medio de reacción se usó buffer de fosfatos de potasio 50 mM pH 8 (795 μL). Por otra parte, el ensayo con CYP libre se realizó en 1 mL de mezcla de reacción conteniendo: 75 μg de CYP (75 μL), 0.5 mM de sustrato (10 μL), y 10 mM de peróxido de hidrógeno (5 μL). Como medio de reacción se usó buffer de fosfatos de potasio 50 mM pH 8 (910 μL). Finalmente, los valores de $\Delta A/\text{min}$ obtenidos se usaron para calcular el porcentaje de CYP inmovilizada:

$$\frac{\Delta A/\text{min}_{\text{CYP libre}}}{\Delta A/\text{min}_{\text{NPs@CYP}}} = \frac{0.24423}{0.03658} \times 100\% = \mathbf{14.97\%}$$