



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**Tesis que para obtener el grado de Maestro en Biotecnología**

**PRESENTA**

**Iker Iñarritu Castro**

**Estudios de la regulación de la actividad de  
cloroperoxidasas inmovilizadas mediante el uso de  
nanopartículas activadas con luz UV**

**Director de tesis:**

Dr. José Campos Terán

**Asesores:**

Dr. Eduardo Torres Ramírez

Dr. Jorge Aburto Anell

**Enero de 2013**

México D.F. a 25 de Enero del 2013

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465

El jurado designado por la

División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**Estudios de la regulación de la actividad de cloroperoxidasas inmovilizadas mediante el uso de nanopartículas activadas con luz UV**

que presentó

**Iker Iñarritu Castro**

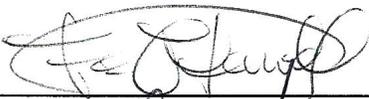
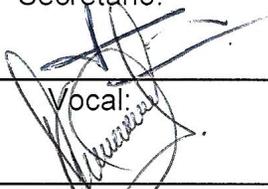
Comité Tutorial:

Director: Dr. José Campos Terán

Asesor: Dr. Eduardo Torres Ramírez

Asesor: Dr. Jorge Aburto Anell

Jurado:

  
\_\_\_\_\_  
Presidente:  
  
\_\_\_\_\_  
Secretario:  
\_\_\_\_\_  
Vocal:  
  
\_\_\_\_\_  
Vocal:

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer en primer lugar a mi director de tesis, el Dr. José Campos Terán, que fue siempre un apoyo incondicional en la realización de mi proyecto.

A su vez quiero agradecer personalmente a los doctores Eduardo Torres, Hiram Beltrán, Édgar Vázquez, Humberto García y Gerardo Muñoz por su apoyo invaluable en el desarrollo de esta tesis.

También agradezco a mis familiares y amigos, que siempre me apoyaron y motivaron aunque la mayoría de las veces no entendieran de lo que les hablaba.

Esta tesis no hubiera sido posible sin el apoyo del CONACYT (Becario No. 234651) y del ICyTDF (Proyecto: “Inmovilización de nanopartículas semiconductoras y enzimas en materiales mesoporosos: Hacia el desarrollo de biosensores altamente estables, sensibles y selectivos” con clave ICYTDF-FFUTPICTGDF-2008), por lo que agradezco la oportunidad que me dieron estas instituciones para continuar con mis estudios.

Finalmente quisiera agradecer especialmente a Alejandra Dávila Trüby, con quien estaré eternamente en deuda por haberme acercado de una manera personal al mundo de la ciencia.

## Resumen

Los compuestos azufrados presentes en combustibles causan corrosión en oleoductos e interfieren en general en la calidad de los destilados, siendo dañinos también para el medio ambiente. Esto ha motivado el desarrollo de tecnologías para la cuantificación de azufre a concentraciones ultrabajas (hasta 1 ppb). Sin embargo, el uso de algunas de estas tecnologías requiere una inversión muy elevada en equipo y mantenimiento, lo cual motiva el desarrollo de nuevas alternativas. Una posibilidad es la cuantificación a través de un proceso enzimático, utilizando peroxidasas para detectar dichos compuestos.

En esta tesis se ensambló y estudió un biosensor, que es un instrumento analítico cuya función es determinar concentraciones de compuestos específicos. Este biosensor utilizó la cloroperoxidasa del hongo *Caldariomyces fumago* para oxidar un sustrato modelo, así como nanopartículas semiconductoras de CdS para activar a esta enzima a través de irradiación con luz UV en sustitución de  $H_2O_2$ . El uso de nanopartículas de CdS tiene como ventajas hacer la reacción modulable, es decir, se puede iniciar o terminar la reacción al prender o apagar la luz UV, además de evitar inhibición de la enzima por el  $H_2O_2$ . El sistema que conforma al biosensor fue inmovilizado en superficies planas de sílica ( $SiO_2$ ) ya que otros autores han reportado un aumento en la estabilidad de las enzimas al inmovilizarlas en soportes sólidos. Además de que estas superficies funcionan como modelo para un posterior estudio del confinamiento del sistema en materiales mesoporosos (no realizado en este trabajo) y en donde no se ha reportado actividad utilizando nanopartículas como activador enzimático, muy probablemente a que no se han encontrado las condiciones ideales de inmovilización.

Tomando en cuenta lo anterior, en esta tesis se estudiaron las condiciones experimentales necesarias para poder desarrollar un biosensor formado por enzimas peroxidasas y nanopartículas semiconductoras de CdS inmovilizadas en superficies planas de sílica, mediante la obtención de las cinéticas de adsorción de cada componente del sistema utilizando una microbalanza de cuarzo (QCM).

Para lograr este objetivo, en primer lugar se sintetizaron las nanopartículas de CdS por la metodología de micelas reversas, realizando posteriormente una caracterización del tamaño tanto de éstas como de la cloroperoxidasa.

A continuación el sistema fue inmovilizado sobre superficies planas de sílica, las cuales fueron silanizadas con 3 aminopropil trietoxisilano, posteriormente funcionalizadas con glutaraldehído, seguido de la inmovilización de las nanopartículas y la cloroperoxidasa. Finalmente se midió la actividad enzimática a través de la oxidación de Amplex Red (sustrato cromofórico), encontrándose una actividad con nanopartículas inmovilizadas 4.62 veces mayor a la actividad presentada en solución.

Al terminar la reacción y realizar lavados sobre la superficie de sílica con el sistema inmovilizado, la mayoría de la masa adsorbida previamente se desprendió, por lo que el sistema no presentó estabilidad después de la oxidación.

## Abstract

Sulfur compounds in fuels can corrode oil ducts and in general may interfere in the quality of distillates. This makes them harmful to the environment and has therefore triggered the development of technologies for sulfur quantification at ultra low concentrations (>1 ppb). However, the use of some of these technologies requires high investment in equipment and maintenance, which has motivated the development of alternatives. A possibility is quantification through an enzymatic process, using peroxidases in order to detect such compounds.

In this thesis a biosensor was assembled and studied. A biosensor is an analytic instrument which function is determining specific compound concentrations. This specific biosensor used chloroperoxidase from the fungus *Caldariomyces fumago* to oxidize a model substrate as well as CdS semiconductor nanoparticles to activate the chloroperoxidase through UV light radiation (substituting H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). This system was immobilized on planar surfaces of SiO<sub>2</sub> which function as a model for a posterior confinement of the system on mesoporous materials (not done in the present work), due to the fact that other authors have observed an increased stability of the enzymes when immobilized in a solid support, nevertheless no activity was reported using nanoparticles as an enzymatic activator which has the advantage of making the reaction modulable, that is, the reaction can start or finish when turning the UV light on or off.

Necessary experimental conditions were studied in order to develop an enzyme / CdS nanoparticles immobilized system with the objective of optimizing the conditions to generate biosensors for the detection of sulfur compounds. Adsorption kinetics of each of the system's compounds was measured using a quartz micro balance (QCM).

CdS nanoparticles were synthesized using the reverse micelle method, and a characterization of nanoparticle and chloroperoxidase size was later performed.

The system was immobilized on planar silica surfaces, which were silanized with 3-aminopropyl triethoxysilane. Next, these surfaces were functionalized with glutaraldehyde and subsequently the immobilization of nanoparticles and chloroperoxidase was performed.

Finally, the enzymatic activity was measured through Amplex Red (chromophoric substrate) oxidation. The system with immobilized nanoparticles had an enzymatic activity 4.62 times larger than that present in solution.

Following the reaction, the planar silica surfaces with the immobilized system were washed with the reaction buffer and most of the previously adsorbed mass detached from the surface, indicating that the system did not present stability after oxidation.

## Índice de tablas y figuras

|   |             |
|---|-------------|
| <b>Figura 1.</b> Esquema molecular del grupo hemo de las peroxidasas y diagrama de cinta de una cloroperoxidasa   | <b>-6-</b>  |
| <b>Figura 2.</b> Ciclo catalítico de las peroxidasas  | <b>-7-</b>  |
| <b>Tabla 1.</b> Espectro de emisión de distintos QDs  | <b>-12-</b> |
| <b>Figura 3.</b> Representación esquemática de una nanopartícula semiconductora punto cuántico (QD)   | <b>-12-</b> |
| <b>Tabla 2.</b> Características de sistemas peroxidasas – nanopartículas estudiados previamente   | <b>-15-</b> |
| <b>Figura 4.</b> Descripción del nanofotobiocatalizador   | <b>-17-</b> |
| <b>Figura 5.</b> Idealización del funcionamiento del sistema del nanofotobiocatalizador inmovilizado en un material mesoporoso  | <b>-19-</b> |
| <b>Figura 6.</b> Partes de la microbalanza de cuarzo (QCM)  | <b>-21-</b> |
| <b>Figura 7.</b> Montaje de la palangana de vidrio y la microbalanza de cuarzo  | <b>-21-</b> |
| <b>Figura 8.</b> Funcionamiento de la QCM   | <b>-24-</b> |
| <b>Figura 9.</b> Función de correlación para partículas pequeñas y grandes con respecto al tiempo   | <b>-26-</b> |
| <b>Figura 10.</b> Diagrama de Jablonski   | <b>-28-</b> |
| <b>Figura 11.</b> Diagrama de ángulo de contacto  | <b>-29-</b> |
| <b>Figura 12.</b> Distribución de tamaño por volumen de las nanopartículas de CdS   | <b>-41-</b> |
| <b>Figura 13.</b> Espectro de emisión de fluorescencia de las nanopartículas de CdS   | <b>-42-</b> |
| <b>Figura 14.</b> Espectro de emisión de fluorescencia de triptófanos de la CPO   | <b>-43-</b> |
| <b>Figura 15.</b> Distribución de tamaño por volumen de la CPO  | <b>-44-</b> |
| <b>Figura 16.</b> Espectros de absorción infrarroja de superficies limpiadas con el método químico (siloxano) y con el método químico y activación con plasma (silanol) | <b>-45-</b> |
| <b>Tabla 3.</b> Ángulos de contacto promedio de los diferentes tratamientos de limpieza   | <b>-45-</b> |
| <b>Figura 17.</b> Espectros de absorción infrarroja de los diferentes tratamientos de funcionalización desde fase vapor   | <b>-47-</b> |
| <b>Figura 18.</b> Efecto del agua sobre la silanización   | <b>-47-</b> |
| <b>Tabla 4.</b> Promedio de los ángulos de contacto medidos en los tratamientos de funcionalización desde fase vapor  | <b>-48-</b> |
| <b>Figura 19.</b> Espectros de absorción infrarroja de superficies con glutaraldehído a diferentes tiempos de funcionalización  | <b>-50-</b> |

|  |             |
|--|-------------|
| <b>Figura 20.</b> Estructura molecular del glutaraldehído  | <b>-50-</b> |
| <b>Tabla 5.</b> Promedio de los ángulos de contacto medidos en los tiempos de funcionalización con glutaraldehído                              | <b>-51-</b> |
| <b>Figura 21.</b> Adsorción de glutaraldehído sobre una superficie silanizada  | <b>-52-</b> |
| <b>Figura 22.</b> Zoom de los primeros 120 minutos de la adsorción de glutaraldehído sobre una superficie silanizada                           | <b>-53-</b> |
| <b>Figura 23.</b> Acercamiento de los lavados durante la adsorción de glutaraldehído sobre una superficie silanizada                           | <b>-54-</b> |
| <b>Figura 24.</b> Efecto del cambio de amortiguador en la estabilidad del glutaraldehído adsorbido   | <b>-55-</b> |
| <b>Figura 25.</b> Cinéticas de adsorción de glutaraldehído sobre silano a diferentes pH  | <b>-55-</b> |
| <b>Figura 26.</b> Adsorción de nanopartículas sobre glutaraldehído   | <b>-57-</b> |
| <b>Figura 27.</b> Acercamiento del inicio de la adsorción de nanopartículas sobre glutaraldehído   | <b>-58-</b> |
| <b>Figura 28.</b> Acercamiento de los lavados durante la adsorción de nanopartículas sobre glutaraldehído                                      | <b>-58-</b> |
| <b>Figura 29.</b> Sitio activo y grupos amino libres de la CPO   | <b>-60-</b> |
| <b>Figura 30.</b> Cinética de adsorción de la CPO sobre la capa de nanopartículas  | <b>-61-</b> |
| <b>Figura 31.</b> Acercamiento de los primeros 200 minutos de la adsorción de CPO  | <b>-62-</b> |
| <b>Figura 32.</b> Acercamiento de los lavados posteriores a la adsorción de CPO  | <b>-62-</b> |
| <b>Figura 33.</b> Cambio de amortiguador de pH 3 a pH 6 para la subsecuente prueba de actividad enzimática                                     | <b>-63-</b> |
| <b>Figura 34.</b> Curva estándar normalizada de conversión de Amplex Red (UV-Vis)  | <b>-64-</b> |
| <b>Figura 35.</b> Seguimiento de la absorbancia de la resorufina en la reacción en solución  | <b>-65-</b> |
| <b>Figura 36.</b> Acercamiento del cambio de la absorbancia de la resorufina en la reacción en solución utilizando nanopartículas de CdS y CPO | <b>-65-</b> |
| <b>Figura 37.</b> Espectro de absorbancia después de la oxidación de Amplex Red con el sistema inmovilizado (UV – Vis)                         | <b>-66-</b> |
| <b>Tabla 6.</b> Porcentajes de oxidación en las reacciones en solución y con el sistema inmovilizado   | <b>-67-</b> |
| <b>Figura 38.</b> Seguimiento del cambio de frecuencia durante los lavados después de la oxidación de Amplex Red                               | <b>-68-</b> |
| <b>Figura 39.</b> Cambio de la disipación promedio de las superficies durante los pasos de inmovilización                                      | <b>-69-</b> |

## Contenido

|  |        |
|--|--------|
| Agradecimientos .....  | iii    |
| Resumen .....  | iv     |
| Abstract.....  | vi     |
| Índice de tablas y figuras .....   | viii   |
| 1. Introducción.....   | - 1 -  |
| 2. Antecedentes.....   | - 5 -  |
| 2.1. Biosensores .....   | - 5 -  |
| 2.2. Peroxidasas (Número EC 1.11.1.X).....   | - 6 -  |
| 2.3. Sistemas Inmovilizados .....  | - 8 -  |
| 2.4. Nanopartículas .....  | - 10 - |
| 2.5. Sistemas Enzimas – Nanopartículas .....                                       | - 12 - |
| 2.6. Antecedentes Directos.....  | - 16 - |
| 2.7. Técnicas Analíticas.....  | - 20 - |
| 2.7.1. Microbalanza de Cuarzo.....   | - 20 - |
| 2.7.2. Espectroscopía Infrarroja (IR).....   | - 25 - |
| 2.7.3. Dispersión Dinámica de Luz.....   | - 26 - |
| 2.7.4. Espectroscopía Ultravioleta – Visible (UV).....                             | - 27 - |
| 2.7.5. Fluorimetría.....   | - 28 - |
| 2.7.6. Ángulo de contacto .....  | - 29 - |
| 3.1. Justificación.....  | - 30 - |
| 3.2. Hipótesis.....  | - 31 - |
| 3.3. Objetivos .....   | - 32 - |
| 3.3.1. Objetivo General .....  | - 32 - |
| 3.3.2. Objetivos particulares .....  | - 32 - |
| 4. Metodología.....  | - 33 - |
| 4.1. Sinopsis.....   | - 33 - |
| 4.2. Síntesis de nanopartículas y caracterización de nanopartículas y enzimas..... | - 35 - |

|           |   |               |
|-----------|---|---------------|
| 4.3.      | Limpieza de superficies .....   | - 36 -        |
| 4.4.      | Funcionalizaciones e inmovilizaciones.....  | - 37 -        |
| 4.5.      | Evaluación de la actividad y estabilidad del sistema.....                         | - 39 -        |
| <b>5.</b> | <b>Resultados y discusión .....</b>   | <b>- 41 -</b> |
| 5.1.      | Síntesis de nanopartículas de CdS y caracterización de nanopartículas y CPO ..... | - 41 -        |
| 5.2.      | Limpieza y funcionalización con plasma .....                                      | - 44 -        |
| 5.3.      | Funcionalizaciones .....  | - 46 -        |
| 5.3.1.    | Silanización .....  | - 46 -        |
| 5.3.2.    | Funcionalización con glutaraldehído.....  | - 49 -        |
| 5.4.      | Inmovilizaciones .....  | - 57 -        |
| 5.4.1.    | Inmovilización de nanopartículas.....   | - 57 -        |
| 5.4.2.    | Inmovilización de CPO .....   | - 60 -        |
| 5.5.      | Actividad enzimática del sistema CPO - nanopartículas .....                       | - 64 -        |
| 5.6.      | Estabilidad del sistema .....   | - 67 -        |
| <b>6.</b> | <b>Conclusiones .....</b>   | <b>- 70 -</b> |
| <b>7.</b> | <b>Perspectivas .....</b>   | <b>- 72 -</b> |
|           | Glosario y abreviaturas .....   | - 73 -        |
|           | Referencias .....   | - 77 -        |
|           | ANEXO : Capítulo aceptado para publicación. ....                                  | - 84 -        |

## 1. Introducción

El petróleo mexicano es considerado de baja calidad debido a su alto contenido de azufre, por lo que para mejorar la calidad es necesario limitar dicho contenido. Todos los petróleos conocidos contienen azufre en proporciones entre 0.03 y 4%, siendo el 70% de éste proveniente del dibenzotiofeno (DBT) y sus derivados [1]. Los compuestos azufrados causan corrosión en oleoductos, producen mal olor e interfieren en general en la calidad de los destilados. A su vez, resultan dañinos para el medio ambiente debido a que son precursores de la lluvia ácida, causando graves problemas en lagos, suelos y edificaciones urbanas [2].

Por estas razones, las legislaciones internacionales al respecto han aumentado los requisitos para el contenido azufre en el combustible diesel, teniendo un límite superior de 15 ppm en Estados Unidos de América y de 10 ppm en la Unión Europea; en México este límite es de 80 ppm con un promedio de 30 ppm para la gasolina Premium (2006) y Magna (2008) [3]. Esta tendencia a límites menores en el contenido de azufre ha provocado la aplicación de nuevas tecnologías para la eliminación del azufre del petróleo, como puede ser la hidrodesulfurización [4], desulfuración oxidativa [5] y adsorción reactiva [6], así como la oxidación biocatalítica. Esta última no se utiliza comercialmente debido principalmente a las bajas velocidades de reacción, la baja estabilidad de las enzimas y la gran cantidad de agua requerida en el proceso [1].

Los compuestos azufrados presentes en los derivados del petróleo remanentes de los procesos de desulfurización son heterocíclicos recalcitrantes de muy poca solubilidad en agua [7]. Su presencia afecta la calidad del derivado y por tanto su precio.

La tendencia hacia la disminución de azufre en combustibles también ha hecho uso de técnicas analíticas para la cuantificación del mismo a concentraciones ultrabajas (hasta 1 ppb), tales como la dispersión de energía con rayos X (XRF), las cintas de acetato de plomo, la fluorescencia (UVF) y la cromatografía de gases [8]. Sin embargo, el uso de estas tecnologías para la determinación de azufre requiere una inversión muy elevada en equipo y mantenimiento, lo cual motiva el desarrollo de nuevas técnicas de análisis. Una alternativa es la cuantificación a través de un proceso enzimático, utilizando peroxidasas para detectar

dichos compuestos azufrados, sin la necesidad de hacer un tratamiento previo de las muestras, de mayor especificidad y facilidad de uso y de ser posible, a un menor costo. Estas características hacen de este método de determinación de azufre un proceso más accesible para los sectores energético, de salud, de alimentos, de calidad ambiental y de generación de combustibles del país. Debido al uso de un elemento biológico de reconocimiento como son las peroxidasas, el sistema a desarrollar puede definirse como un biosensor.

Las peroxidasas son enzimas que han sido utilizadas en biosensores como catalizadores para la oxidación de un sustrato cromofórico como una forma indirecta para cuantificar otro analito y también para cuantificar en forma directa analitos [9], presentando ventajas inherentes a las enzimas como son una alta especificidad y selectividad. Sin embargo, una importante limitación del uso comercial de peroxidasas es su baja estabilidad debido a diferentes aspectos como desactivación del grupo hemo y desnaturalización [10]. La inmovilización de enzimas al interior de un poro o en una superficie con características físico químicas especiales como las de los materiales mesoporosos, ha permitido mejorar su desempeño y producir biocatalizadores que se adaptan a condiciones industriales o requerimientos comerciales [11].

El uso de estas enzimas presenta otra limitación al requerir del peróxido de Hidrógeno como cofactor, el cual eleva el costo de la determinación del analito y puede llevar a la inhibición de la actividad enzimática [12]. A este respecto se han utilizado nanopartículas para generar especies de Oxígeno reactivas a través de irradiación con luz ultravioleta [13], que a su vez pueden activar enzimas consumidoras de Oxígeno [14-15], eliminando de esta manera la necesidad de utilizar el peróxido de Hidrógeno.

El Dr. Eduardo Torres y sus colaboradores [1, 7-10, 16, 30, 38] han realizado estudios y reportado resultados de la combinación de nanopartículas semiconductoras de CdS con la enzima citocromo P450, generando un novedoso nanobiocatalizador activado por luz con capacidades de oxidar selectivamente moléculas orgánicas azufradas [14, 16]. La activación por luz no sólo ha sido reportada para los citocromo P450, sino también para otras peroxidasas [15].

Una metodología que este grupo ha aplicado recientemente a la mejora de la estabilidad de las peroxidases, citocromo P450 y acetilcolinesterasa, y que ha sido reportada también para otras enzimas, es su inmovilización en materiales mesoporosos del tipo SBA-15 y SBA-16 (Santa Barbara Amorphous type material) y MCM-41 (Mobil Crystalline Materials) [17 – 20].

Hasta el momento los resultados para la creación de los nanofotobiocatalizadores han sido satisfactorios. Sin embargo, se han detectado problemas en la selección de las condiciones ideales de inmovilización, como son densidad superficial de enzima, competencia de las enzimas por los sitios superficiales disponibles, inactividad superficial por cambios conformacionales, entre otros factores; así como en la selección de las condiciones experimentales ideales para maximizar la actividad de las enzimas. Éste es el enfoque de la presente tesis, teniendo como objetivo lograr en superficies modelo de un material mesoporoso (superficies planas de sílica) la óptima inmovilización y el mantenimiento de la actividad en sistemas inmovilizados de peroxidases – nanopartículas de CdS.

En el capítulo 2 de esta tesis se exponen los antecedentes a este proyecto, incluyendo una definición y descripción del uso de biosensores; características, mecanismo de reacción, ventajas y desventajas del uso de peroxidases; características y uso de sistemas enzimáticos inmovilizados; definición y uso de nanopartículas como activadoras en sistemas enzimáticos; así como la exposición de los antecedentes directos del grupo de investigación sobre este proyecto. Finalmente, se describen las técnicas más importantes utilizadas en la realización de esta tesis.

En el capítulo 3 se presentan la justificación, objetivos e hipótesis manejados en esta tesis, mientras que en el capítulo 4 se presenta una breve sinopsis de la metodología, seguido de un diagrama de flujo y la definición de cada uno de los pasos de la metodología que fue utilizada para cumplir con los objetivos.

En el capítulo 5 se exponen y analizan los resultados obtenidos al seguir la metodología, llegando al capítulo 6 para dar conclusiones a esta tesis, y el capítulo 7, donde se exploran las perspectivas a futuro para este proyecto. Finalizando con las referencias utilizadas, y un anexo con el capítulo “Enhanced functionality of peroxidases by its immobilization at the solid – liquid interface of mesoporous materials and nanoparticles” por José Campos-Terán, Iker Iñarritu, Jorge Aburto, Eduardo Torres; en el libro “Proteins in

solution and at interfaces: Methods and Applications in Biotechnology and Materials Science”, ISBN: 9780470952511. De la serie “On Surface and Interfacial Chemistry”, Editorial John Wiley & Sons, Inc. Editores: Juan M. Ruso Beiras y Ángel Piñeiro Guillén. Aceptado para su publicación en Diciembre del 2011.

## 2. Antecedentes

### 2.1. Biosensores

Un biosensor es un dispositivo que incorpora un elemento biológico sensible conectado a un transductor, el cual convierte el cambio físico o químico observado a una señal cuantificable. Los biosensores tienen la propiedad de ser muy específicos, además de ser de fácil manejo. Sin embargo, su baja estabilidad los hace ser costosos ya que normalmente se desechan o sirven para muy pocos ensayos. Por esto, el principal problema a resolver en el desarrollo de biosensores es el aumento en la estabilidad operacional y de almacenamiento.

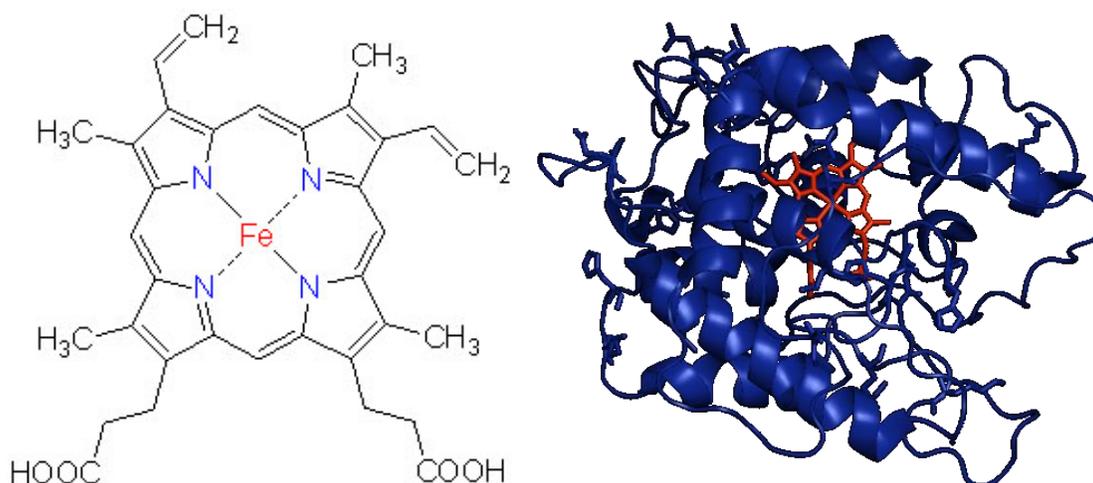
En este sentido, es particularmente interesante la combinación de nanomateriales con estructuras biológicas (ADN, proteínas, lípidos, carbohidratos, etc.), para producir los llamados nanobiomateriales. Esta rama se conoce como nanobiotecnología [21]. Los nanobiomateriales han mostrado conservar las propiedades estructurales, de reconocimiento, de transporte y las propiedades catalíticas de las biomoléculas, pero también conservan las propiedades fisicoquímicas de los nanomateriales, como son una mayor área superficial y confinamiento cuántico, entre otros. Lo anterior ha generado una gama de materiales con gran potencialidad de aplicación. Estos sistemas novedosos, que se pueden clasificar como nanohíbridos, muestran no sólo las propiedades que por separado cada componente tiene, sino también capacidades y aplicaciones que sólo la sinergia nanomaterial – biomolécula puede lograr. De ahí que las estructuras biológicas conjugadas con nanomateriales han abierto un gran campo de investigación científica y tecnológica [22, 23].

En el caso de esta tesis, el elemento biológico utilizado es una enzima, en particular la cloroperoxidasa (CPO) del hongo *Caldariomyces fumago*. En la siguiente sección se hace una descripción general de las peroxidasas y su uso en biocatálisis.

## 2.2. Peroxidasas (Número EC 1.11.1.X)

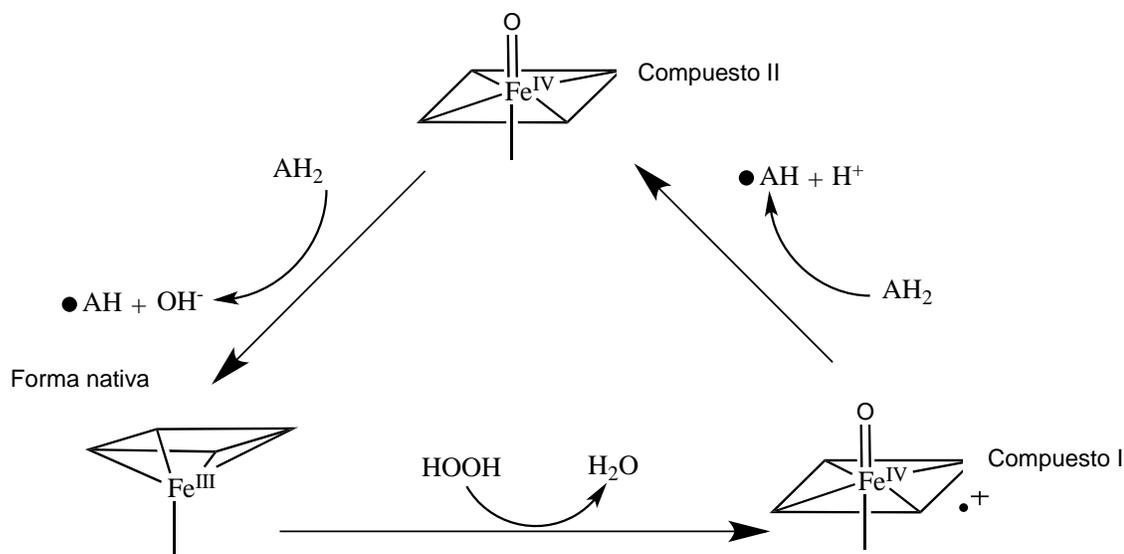
Existen dos aspectos importantes que dominan el interés actual por el uso de transformaciones catalítico oxidativas en la industria. El primero es el reemplazo de oxidaciones que usan una cantidad estequiométrica de sales de metales pesados por procesos catalíticos que usan peróxido de Hidrógeno u Oxígeno como oxidantes. El segundo aspecto de interés, es la necesidad de alta quimio, regio o enantioselectividad a fin de mejorar el rendimiento químico y minimizar flujos de residuos [24]. A este respecto, las enzimas son excelentes biocatalizadores con alta especificidad, selectividad y eficiencia, por lo que su uso es atractivo desde el punto de vista industrial. En particular, las peroxidasas son enzimas que pueden encontrarse en todos los sistemas biológicos y son potenciales biocatalizadores adecuados para cumplir estos objetivos [25-26].

La mayoría de las peroxidasas son hemoproteínas que enlazan una protoporfirina de hierro IX en el sitio activo (ver Figura 1); pero también hay varias no hemo peroxidasas que contienen metales (vanadio-haloperoxidasas, manganeso-catalasas) o grupos funcionales libres de metal como las tiol peroxidasas o alquil hidroperoxidasas [27]. Las peroxidasas utilizan peróxido de Hidrógeno ( $H_2O_2$ ) o hidroperóxidos orgánicos (ROOH) como cosustratos que aceptan electrones al tiempo que oxidan una variedad de compuestos.



**Figura 1.** Izquierda) Esquema molecular de protoporfirina de hierro IX, el grupo hemo de las peroxidasas. Derecha) Diagrama de cinta de una cloroperoxidasa con el grupo hemo mostrado en color rojo. Tomada del capítulo incluido en el anexo

El mecanismo de reacción de las peroxidasas puede describirse en términos generales de la siguiente manera [28] (Figura 2): el grupo hemo de la enzima reacciona primero con una molécula de peróxido de Hidrógeno para producir el compuesto I. Este compuesto es un oxo-ferril (IV) – radical porfirina o un oxo-ferril (IV)–radical proteína, que están dos equivalentes de oxidación por arriba del estado férrico. Durante este paso de reacción, el peróxido de Hidrógeno se reduce a agua, mientras que la enzima se oxida. Luego el compuesto I oxida al sustrato reducido ( $AH_2$ ) para dar un radical sustrato ( $AH^\bullet$ ), y se reduce al compuesto II, que contiene un centro oxiferril coordinado a la porfirina. Usualmente, ambos compuestos, I y II, reaccionan con el mismo  $AH_2$ . Por lo tanto, una vez que inicia la reacción entre el compuesto I y  $AH_2$ , se produce el compuesto II que reacciona simultáneamente con una segunda molécula de  $AH_2$ . Como resultado, el compuesto II se reduce nuevamente al estado férrico que corresponde a la forma nativa de la enzima, con la oxidación acoplada de una segunda molécula de sustrato y producción de agua.



**Figura 2.** Ciclo catalítico de las peroxidasas, se muestra el grupo hemo que es el sitio catalíticamente activo de la enzima. Tomada del capítulo incluido en el anexo.

A través de este mecanismo general, las peroxidases catalizan varias reacciones de oxidación de relevancia industrial como las oxidaciones enantioselectivas de sulfuros, la de alquenos disustituidos y de epoxialcoholes racémicos [29]. También catalizan oxidaciones de contaminantes como tintes azo, plaguicidas e hidrocarburos policíclicos aromáticos a productos menos tóxicos y más degradables [30-31]. Además, las peroxidases han sido empleadas con frecuencia en biosensores como catalizador final para la oxidación de un sustrato cromofórico como una forma indirecta para cuantificar otro analito y también para cuantificar en forma directa analitos como hidrocarburos aromáticos policíclicos, plaguicidas y fenoles. El uso de peroxidases para catalizar las reacciones de inserción de Oxígeno selectivas por lo general da lugar a un ahorro de energía, costos de operación más bajos, mayor seguridad y emisiones de contaminantes reducidas. Al usarse en biosensores, las peroxidases muestran alta selectividad y señales de amplificación elevadas para la detección de concentraciones ultra bajas (hasta 1 ppb) de analitos [9].

Sin embargo, una importante limitación del uso comercial de peroxidases es su baja estabilidad debido a diferentes aspectos como desactivación del grupo hemo, modulación del potencial redox, desnaturalización y disponibilidad de sustrato [10]. Por lo tanto, es necesario encontrar enzimas más robustas para su eventual explotación comercial o mejorar la estabilidad mediante su inmovilización, por ejemplo, en soportes sólidos. En el presente trabajo, nos enfocamos a comprender los factores que afectan la inmovilización de la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* en soportes sólidos.

### **2.3. Sistemas Inmovilizados**

La posibilidad de usar enzimas en la industria o laboratorio está seriamente limitada debido al elevado costo y baja estabilidad de la mayoría de las mismas [32]. Las enzimas ligadas a soportes sólidos pueden superar algunas de estas limitaciones para lograr el uso económico y generalizado de éstas como biocatalizadores a nivel comercial. [33]. De esta manera se puede mejorar la estabilidad de las enzimas, así como facilitar su separación y recuperación para reuso, al mismo tiempo que se mantiene la actividad y selectividad. Una

enzima inmovilizada se define como un sistema que consta de dos componentes esenciales: el componente estructural no catalítico (soporte) y el componente funcional catalítico, la enzima. Por lo tanto, una enzima inmovilizada se debe caracterizar por dos conjuntos de variables, los parámetros catalíticos y no catalíticos [35]. A este respecto, sin importar el método seleccionado para inmovilización, se deben cumplir dos necesidades esenciales para una aplicación dada: la catalítica, expresada en la productividad, la estabilidad y la selectividad; así como la no catalítica, es decir la separación, el control, los procesos posteriores, etc.

Se ha descrito una variedad de soportes para proteínas, cada uno con ventajas y desventajas asociadas, por ejemplo: preparados sol-gel, hidrogeles, micropartículas orgánicas y soportes inorgánicos no porosos y porosos. Los últimos han probado ser eficaces para mejorar la funcionalidad de las enzimas, como en la inmovilización en materiales mesoporosos [34]. La inmovilización de enzimas al interior de un poro o en una superficie con características físicoquímicas especiales como las de los materiales mesoporosos, ha permitido mejorar el desempeño de las mismas y producir biocatalizadores más robustos que se adaptan a condiciones industriales o requerimientos comerciales [11].

Estos materiales se sintetizan mediante la polimerización de silicios en micelas alineadas en forma regular y la eliminación subsecuente de la plantilla por extracción o calcinamiento. De acuerdo a la clasificación de IUPAC, los materiales que contengan poros con diámetros entre 2 y 50 nm se denominan materiales mesoporosos. El término “nanoporosos” también se usa para describir estos materiales, aunque sólo los definen así por el hecho de tener poros en el rango nanométrico. Los materiales mesoporosos han atraído la atención de la comunidad científica debido a sus estructuras porosas ordenadas con distribuciones de poros estrechos y paredes gruesas, que les dan gran estabilidad, altos volúmenes de poros y áreas superficiales [36]. Las estructuras mesoporosas grandes y regulares de los silicatos mesoporosos ofrecen la posibilidad de adsorber en sus poros o superficies moléculas grandes como ADN, ARN, proteínas o enzimas. Además, dependiendo de las condiciones y precursores químicos usados para su síntesis, pueden obtenerse diferentes morfologías (hexagonales, cúbicas o lamelares), y diferentes tamaños de poro [34, 36].

Existen varias referencias en donde se reporta la inmovilización de enzimas en estos materiales. Díaz y Balkus midieron a través de difracción de rayos X que la peroxidasa de rábano (HRP, 37 x 43 x 64 Å) no se inmovilizaba con éxito, ya que era demasiado grande para caber en los poros del material MCM-41 [37]. Aburto et al., reportaron que la cloroperoxidasa (CPO, 60 x 53 x 46 Å) no se inmovilizaba en cantidades medibles en SBA-16 de tamaño de poro 40 Å. Sin embargo, cuando se incrementaba el tamaño de poro a 90 Å se adsorbían hasta 23 nmol de enzima/g de material. Usando SBA-15, tamaño de poro 67 nm, se logró una carga máxima de 622 nmol CPO enzima/g de material y al incrementar dos veces el tamaño de poro (143 Å), fue posible inmovilizar hasta 5725 nmol CPO/g de material, una carga enzimática 9 veces más alta [38]. Takahashi et al., reportaron un resultado similar para la inmovilización de HRP usando un material FSM (Folded Sheet Material) en donde se inmovilizó seis veces más enzima cuando el tamaño del poro se incrementó de 27 a 89 Å [39]. Dado que el material de silicio contiene una carga negativa general por su bajo punto isoeléctrico (alrededor de 2), es necesario que la enzima porte una carga positiva promedio para una buena interacción electrostática. Sin embargo, se ha reportado que el pH adecuado para la adsorción es el del punto isoeléctrico de la proteína porque proporciona un número apropiado de cargas para interactuar con el material sin causar repulsiones enzima-enzima en la superficie.

## 2.4. Nanopartículas

En la actualidad es posible manipular átomos y moléculas de tamaño nanométrico para crear estructuras de mayor tamaño (llamada tecnología “bottom up”) con propiedades sobresalientes [40]. A este respecto, las nanopartículas semiconductoras inorgánicas, conocidas como puntos cuánticos (QDs, por sus siglas en inglés), han generado considerable interés durante la última década debido a sus propiedades únicas de tamaño ajustable, fuerte luminiscencia y alta fotoestabilidad, así como estabilidad física. Estos nanomateriales tienen aplicaciones potenciales en diversos campos como son el de diagnóstico (bioimagen, bioanálisis, biodetección), entrega de fármacos, micromatrices,

nanoelectrónica y nanofotónica [40-44]. Asimismo, se han utilizado QDs como fotosensibilizadores en reacciones orgánicas [45] y para generar especies de Oxígeno reactivas [13], que a su vez pueden activar enzimas consumidoras de Oxígeno [14-15]. Esto se muestra en las Figuras 3 y 5.

Las nanopartículas semiconductoras coloidales son cristales individuales de unos cuantos nanómetros de diámetro, cuya forma y tamaño se pueden controlar con precisión por la duración, temperatura y moléculas de ligando utilizadas en su síntesis [46-48]. Los QDs están basados en átomos inorgánicos estabilizados por una capa de ligando orgánico. La parte inorgánica está formada por átomos del grupo II (alquilos metálicos, óxidos de metal y sales orgánicas) y del grupo VI (Se, S y Te) [49].

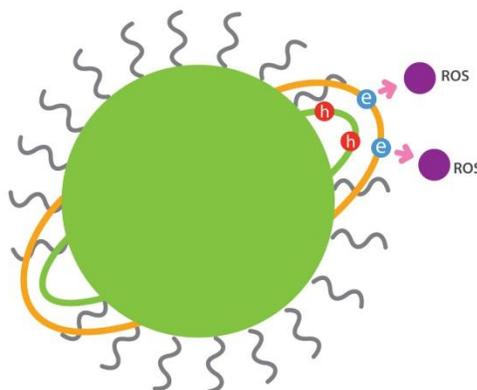
Se han encontrado aplicaciones para los QDs en diversas áreas (e.g., medicina, biología, electrónica y más recientemente, química analítica y catalítica). La razón de su uso en diferentes campos se relaciona con sus propiedades ópticas particulares, como son su amplio espectro de absorción, espectro de emisión muy estrecho y alta fotoestabilidad, que los hacen interesantes en comparación con moléculas orgánicas fluorescentes. Estas propiedades dependen en forma notable del tamaño de la partícula como consecuencia de su confinamiento cuántico, que se da por cambios en la densidad de sus estados electrónicos [50].

En estos fluoróforos la absorción de un fotón resulta en la creación de un par electrón-hueco (es decir, un excitón). Cuando los cristales tienen un tamaño de unos cuantos nanómetros (menor al radio del excitón de Bohr) los niveles de energía se cuantifican con valores directamente relacionados al tamaño del QD. La recombinación radiativa de un excitón da lugar a la emisión de un fotón en una banda de energía estrecha. Sin embargo, defectos en la superficie de la estructura del cristal pueden atrapar en forma temporal el electrón o el hueco, previniendo la recombinación radiativa y reduciendo el rendimiento cuántico (fotones emitidos / fotones absorbidos). Para hacer frente a este problema y para proteger a los átomos de superficie de la oxidación y otras reacciones químicas, se pueden hacer crecer corazas de algunas monocapas de un material con una banda prohibida más amplia (como el sulfuro de zinc ó ZnS) sobre los centros del nanocristal, para obtener puntos cuánticos de núcleo/coraza (por ejemplo, QDs núcleo/coraza CdSe/ZnS) [51]. Este proceso también mejora la fotoestabilidad en varios órdenes de magnitud [52]. La Tabla 1 muestra

que la variación en la composición química y los diámetros de los QDs generan espectros de emisión que cubren todas las regiones del espectro óptico desde UV hasta IR.

**Tabla 1.** Espectro de emisión de distintos QDs. Adaptada de la referencia [51].

| ZnS         | ZnSe        | CdS         | CdSe         | CdTe        | InP         | PbS         |
|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| UV – 420 nm | UV – 450 nm | UV – 510 nm | 490 – 670 nm | 520 nm – IR | 650 nm – IR | 680 nm – IR |



**Figura 3.** Representación esquemática de una nanopartícula semiconductor punto cuántico (QD, en verde) recubierta con ácido mercaptoacético (en gris). Se muestra como los electrones pueden ser transferidos al ambiente, formando especies de Oxígeno reactivas (ROS, en morado). Tomado del capítulo incluido en el anexo.

## 2.5. Sistemas Enzimas – Nanopartículas

Como se mencionó los QDs semiconductores absorben fotones cuando la energía de excitación supera la banda prohibida. Durante este proceso, los electrones son promovidos de la banda de valencia a la banda de conducción, lo cual resulta en la formación de pares electrón-hueco (excitones). Estos pares pueden recombinarse para emitir un fotón, o bien someterse a una transferencia de electrones con el ambiente circundante. Una consecuencia

de esto último es que varios QDs son capaces de generar radicales en un medio acuoso al ser irradiados con luz UV [13]. Esta reacción fotoquímica hace de los QDs candidatos interesantes para la generación de fotocatalizadores cuando se combinan con enzimas capaces de llevar a cabo transformaciones químicas mediante el empleo de especies de radicales libres [53].

Con este concepto, el grupo de Niemeyer ha utilizado nanopartículas de CdS cubiertas con una capa de ácido mercaptoacético (MAA) como donadores directos de electrones para la producción de especies de Oxígeno reactivas (ROS, por sus siglas en inglés) es decir, superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radicales hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) y  $H_2O_2$ ) activando de esta manera diferentes hemoperoxidasas como citocromo P450 (enzima CYP152A1) para conducir la  $\alpha$ - y  $\beta$ -hidroxilación de ácido mirístico [14, 16] y con HRP o citocromo C peroxidasa (CcP) para oxidar varios sustratos de peroxidasa típicos como Amplex Red (N-acetil-3,7-dihidrofenoazina), guayacol (2-metoxifenol), o el 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato de amonio) (ABTS) [15].

De la misma manera que en la inmovilización de peroxidadas, en el uso de QDs hay que considerar factores catalíticos y no catalíticos para el correcto desarrollo del fotocatalizador QD-enzima. Algunos de estos factores son la correcta relación estequiométrica entre QDs y enzimas, tipo de enlace de enzimas, producción de ROS, estabilidad contra irradiación UV,  $H_2O_2$ , temperatura, etc. En general, se han adsorbido enzimas en la superficie de QDs vía interacciones electrostáticas, en donde los grupos amino presentes en algunos aminoácidos de las enzimas interactúan con los grupos carboxilo de los ligandos de cobertura en la superficie de los QDs [54]. En algunos casos, como en el caso de la enzima CYP152A1 [16], esta interacción fue mejorada y dirigida por la presencia de una cola de hexahistidina que interactuó con ligandos de ácido mercaptoacético (MAA) cargados negativamente y presentes en la superficie de las nanopartículas. Por otra parte, también se ha observado que la interacción física entre la enzima y el QD no es esencial para la reactividad acoplada [14,16]. No obstante es importante considerar rutas más sofisticadas de bioconjugación covalente de enzimas con nanopartículas, ya que incrementarán la adsorción y estabilidad de la enzima. Además, esto proveerá un mejor sistema en lo que respecta a reusabilidad. Sin embargo, una

preocupación en esta materia es que la conjugación de QDs con otros elementos podría reducir o inhibir la producción de ROS.

Este mismo grupo investigó el efecto de la conjugación proteína-QD usando QDs de CdS-MAA conjugados a varias proteínas como lisozima, proteasa del virus de mosaico del tabaco (TEV) y CYP152A1 [55]. Encontraron que recubrir las nanopartículas con estas proteínas suprime eficazmente la producción de ROS de vida corta e incrementa la formación de peróxido de Hidrógeno, una especie radical de vida más prolongada. Los autores propusieron un mecanismo para este fenómeno que implica una secuencia de oxidación de aminoácidos por radicales hidroxilo en la presencia de Oxígeno, lo que al final produce peróxido de Hidrógeno. Es interesante que en este estudio se demostró que nanohíbridos de CdS-TEV incrementaron la oxidación del ácido mirístico (mediante CYP152A1 no conjugado a QDs) hasta el doble en comparación con las nanopartículas de CdS por sí solas [55].

Como se mencionó, un factor fotocatalizador importante a considerar es la estabilidad de las enzimas frente a la irradiación UV y el ROS generado. A este respecto, Fruk et al. encontraron que nanopartículas de CdS podían ser pre irradiadas con luz UV como una manera de prevenir daños a las enzimas por exposición directa [15]. Este efecto también fue estudiado usando nanohíbridos de QD-CYP152A1 [16]. Aquí se encontró que la pre irradiación de los nanohíbridos mejora la conversión de sustrato en comparación con muestras no pre irradiadas. Sin embargo, también se observó que después de un cierto tiempo hay un decremento en la conversión de sustrato, lo cual sugiere que se producen mayores cantidades de radicales, lo que muy probablemente inactiva la enzima CYP152A1. De ahí que es importante una optimización de la composición de los nanohíbridos de tal manera que los periodos de irradiación puedan mantenerse lo más corto posible sin reducir las cantidades de radicales necesaria para obtener una conversión de sustrato deseada. Sin embargo, estos autores encontraron otra forma de evitar este problema, simplemente con encender y apagar la fuente de luz UV. En este caso, al considerar la correcta relación estequiométrica de QD:CYP152A1 para producir suficientes radicales en la fase de luz, fue posible obtener una actividad catalítica continua [16]. En la Tabla 2 se muestran algunos ejemplos de sistemas peroxidasas – nanopartículas ya estudiados previamente.

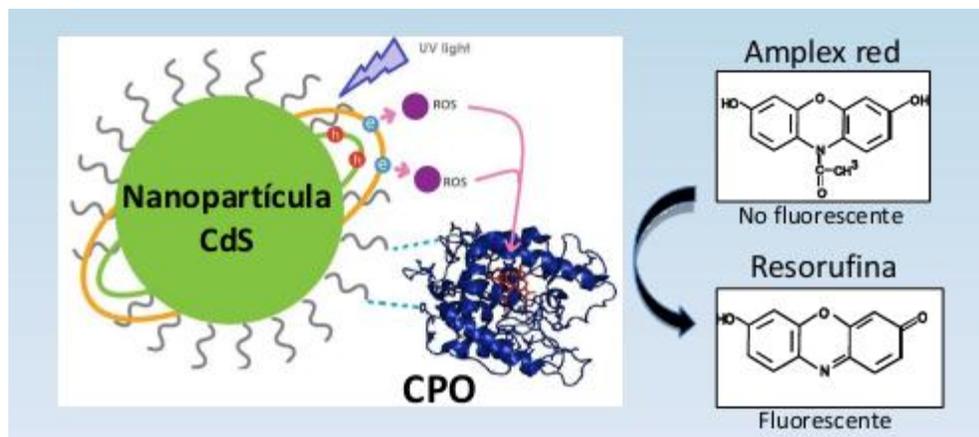
**Tabla 2.** Características de sistemas peroxidasa – nanopartículas estudiados previamente

| QD(s)                    | Sustrato(s)     | Enzima(s)                                   | Técnica                       | Información relevante   | Autores, año                 |
|--------------------------|-----------------|---|-------------------------------|---|------------------------------|
| CdS-MAA                  | Ácido mirístico | Citocromo P450 CYP152A1                     | QD-FRET, Actividad peroxidasa | La kcat de CYP152A1 disminuyó seis veces en nanohíbridos, pero produce cantidades similares de productos de hidroxilación | Ipe et al., 2006 [14]        |
| CdSe/ZnS núcleo/coraza   | Glucosa, ABTS   | GOx y HRP                                   | QD-FRET, Actividad peroxidasa | Alto rango de detección de glucosa (0 – 5 g/L), efectos menores de T, pH, iones.  | Duong et al., 2007 [54]      |
| CdSe/Zns                 | -               | HRP   | QD-CRET                       | CRET reduce decaimiento de fluorescencia  | Wang et al., 2008 [82]       |
| CdSe –sílica mesoporosa  | -               | HRP   | Respuesta electrodo           | Inmovilizado en sílica mesoporosa (MS0029)  | Yang et al., 2011 [80]       |
| CdSe/ZnS                 | -               | HRP   | Respuesta electrodo           | Deposición desde fase vapor de QDs  | Wang et al., 2009 [81]       |
| CdS-MAA                  | Amplex Red      | HRP, Cyt c peroxidasa, mioglobina, CYP152A1 | Actividad peroxidasa          | Activación UV generalmente aplicable a hemo-peroxidasa y posiblemente otras enzimas consumidoras de Oxígeno               | Fruk et al., 2007 [15]       |
| CdS-MAA                  | Ácido mirístico | P450 citocromo CYP152A1                     | Actividad peroxidasa          | Los QDs pueden ser pre irradiados para sustratos sensibles a la luz   | Gandubert et al., 2008 [16]  |
| CdS-MAA, CdS-CM, CdS-TPN | Amplex Red      | HRP   | Actividad peroxidasa          | Aunque cada QD produce un ROS diferente, todos fueron capaces de activar HRP.   | Rajendran, et al., 2009 [53] |
| CdS-MAA-TEV              | Ácido mirístico | CYP152A1                                    | Actividad peroxidasa          | La conjugación de QD con otra enzima eleva la producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y la activación de HRP          | Rajendran, et al., 2010 [55] |

## 2.6. Antecedentes Directos

Tomando en cuenta la capacidad de las peroxidasas y el potencial presentado por las nanopartículas, el grupo de investigación de este proyecto (Dr. Eduardo Torres y Dr. José Campos) ha realizado y reportado resultados de la combinación de nanopartículas semiconductoras de CdS con la enzima citocromo P450, generando un novedoso nanobiocatalizador activado por luz con capacidades de oxidar selectivamente moléculas orgánicas (Figura 4) [16,14]. Por su característica de ser activado por luz, el nanohíbrido no requiere de la adición de cofactores costosos, como lo requiere el citocromo P450 de manera natural (NADH ó nicotinamida adenina dinucleótido, NADPH ó nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; que son coenzimas celulares). En este caso, la luz visible activa a las nanopartículas de CdS, las cuales generan iones hidroxilos y superóxidos. Estos a su vez activan al citocromo P450, llevándolo a estados de oxidación superiores, los cuales tienen la capacidad de oxidar moléculas donadoras de electrones. Cuando la irradiación se realizó en presencia de ácido mirístico, el citocromo P450 fue capaz de catalizar la oxidación a los productos hidroxilados  $\alpha$  y  $\beta$  [16,14].

Así mismo, manipulando la relación estequiométrica entre la enzima y la nanopartícula fue posible alcanzar actividades catalíticas semejantes a las que posee la enzima libre [16]. Este sistema catalítico resulta ser de mucho interés por la potencialidad de sus aplicaciones, dado que los citocromo P450 catalizan diversas reacciones de interés comercial de una manera regio- y estereoselectiva, por esta razón se han utilizado para el desarrollo de fármacos y para la síntesis de productos químicos finos así como en tratamiento de residuos tóxicos [56].



**Figura 4.** Descripción del nanofotobiocatalizador. Se muestra cómo a través de la irradiación con luz UV las nanopartículas pueden crear las especies de Oxígeno reactivas, que activan a la cloroperoxidasa (CPO) para catalizar la oxidación de Amplex red a Resorufina.

La aplicación comercial del citocromo P450 como catalizador ha sido limitada principalmente por dos razones. Una, la necesidad de adicionar cofactores y por otra, la inactivación por peróxido de Hidrógeno, el cual se emplea en sustitución de los cofactores costosos mencionados [57]. Al ser activado por luz el nanohíbrido supera estos dos problemas fundamentales en la catálisis con citocromos P450. La activación por luz no sólo fue reportada para los citocromo P450, sino también para otras peroxidasa [15], lo cual amplía el campo de aplicación de este nanohíbrido, ya que las peroxidasa también catalizan una gran variedad de reacciones interesantes, no sólo desde el punto de vista de síntesis de productos comerciales sino además de aplicación en el tratamiento ambiental [58,59].

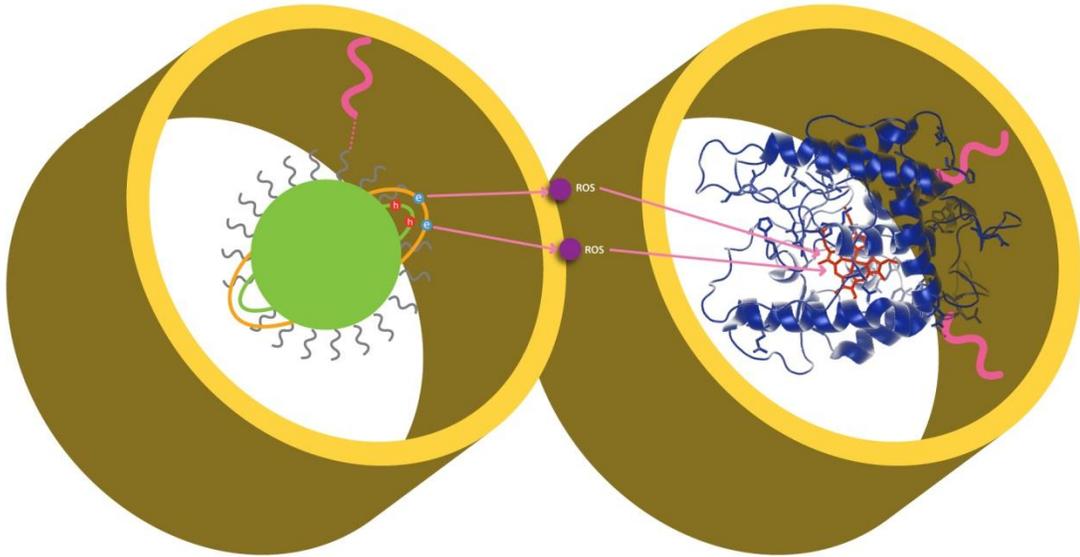
La posterior caracterización del nanofotobiocatalizador, en términos de actividad y estabilidad, mostró que una característica muy atractiva del sistema es la facilidad para modular la actividad catalítica por un simple encendido y apagado de la fuente de luz [57]. Es decir, es posible detener la reacción retirando la lámpara o apagándola, y reiniciarla acercándola o encendiendo la luz nuevamente. Otra característica interesante encontrada fue la de poder realizar una pre-irradiación del sistema para generar suficientes agentes oxidantes, y con la adición posterior del sustrato (ácido mirístico o resorufinas) se llevó a cabo la oxidación. Ambos resultados refuerzan el concepto de haber desarrollado un sistema nanobiocatalítico muy innovador, ya que las reacciones catalizadas por las mismas enzimas en estado libre no son controlables o modulables, así como tampoco es posible pre-activarlas.

Al medir la estabilidad del sistema (mantenimiento de la actividad enzimática) se encontró que el citocromo P450 es dañado por las exposiciones prolongadas a la luz, perdiendo el 50% de su actividad enzimática después de 30 minutos de exposición [16]. La irradiación continua de luz provoca también un incremento en la temperatura del medio de aproximadamente 6 °C, afectando con esto también el funcionamiento biocatalítico del sistema. En conjunto, una desventaja del nanofotobiocatalizador desarrollado es el hecho de que la exposición a la luz y a la temperatura disminuyen considerablemente la actividad catalítica del nanohíbrido, hasta un 60% después de una hora de operación.

Una metodología que se ha aplicado recientemente a la mejora de estabilidad de peroxidasas, citocromo P450 y acetilcolinesterasa, y que ha sido reportada también para otras enzimas, es su inmovilización en materiales mesoporosos del tipo SBA-15, 16 y MCM-41 [18 – 20, 38]. Estos materiales se caracterizan por tener poros de tamaño meso (de 2 a 50 nm de diámetro), los cuales permiten el acceso a su interior de proteínas y otras biomoléculas, para ser inmovilizadas; además, el área superficial es de alrededor de 1000 m<sup>2</sup>/gr de material, lo que permite adsorber, en principio, grandes cantidades de biomaterial. Los materiales mesoporosos han sido utilizados para adsorber metales, vitaminas, biomoléculas, drogas, nanopartículas, etc., por lo que su aplicación como soportes (bio) catalíticos, adsorbentes, y acarreadores de medicamentos se vislumbra como exitosa en el corto y mediano plazo [34,60].

Por otro lado, para los compuestos azufrados presentes en los derivados del petróleo, se están realizando estudios en la construcción de un nanobiosensor compuesto de cloroperoxidasa y nanopartículas de CdS inmovilizada en materiales mesoporosos para la oxidación de estos compuestos, los cuales son sustratos de esta enzima [61]. En este caso, la oxidación selectiva de estos compuestos, sin afectar al resto de compuestos presentes en los combustibles, permite su determinación dado que el producto oxidado emite luz a longitudes de onda características y con mayor rendimiento cuántico; es decir, emiten hasta 200 veces más luz que los compuestos originales.

De esta manera, es posible cuantificar de una forma precisa los compuestos azufrados heterocíclicos dentro de la mezcla compleja del combustible [62,63].



**Figura 5.** Idealización del funcionamiento del sistema del nanofotobiocatalizador inmovilizado en un material mesoporoso. Tomado del capítulo incluido en el anexo.

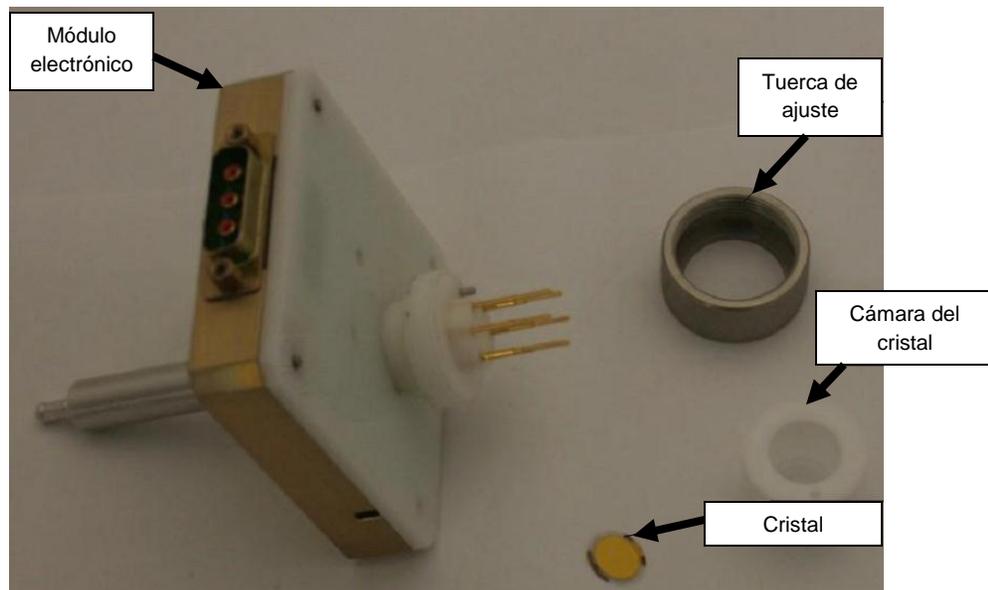
Hasta el momento, los resultados preliminares en la elaboración de los nanofotobiocatalizadores han sido satisfactorios. Sin embargo, se han detectado problemas en la selección de las condiciones ideales de inmovilización, como son la densidad superficial de enzima, la competencia de las enzimas por los sitios superficiales disponibles, desnaturalización por adsorción superficial, etc., así como de la selección de las condiciones experimentales ideales para maximizar la actividad de las enzimas, como son pH, temperatura, presencia de sales, inhibición por productos, etc.

## 2.7. Técnicas Analíticas

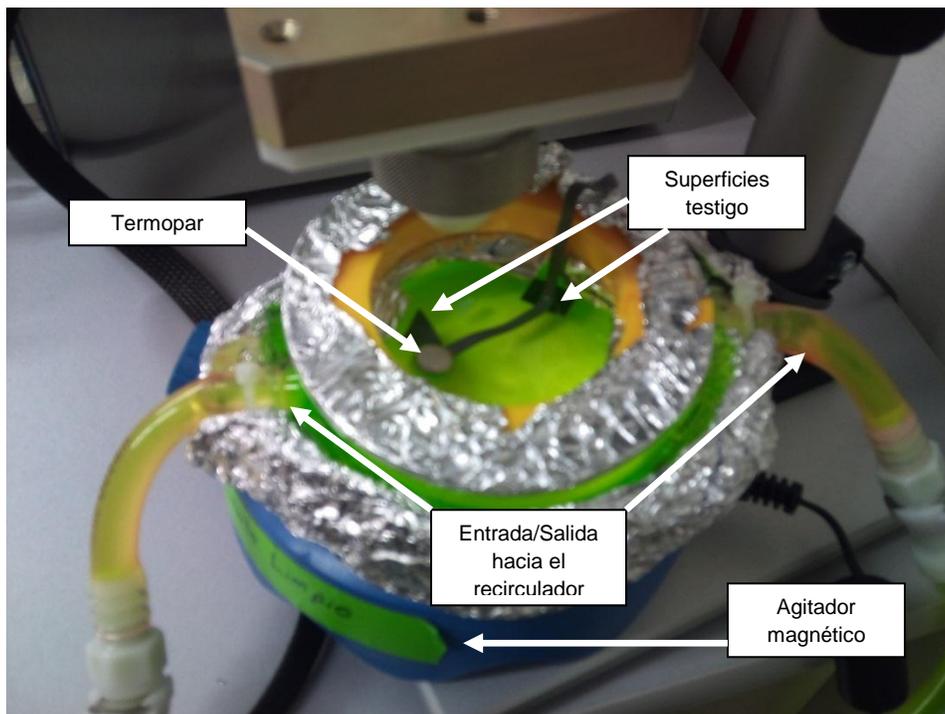
Para poder estudiar tanto el efecto de las condiciones de inmovilización, caracterizar los materiales utilizados, así como para la cuantificación de la actividad enzimática se utilizaron diferentes técnicas analíticas. A continuación se da una breve descripción del principio por el cual funciona cada una de ellas.

### 2.7.1. Microbalanza de Cuarzo

Las interacciones biomoleculares en interfases son un fenómeno muy importante y han recibido una mayor atención en tiempos recientes por su relevancia en los campos de la medicina, biotecnología y tecnología de alimentos. Una estrategia para analizar dichas interacciones une un elemento de reconocimiento molecular a un transductor que convierta una interacción química o biológica a una señal eléctrica. Estos transductores pueden aprovechar distintos fenómenos físicos para detectar compuestos. En los últimos 10 años se ha reconocido la versatilidad y aplicabilidad de sensores de ondas acústicas, como es la microbalanza de cuarzo, ya que permiten el seguimiento de adsorciones *in situ* y proporciona evidencia de cambios conformacionales, fenómenos dinámicos interfaciales, viscoelasticidad y densidad de las películas creadas en tiempo real [96]. En el presente trabajo se utilizó una microbalanza de cuarzo con disipación (QCM-D, por sus siglas en inglés) para analizar las interacciones entre las diferentes partes del biosensor a desarrollar. Las partes y el montaje del equipo se muestran en las Figuras 6 y 7, respectivamente.



**Figura 6.** Partes de la microbalanza de cuarzo (QCM). El módulo electrónico hace vibrar al cristal (protegido por la cámara del cristal) a determinada frecuencia, la cual cambia al adsorberse masa sobre el cristal.



**Figura 7.** Montaje de la palangana de vidrio y la microbalanza de cuarzo. La palangana está conectada a un recirculador para poder controlar la temperatura, medida con el termopar. En la imagen el cristal ya se encuentra dentro de su cámara listo para la medición. También se muestran las superficies testigo dentro de la palangana. La solución donde se inyectan los reactivos va dentro de la palangana, y esto es agitado magnéticamente.

El funcionamiento de la microbalanza se basa en el efecto piezoeléctrico, que ocurre en cristales sin centro de simetría [64]. Cuando se aplica presión al cristal, la red cristalina es deformada de manera que genera un momento dipolo entre las moléculas del cristal. Existen muchos tipos de cristales que presentan el efecto piezoeléctrico, sin embargo las propiedades eléctricas, mecánicas y químicas del cuarzo lo hacen el más utilizado para aplicaciones analíticas [65].

La microbalanza de cuarzo (QCM, por sus siglas en inglés) está compuesta por láminas cortadas de un único cristal, en el caso de las de cuarzo (suelen ser cristales alfa [66]). El cristal se encuentra embebido dentro de dos electrodos que generalmente suelen ser de oro o plata (en el caso de este trabajo son de oro) y son fabricadas por evaporación térmica sobre la superficie de cuarzo. Un campo eléctrico alternante se crea en el cristal al aplicar un diferencial de potencia entre los electrodos. Con este voltaje aplicado la orientación física de la red cristalina es cambiada, resultando así una oscilación mecánica a través del disco de cuarzo a una frecuencia vibracional característica (la frecuencia natural resonante del cristal, que depende de cada disco). Solamente la región del cuarzo que se encuentra entre los electrodos es piezoeléctricamente activa.

En 1959, Sauerbrey propuso una ecuación empírica para describir la sensibilidad másica de una deposición desde fase gaseosa sobre una superficie piezoeléctrica de cuarzo [67]:

$$\Delta m = -\frac{\rho_q \mu_q \Delta F_n}{2f_0^2 nA} = -\frac{C \Delta F_n}{nA} \quad \dots (1)$$

Donde  $\Delta m$  es el cambio de masa, en g;  $\Delta F_n$  es el cambio de frecuencia medido en el sobretono indicado por  $n$ , en Hz;  $f_0^2$  es la frecuencia fundamental resonante, en Hz;  $A$  es el área piezoeléctricamente activa, en  $\text{cm}^2$ ;  $\mu_q$  es el módulo de esfuerzo del cuarzo =  $2.947 \times 10^{11} \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-2}$ ;  $\rho_q$  es la densidad del cuarzo ( $2.648 \text{ g cm}^{-3}$ ); y  $C$  es la constante de sensibilidad másica (específica para cada disco) en  $\text{s}^{-1}$ . En el caso de este estudio, la constante de sensibilidad másica de los discos utilizados es de  $0.177 \text{ s}^{-1}$ .

Esta ecuación está basada en la deposición de capas rígidas infinitesimalmente delgadas, y es la base para el uso analítico de la QCM: al adsorberse física o químicamente

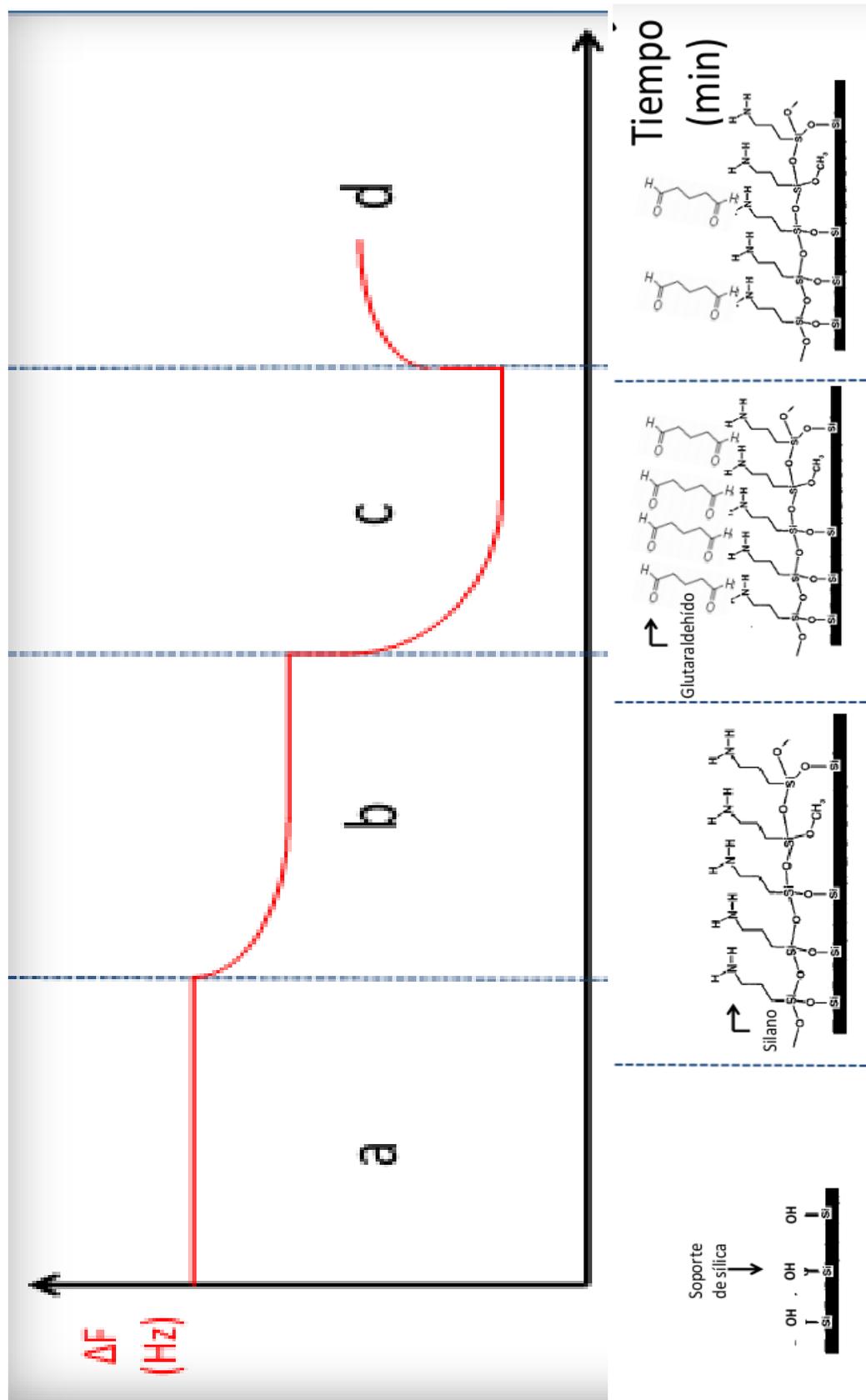
un analito sobre la superficie de cuarzo, se añade masa a la lámina de cristal. Dicho cambio de masa se identifica con el correspondiente cambio en la frecuencia de vibración.

Cabe señalar que esta ecuación fue creada sólo para describir la adsorción de capas rígidas de gases, y en un principio no fue posible utilizar esta técnica para analitos en una solución, ya que el cristal deja de vibrar al ser sumergido. Actualmente se han desarrollado equipos que permiten la inmersión en solución [68] y otros que tienen una cámara especial para permitir el contacto del líquido con sólo uno de los lados de los discos [69]. A su vez, el problema de la no rigidez de los analitos adsorbidos sobre las superficies ha sido enfrentado incluyendo el factor de la disipación en los equipos de medición, esto permite la caracterización de las propiedades viscoelásticas de las películas adsorbidas y de la solución, además de los coeficientes de elasticidad de las superficies; todo lo anterior en tiempo real mediante el análisis de cambios en la frecuencia o disipación de películas delgadas [70].

Los cambios en la frecuencia, masa y grosor se modifican en función de variaciones en tiempo real sobre el sistema, como por ejemplo interacción del disco con soluciones con distinto pH, o con soluciones con concentraciones conocidas de moléculas que interactúan con el material que recubre el disco. Por otra parte, los cambios en la disipación proporcionan información acerca de propiedades como la rigidez de la película. Este parámetro está definido como el cociente entre las energías disipadas y almacenadas por la oscilación en una película viscoelástica, dada por la siguiente ecuación:

$$D = \frac{E_{disipada}}{2\pi E_{almacenada}} \quad \dots (2)$$

Analizando los perfiles cinéticos de estos parámetros, es posible obtener mucha información en tiempo real, acerca de las propiedades de la película, en función de las modificaciones ambientales a las que dicha película sea sometida. En la Figura 8 se presenta una descripción idealizada del comportamiento de las gráficas que se obtienen al medir las cinéticas de adsorción de diferentes analitos en la microbalanza de cuarzo.



**Figura 8. Funcionamiento de la QCM.** a) Estabilidad de la frecuencia al vibrar únicamente el soporte. b) Disminución de la frecuencia al silanizar. c) Disminución de la frecuencia al adsorberse el glutaraldehído. d) Aumento de la frecuencia al realizar un lavado para remover el glutaraldehído que no ha sido correctamente adsorbido.

La microbalanza de cuarzo ha sido utilizada ampliamente en el estudio de la adsorción y actividad de moléculas, polímeros, películas delgadas y enzimas [71 – 73]. Para la inmovilización de los componentes sobre las superficies de cuarzo se utilizan básicamente cuatro técnicas [74, 75]. La primera utiliza el entrecruzamiento a través del glutaraldehído. La segunda involucra uniones covalentes por medio de un silano, la tercera utiliza una matriz para inmovilizar como puede ser un gel o polímero. Finalmente la cuarta técnica involucra la adsorción directa sobre la superficie del cristal. En muchos casos se utiliza una combinación de estos métodos. Es importante también mencionar que independientemente del proceso de inmovilización utilizado, siempre debe limpiarse la superficie del electrodo previo a la inmovilización para remover sustancias que pueden interferir con este proceso.

### 2.7.2. Espectroscopía Infrarroja (IR)

En cuanto a la identificación de compuestos, la espectroscopía infrarroja permite obtener espectros de absorción de compuestos que son un reflejo único de su estructura molecular. El principio por el cual funciona esta técnica es que la energía de los fotones que viajan a estas longitudes de onda (de 2500 a 16000 nm) no es suficiente para excitar a los electrones de las moléculas, pero induce vibraciones en los enlaces covalentes de los compuestos [76].

La frecuencia exacta a la cual ocurre alguna vibración está dada por la fuerza de los enlaces involucrados y la masa de los átomos que constituyen dichos enlaces. Sin embargo, no todas las vibraciones de los enlaces de una molécula se presentarán en el espectro infrarrojo debido a interacciones entre los enlaces que llevan a combinaciones entre tonos y sobretonos de las vibraciones fundamentales de cada enlace.

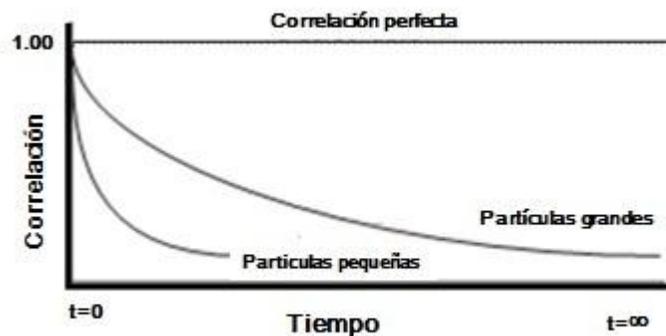
El rango de frecuencias a las que ciertos grupos vibran pueden encontrarse en tablas [76], donde se detalla si dichas vibraciones son de estiramiento ( $4000 - 1450 \text{ cm}^{-1}$ ) o doblado ( $1450 - 600 \text{ cm}^{-1}$ ) de los enlaces. Esto es importante, ya que las vibraciones de doblado son generalmente las que nos ayudan a identificar plenamente un compuesto, por lo que a este rango de frecuencias se le conoce también como región de huella digital [76].

### 2.7.3. Dispersión Dinámica de Luz

Esta técnica mide el movimiento Browniano y relaciona éste al tamaño de las partículas que se analizan. Esto se logra iluminando a las partículas con un láser, analizando las fluctuaciones en la intensidad de la luz dispersada. Las partículas no se encuentran estáticas debido al movimiento Browniano, el cual es provocado por las colisiones aleatorias con el líquido que rodea a las partículas.

Debido al constante movimiento, la intensidad de la luz que es dispersada por las partículas es recibida intermitentemente en un detector (con un ángulo de  $173^\circ$  respecto a la dirección del láser). A través de un correlacionador digital, se compara la intensidad de la luz a diferentes tiempos (con intervalos de nanosegundos). Cada vez que se mide la intensidad, la correlación entre la primera y la enésima medición va disminuyendo con el tiempo, eventualmente llegando a cero.

La relación entre el tamaño de la partícula y su velocidad debida al movimiento Browniano es definida por la ecuación de Stokes – Einstein, la cual establece que a menor tamaño de las partículas, su velocidad será mayor; por lo que se puede inferir que la función de correlación de las partículas pequeñas disminuirá más rápidamente, esto se muestra en la Figura 9. De esta manera, el equipo usa algoritmos para producir una distribución de tamaños por intensidad, la cual puede también ser convertida a una distribución de tamaños por volumen [77].



**Figura 9.** Función de correlación para partículas pequeñas y grandes con respecto al tiempo. Adaptada de [ 77]

#### 2.7.4. Espectroscopía Ultravioleta - Visible (UV)

Los electrones de las moléculas de sustancias orgánicas pueden ser excitados al irradiarlos con luz en el espectro visible y ultravioleta (200 – 800 nm). Esta excitación requiere la absorción de un fotón que cause la transición entre el estado electrónico basal y el excitado. La energía del fotón requerida para llevar a cabo esta transición electrónica depende de cada molécula, y está dada por la longitud de onda de la luz a ser absorbida [79]. El proceso de absorción de luz se ejemplifica en la Figura 10.

La cantidad de luz absorbida es la diferencia entre la radiación del haz incidente ( $I_0$ ) y la radiación transmitida ( $I$ ). La cantidad de luz absorbida es expresada como transmitancia o absorbancia:

$$T = I/I_0 \quad A = -\log T$$

Teniendo en cuenta que la absorción es proporcional al número de moléculas presentes y que la fracción de radiación absorbida es independiente de la intensidad de la radiación, se obtiene la ley de Lambert – Beer:

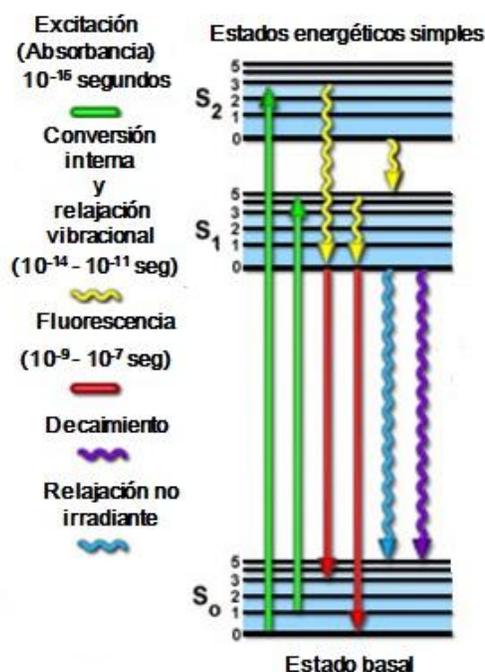
$$A = \epsilon bc$$

Donde  $A$  es la absorbancia de la muestra,  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar en  $M^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ,  $b$  es la longitud de la muestra que tiene que recorrer la luz en cm, y  $c$  es la concentración de la muestra en  $\text{mol dm}^{-3}$  [79].

De esta manera, esta técnica permite por un lado la identificación de compuestos por su característica absorción de luz a determinada longitud de onda, y por otro lado, si se conocen el coeficiente de extinción molar y la longitud de onda de máxima absorbancia (en casos donde se sobreponen los espectros de diferentes compuestos, se puede usar una longitud de onda diferente), se puede conocer la concentración del analito de interés. Este último es el uso más común de la espectroscopía UV – Vis.

### 2.7.5. Fluorimetría

La luminiscencia es la emisión de luz de cualquier sustancia y ocurre desde estados electrónicamente excitados. Se divide formalmente en dos categorías: fluorescencia y fosforescencia, dependiendo de la naturaleza del estado excitado. En estados excitados simples o individuales ( $S_1$ ,  $S_2$ ), el electrón en el orbital excitado es emparejado con el electrón en el orbital del estado basal ( $S_0$ ). El regreso del electrón al estado basal ocurre rápidamente con la emisión de un fotón [78]. La fluorescencia se obtiene típicamente de moléculas aromáticas, y generalmente se conocen sus espectros de emisión, los cuales se representan con una gráfica de la intensidad de fluorescencia versus longitud de onda (nm) o el número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) [78]. Los procesos que ocurren entre la absorción y emisión de luz son generalmente representados con diagramas de Jablonski, como el que se muestra en la Figura 10.

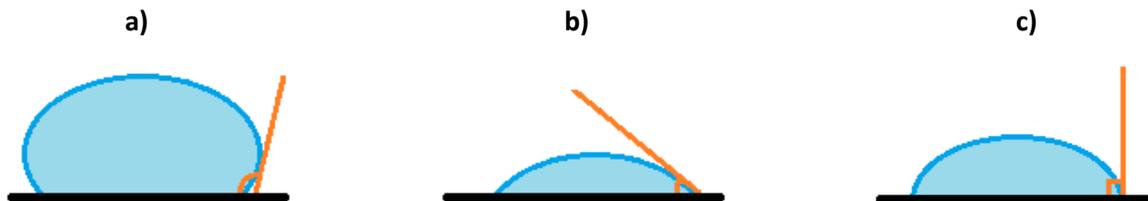


**Figura 10. Diagrama de Jablonski.** Los procesos de absorción (flechas verdes) permiten la caracterización por espectroscopía UV – visible, mientras que los fenómenos de emisión (flechas rojas) nos permiten caracterizar por fluorescencia. Adaptado de [99].

### 2.7.6. Ángulo de contacto

Los materiales sólidos suelen ser caracterizados por su capacidad de ser mojados, es decir la capacidad de lograr que se forme una película de un líquido sobre su superficie. Este es un fenómeno muy importante y comúnmente reportado para aplicaciones tecnológicas como es en la industria de los cosméticos, lubricantes, detergentes, etc; así como también en la inmovilización de enzimas en soportes sólidos.

Para lograr cuantificar este fenómeno se utiliza el ángulo de contacto, el cual es una medida de la capacidad de un sólido de ser mojado por un líquido. Geométricamente está definido como el ángulo formado por el líquido en la frontera interfacial, es decir donde el sólido, el líquido y el gas se intersectan. Esto se muestra en la Figura 11.



**Figura 11.** Diagrama de diferentes ángulos de contacto. **a)**  $\theta > 90^\circ$ , la superficie se considera no mojabable por el líquido. **b)**  $\theta < 90^\circ$ , la superficie se considera mojabable por el líquido. **c)**  $\theta = 90^\circ$ , la superficie se considera mojabable por el líquido.

La tendencia de un líquido a extenderse sobre un sólido depende de la diferencia entre la energía libre de Gibbs de adhesión y la energía libre de Gibbs entre el sólido y el líquido, lo cual se determina por el balance de tensiones interfaciales, y está dado por la ecuación de Young y Dupré en el equilibrio [100]:

$$\cos \theta = \frac{\gamma_{SG} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LG}}$$

Donde  $\theta$  es el ángulo de contacto,  $\gamma_{SG}$  es la tensión interfacial entre el sólido y el gas,  $\gamma_{SL}$  es la tensión interfacial entre el sólido y el líquido y  $\gamma_{LG}$  es la tensión interfacial entre el líquido y el gas.

Al utilizar agua como el líquido que mojará una superficie, el ángulo de contacto está relacionado con la hidrofobicidad de la superficie, a mayor ángulo de contacto mayor es la hidrofobicidad de una superficie. Este valor ofrece por lo tanto una manera de caracterizar las superficies en cada una de las etapas de inmovilización realizadas.

### **3.1. Justificación**

Hasta el momento, los resultados preliminares en la elaboración de los nanofotobiocatalizadores desarrollados utilizando la cloroperoxidasa y las nanopartículas de CdS han sido satisfactorios al ser estudiados en solución. Sin embargo, no se ha logrado obtener actividad del sistema al estar inmovilizado, razón por la cual hace falta describir parámetros como la densidad superficial de cada componente, la competencia de cada componente por sitios superficiales en cada paso de la inmovilización, la relación estequiométrica adecuada entre los componentes del sistema, etc., los cuales dependen de las condiciones experimentales de inmovilización como pH, temperatura y concentración. Por estas razones, en este proyecto se propuso realizar en superficies planas de silica (que son un modelo de materiales mesoporosos) el estudio de las condiciones experimentales necesarias para poder desarrollar un sistema inmovilizado de enzimas y nanopartículas semiconductoras de CdS, con el propósito de optimizar las condiciones para generar los biosensores que pueden servir para detectar compuestos azufrados.

## **3.2. Hipótesis**

Si se estudian diferentes cinéticas de adsorción superficial de las nanopartículas de CdS y peroxidasas en superficies modelo de sílica, a través de la microbalanza de cuarzo y la variación de condiciones experimentales de inmovilización como son temperatura, pH y concentración, entonces se lograrán entender los mecanismos e interacciones relevantes para la inmovilización de este sistema de peroxidasas – nanopartículas de CdS en materiales mesoporosos, pudiendo incrementar su estabilidad operacional y de almacenamiento.

### **3.3. Objetivos**

#### **3.3.1. Objetivo General**

Lograr en superficies planas de sílica (modelo de un material mesoporoso) la óptima inmovilización y el mantenimiento de la actividad en un sistema formado por peroxidasas y nanopartículas de CdS.

#### **3.3.2. Objetivos particulares**

- a)** Sintetizar y caracterizar nanopartículas de CdS.
- b)** Encontrar las condiciones experimentales (temperatura, pH, concentración) que maximicen la inmovilización de peroxidasas y nanopartículas de CdS, en superficies planas de sílica.
- c)** Estudiar la actividad enzimática de los sistemas inmovilizados de peroxidasas – nanopartículas de CdS y el mantenimiento de la misma.

## 4. Metodología

### 4.1. Sinopsis

Para realizar este proyecto, en primer lugar se realizó la síntesis de nanopartículas de CdS para utilizarlas como activador enzimático a través de irradiación con luz ultravioleta.

Se trabajó sobre superficies modelo de sílica ( $\text{SiO}_2$ ) que se utilizaron a su vez para mediciones de las cinéticas de adsorción de los componentes del sistema en la microbalanza de cuarzo. El primer paso consistió en limpiar estas superficies con un proceso químico que ayuda a remover sustancias adsorbidas en las mismas. Seguido de este proceso, se procedió a hacer una limpieza por medio de plasma (al vacío), el cual permite calcinar y remover cualquier resto de moléculas orgánicas que hayan quedado sobre la superficie.

Posteriormente, las superficies fueron silanizadas con 3-aminopropil trietoxisilano (3-APTES). De esta manera, queda expuesto un grupo amino en la superficie. A continuación, las superficies fueron calentadas en un horno a  $100^\circ\text{C}$  al vacío para fijar el silano. Este paso va seguido de una funcionalización con glutaraldehído, el cual funciona como espaciador para prevenir inhibiciones estéricas durante la inmovilización de las cloroperoxidasas. El glutaraldehído se une por un extremo al grupo amino del silano y deja expuesto un aldehído sobre la superficie.

El siguiente paso fue la inmovilización de las nanopartículas de CdS. Éstas tienen la función de activar a la enzima al ser irradiadas con luz ultravioleta (a través de la producción de especies de Oxígeno reactivas) y evitar el uso del peróxido de Hidrógeno como cofactor. Las nanopartículas están recubiertas de una capa de ácido mercaptoacético, por lo cual se introducen en los espacios dejados entre las moléculas de glutaraldehído, dejando toda la superficie con grupos carbonilo terminales (el aldehído del glutaraldehído y el carboxilo del ácido mercaptoacético de las nanopartículas).

A continuación se realizó la inmovilización de la cloroperoxidasa, la cual tiene la función de convertir el sustrato. Esta inmovilización se realiza mediante una interacción entre los grupos carboxilo o carbonilo de los elementos previamente inmovilizados con los grupos amino de las lisinas de la cloroperoxidasa, que en este caso están situados convenientemente del lado opuesto al sitio activo de la cloroperoxidasa.

Cabe señalar que se hicieron otras inmovilizaciones: se invirtió el orden de la inmovilización, en primer lugar las nanopartículas, seguidas del glutaraldehído y posteriormente la enzima; así como enzima directamente sobre la superficie del disco.

Una vez inmovilizado todo el sistema, se procedió a realizar las mediciones de actividad enzimática del sistema (utilizando Amplex Red como sustrato modelo), comparando ésta con la actividad enzimática medida en solución (con peróxido de Hidrógeno y con nanopartículas de CdS como activadores), así como con la actividad obtenida con el sistema inmovilizado sin nanopartículas, utilizando al peróxido de Hidrógeno como activador.

## 4.2. Síntesis de nanopartículas y caracterización de nanopartículas y enzimas

### Síntesis de nanopartículas de CdS

Para este punto se siguió la metodología reportada usando micelas reversas [16]. La microemulsión dioctil sulfoxinato de sodio (AOT)/heptano se preparó disolviendo AOT (7 g) en una mezcla de agua (2 mL) y heptano (100 mL). Esta emulsión se dividió en dos porciones, una de 61 mL y otra de 41 mL. A la porción más grande se agregó Cd (ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (concentración final de 3.93 mM) y a la otra porción Na<sub>2</sub>S (concentración final de 3.9 mM). Las dos soluciones se agitaron por separado durante una hora, antes de mezclarse en una atmósfera de Nitrógeno para evitar la oxidación de los compuestos. Se adicionó ácido mercaptoacético (concentración final 1.56 mM) a esta mezcla y se agitó por 8 horas en atmósfera de Nitrógeno. Las nanopartículas de CdS se precipitaron adicionando piridina. Finalmente se filtraron y lavaron sucesivamente con heptano, butanol, etanol, y metanol [16].

### Caracterización de nanopartículas

Las nanopartículas de CdS se caracterizaron en cuanto a su tamaño a través de dispersión dinámica de luz, en el equipo Zetasizer Nano ZS de Malvern Instruments. Para realizar la medición, previamente se realizó una filtración con un filtro de jeringa y una membrana Supor de 0.2 µm de baja retención de proteínas, posteriormente se sometió a un sonicado para separar nanopartículas aglomeradas durante 5 minutos y se procedió a realizar la medición.

En el caso del espectro de emisión de las nanopartículas, se midió excitando a 365 nm y midiendo la intensidad de emisión a diferentes longitudes de onda (400 – 700 nm, con 1 nm de excitación y emisión) para encontrar el máximo de emisión. Esto se efectuó con las nanopartículas tal como se obtienen de la síntesis (en amortiguador de fosfatos 60 mM pH 6 y a temperatura ambiente) en un fluorímetro Chronos BH de ISS.

### Caracterización de CPO

La cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* fue provista por el Dr. Eduardo Torres, y su caracterización del tamaño se realizó a través de dispersión dinámica de luz, en el equipo Zetasizer Nano ZS de Malvern Instruments. Para realizar la medición, se sometió la muestra de CPO a una filtración con una jeringa y una membrana Supor de 0.2 µm de baja retención de proteínas, seguido de un sonicado durante 5 minutos y se procedió a realizar la medición.

Para la caracterización de la enzima por medio de fluorescencia se obtuvo el espectro de emisión del triptófano excitando la muestra a 295 nm y leyendo la emisión con un barrido de 310 a 410 nm, con 1 nm de excitación y emisión utilizados en la medición.

### **4.3. Limpieza de superficies**

#### Limpieza de los soportes de sílica

Los soportes de sílica fueron limpiados mediante un tratamiento químico y posteriormente con plasma a una presión de 0.1 mbar con aire. En primer lugar, se sumergió la superficie en una mezcla de hidróxido de amonio, peróxido de Hidrógeno y agua en proporción 1:1:5 a 85°C durante 10 minutos. Posteriormente la superficie fue sumergida en una mezcla de ácido clorhídrico al 37%, peróxido de Hidrógeno y agua en proporción 1:1:5 a 85° C durante 10 minutos. Luego de esta limpieza química se enjuagó con agua y etanol consecutivamente. Finalmente, las superficies se limpiaron y activaron en una cámara de limpieza por plasma (Plasma Cleaner, Harrick Scientific Corporation), con una potencia de 30 W durante 15 minutos, con aire (0.1 mbar); cuando la presión es la adecuada, la cámara muestra un color azul-violeta. En el caso de los discos de sílica que se utilizan en la QCM, sólo se realizó el enjuague con agua y etanol y su posterior limpieza con el plasma, para evitar el desprendimiento de los electrodos. La eficacia de la limpieza fue caracterizada por medio del espectro IR.

#### 4.4. Funcionalizaciones e inmovilizaciones

##### Funcionalización con silanos desde fase vapor de los soportes de sílica

Los soportes de sílica previamente limpiados se introdujeron en un desecador que contenía un vaso de precipitados con 3-aminopropil trietoxisilano. Posteriormente se realizó vacío durante 1 hora para vaporizar el silano; y se procedió a mantenerlos en esas condiciones en el desecador durante 24 horas. Finalmente fueron sacados del desecador y enjuagados con agua y etanol consecutivamente, y dependiendo del tratamiento se aplicó un secado a 100°C durante 1 hora, o simplemente usó con una pistola de Nitrógeno. Estas superficies se caracterizaron por medio de su espectro IR (esto fue llevado a cabo en superficies de sílica diferentes a los discos utilizados en la QCM, ya que éstos son muy frágiles) y el ángulo de contacto estático que forman con el agua.

##### Funcionalización con glutaraldehído como espaciador

La funcionalización con glutaraldehído se llevó a cabo en la QCM sobre un disco de sílica previamente silanizado. En primer lugar, se alcanzó la estabilidad de la frecuencia con el disco sumergido en un amortiguador de acetatos 60 mM a un pH de 4 y una temperatura de 7 °C. Posteriormente se inyectaron 40 µL de glutaraldehído (en 40 mL de amortiguador, obteniendo una concentración final de glutaraldehído de 0.1058 M) y se observó el cambio en la frecuencia. Finalmente, se realizaron lavados (se introdujeron 10 mL del mismo amortiguador y se eliminaron 10 mL de la palangana de la QCM por 16 veces), para determinar si la adsorción era estable. Esta misma metodología se repitió para la adsorción con el orden invertido, es decir inmovilizando las nanopartículas sobre el silano.

Las superficies también fueron caracterizadas midiendo el ángulo de contacto estático formado con agua, así como por medio de su espectro IR. Esto último fue llevado a cabo en superficies de sílica diferentes a los discos utilizados en la QCM (ya que éstos son muy frágiles) al sumergir dichas superficies en una solución al 2% de glutaraldehído a temperatura ambiente por diferentes tiempos (15, 30, 60 y 90 minutos).

### Inmovilización de nanopartículas de CdS

Esta inmovilización se llevó a cabo en un amortiguador de fosfatos 60 mM con un pH de 6 sobre las superficies recién funcionalizadas con glutaraldehído. Ya que el paso anterior se realizó en un amortiguador diferente, se hace el cambio de pH dentro de la QCM para determinar su efecto sobre la masa adsorbida anteriormente. A continuación se esperó a que no hubiera más cambio de la frecuencia solamente con el nuevo amortiguador, y una vez alcanzada esta estabilidad se inyectaron 256  $\mu\text{L}$  de nanopartículas de CdS a una concentración de 78  $\mu\text{M}$  en la palangana (con 40 mL de amortiguador, obteniendo una concentración final de nanopartículas de 0.4992 M). La inmovilización se lleva a cabo a una temperatura de 7°C hasta que se alcanzó la estabilidad en la frecuencia. Posteriormente se realizó el lavado de la misma manera que se mencionó anteriormente para determinar si las nanopartículas adsorbidas se retienen o son arrastradas por el amortiguador. Esta misma metodología se aplicó para la inmovilización de nanopartículas sobre el silano, es decir, las superficies no funcionalizadas con glutaraldehído.

### Inmovilización de cloroperoxidasa (CPO) sobre nanopartículas de CdS

Se utilizaron 40 mililitros de amortiguador de acetatos 60 mM a un pH de 3.5 en la palangana de la QCM como línea base, y una vez estabilizada esta lectura, se inyectaron 2 nanomoles de la enzima (quedando una solución 0.05  $\mu\text{M}$ ) para observar su adsorción sobre la capa de nanopartículas y finalmente al alcanzar la estabilidad se realizaron los lavados con la misma metodología mencionada anteriormente para diferenciar adsorción de simple fisorción de la enzima sobre la superficie. La inmovilización fue llevada a cabo a una temperatura de 7°C.

## 4.5. Evaluación de la actividad y estabilidad del sistema

### Actividad enzimática con el sustrato modelo Amplex Red

La actividad enzimática se determinó siguiendo la cinética de la oxidación de Amplex Red (N-acetil-3,7-dihidrofenoazina) por medio de espectroscopía UV – Visible. Este sustrato se utilizó debido a que en presencia de peroxidasas reacciona 1:1 con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, obteniendo como producto de la reacción a la resorufina. Este ensayo es ampliamente utilizado para detectar actividad de peroxidasas con alta sensibilidad [84].

En primer lugar se determinó la longitud de onda de máxima absorbancia para la resorufina, para posteriormente hacer una curva estándar de porcentajes de conversión del sustrato. Esta curva se realizó en un vial conteniendo 10 µL de Amplex Red (concentración final 0.1 mM), 90 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mM (que fue la cantidad necesaria para que ya no aumentara la absorbancia, la cual llegó a un valor de 2.084, con una concentración final de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 1.8 mM), 87 µL de CPO 23 µM (con una concentración final de 6 µM) y el resto de amortiguador de fosfatos 60 mM con un pH de 6. Esta absorbancia se consideró como el 100% de conversión, y posteriormente se realizaron las diluciones correspondientes a 66, 33, 16.665, 8.333, 4.166, 2.083, 1.042, 0.521, 0.26 y 0.13 % de conversión. De esta curva se sacó una regresión lineal, para utilizar la ecuación de la recta para conocer el porcentaje de conversión de las diferentes reacciones llevadas a cabo.

La reacción activada por nanopartículas en solución se realizó con 256 µL de éstas, 87 µL de enzima y 10 µL de Amplex Red en un amortiguador de fosfatos 60 mM con pH de 6, aplicando ciclos de irradiación (5 minutos de irradiación con luz UV a 365 nm, 2 minutos de descanso) en baño de hielo para mantener la temperatura estable. Se realizaron mediciones en la absorbancia hasta que no se vió un aumento. En este experimento también se probó la modulabilidad de la reacción, al medir el aumento de absorbancia después del período de irradiación y después del período de descanso. Finalmente se agregaron 90 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mM para llevar la reacción hasta el final. Como control se usa un vial sin enzima que también se sometió a los ciclos de irradiación y a la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Para el caso de la medición de la actividad de los sistemas inmovilizados, se procedió a un lavado con el disco dentro de la QCM después del último paso de las inmovilizaciones,

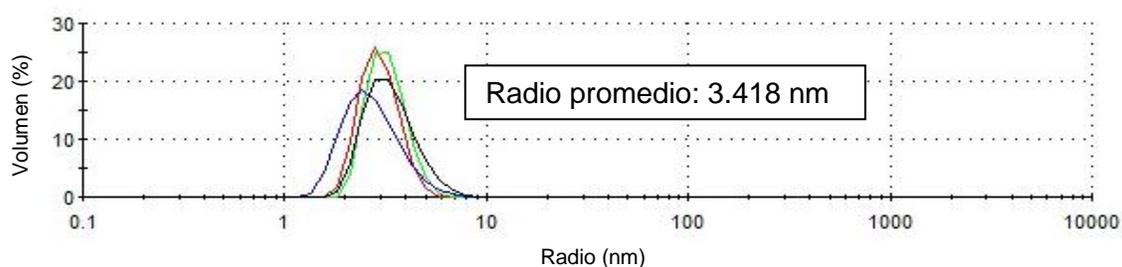
así como un cambio de amortiguador (al de fosfatos 60 mM con pH de 6) en los casos que la metodología indica pH diferente. Una vez alcanzada la estabilidad de la frecuencia en el amortiguador de reacción, se inyectaron 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  (400  $\mu\text{L}$  en total, obteniendo una concentración final de 0.1 mM) de Amplex Red y se dejó adsorber sobre la superficie hasta alcanzar la estabilidad en la frecuencia.

A continuación se iniciaron los ciclos de irradiación con la misma metodología mencionada anteriormente, en total se hicieron 10 ciclos. La reacción se llevó a cabo a una temperatura de 7 °C y se tomó una alícuota al finalizar los ciclos de irradiación, para medir el porcentaje de conversión por espectroscopía UV-visible. Esta absorbancia se comparó con un control bajo las mismas condiciones sin enzima.

## 5. Resultados y discusión

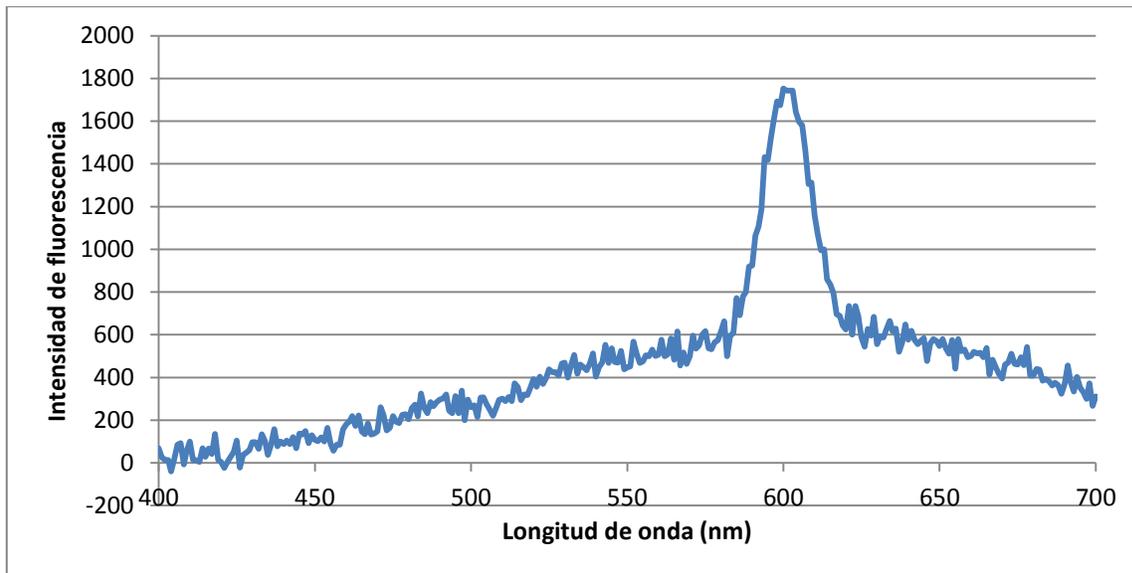
### 5.1. Síntesis de nanopartículas de CdS y caracterización de nanopartículas y CPO

Se sintetizaron las nanopartículas de CdS con la metodología descrita, y para su caracterización en primer lugar se midió su tamaño (3.418 nm de radio), como se muestra en la Figura 12. Este valor no concuerda con lo reportado con el mismo método de síntesis realizado por Gandubert y colaboradores en 2008 [16], así como Rajendran y colaboradores en 2009 [53] y 2010 [55] quienes encontraron un tamaño de 3.4 nm de diámetro. Esto puede deberse que estas nanopartículas tienden a aglomerarse e incluso llegan a precipitarse después de mantenerse almacenadas en refrigeración.



**Figura 12.** Distribución de tamaño por volumen de las nanopartículas de CdS. Medido por dispersión dinámica de luz. Se muestran 4 repeticiones

Posteriormente se midió su espectro de emisión de fluorescencia. En la Figura 13 se muestra el espectro de emisión de fluorescencia de las nanopartículas de CdS con un máximo en 598 nm y un ancho de pico de 41 nm (577 a 618 nm). Aunque este resultado es diferente al reportado por Rajendran y colaboradores [53] para nanopartículas de CdS con recubrimiento de ácido mercaptoacético, de nuevo, esto es muy probablemente debido a la diferencia en tamaño reportada anteriormente o a que se este realizando una medición con agregados de nanopartículas. Sin embargo, como se mostrará en la sección 5.5, estas sí presentan actividad.

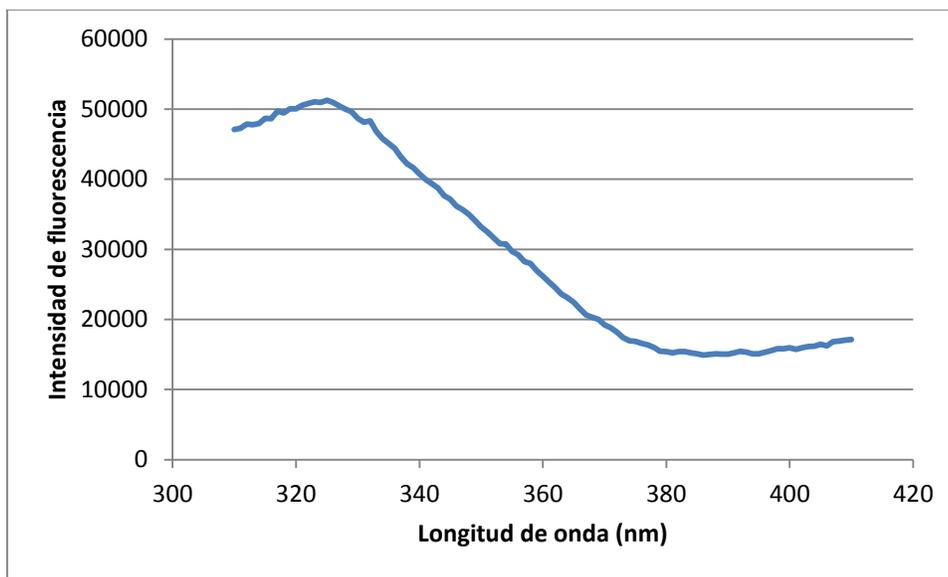


**Figura 13.** Espectro de emisión de fluorescencia de las nanopartículas de CdS. El espectro se determinó excitando a 365 nm y midiendo la emisión de fluorescencia de 400 a 700 nm.

La emisión de fluorescencia de una proteína es una mezcla de la emitida por sus distintos aminoácidos con cadenas laterales aromáticas. Sin embargo, al excitar a 295 nm esta emisión se debe solamente a los triptófanos de la enzima, y se utiliza para probar cambios estructurales de las enzimas [92].

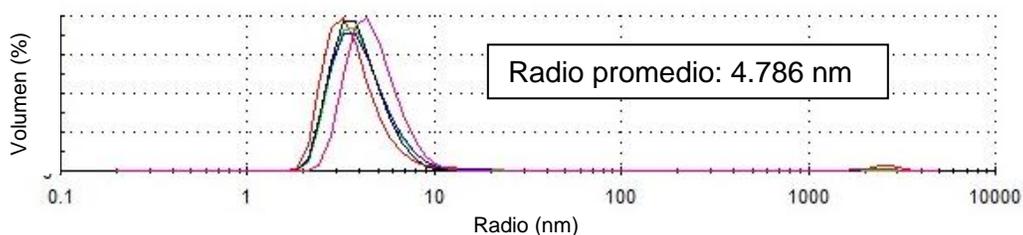
En la Figura 14 se observa el espectro de emisión de fluorescencia de la CPO al excitar a 295 nm, teniendo un valor de emisión máxima a 323 nm, lo cual es menor a lo reportado por Liu y Wang [92] para la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* (máximo a 347 nm). Esto puede deberse a que ellos realizan la medición en amortiguador de acetatos 10 mM con un pH de 5, mientras que en el caso de este estudio se midió en un amortiguador de fosfatos con un pH de 6. Esta diferencia indica que en nuestro caso los triptófanos de la CPO se encuentran en un ambiente menos polar, es decir que se encuentran menos expuestos al medio acuoso. Esto puede indicar cierto grado de aglomeración de la enzima lo que implicaría una reducción en la actividad. Cabe señalar que la Figura 14 no presenta la forma de una distribución normal ya que se mide la emisión a partir de 310 nm, ya que de

medir desde una longitud más corta, el espectro de excitación (a 295 nm) se superlaparía con el de emisión, complicando la visualización de esta figura.



**Figura 14.** Espectro de emisión de fluorescencia de triptófanos de la CPO, excitando a 295 nm

Para corroborar esta aseveración, se midió el tamaño de la CPO por medio de dispersión dinámica de luz, obteniendo un valor promedio de 4.786 nm de radio, lo cual se puede observar en la Figura 15. Este valor es mayor al reportado por Aburto y colaboradores (por difracción de rayos X), donde se reporta un tamaño de la CPO de *Caldariomyces fumago* de 6 x 5.3 x 4.6 nm [38]. Tomando en cuenta que las mediciones de tamaño por dispersión dinámica de luz indican el radio promedio de las moléculas, puede calcularse el radio teórico de la CPO reportada por estos autores multiplicando las longitudes para sacar el volumen, el cual se introduce posteriormente en la fórmula para calcular el volumen de una esfera y despejando el radio. El valor obtenido es de 3.27 nm, lo cual es 46% menor que el valor observado en este estudio. Esto puede deberse a la posible aglomeración que se mencionó anteriormente, sin embargo, como se mostrará en la sección 5.5, la enzima en estas condiciones sí presenta actividad.



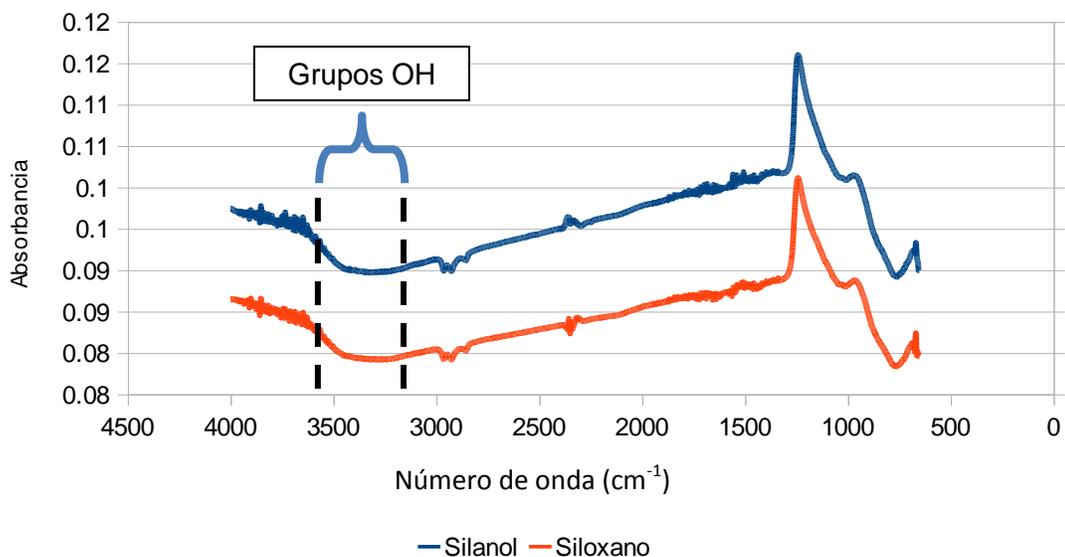
**Figura 15.** Distribución de tamaño por volumen de la CPO. Medido por dispersión dinámica de luz. Se muestran 5 repeticiones.

## 5.2. Limpieza y funcionalización con plasma

Antes de pasar a las inmobilizaciones, es importante asegurar que se trabaja con superficies limpias, esto se caracteriza en primer lugar por espectroscopía infrarroja. En la Figura 16 se que hay presencia de grupos OH (a  $3200 - 3550 \text{ cm}^{-1}$ ) [76] en la superficie que debería tener grupos silanol, lo que quiere decir que la limpieza y activación de las superficies con el plasma logra hacerlas más reactivas. A su vez, en la Tabla 3 también se observa que hay una diferencia entre los dos métodos de limpieza en cuanto al ángulo de contacto que producen, el ángulo más pequeño de las superficies con grupos silanol (Si – OH) habla de una superficie más hidrofílica, y por lo tanto más limpia que las que tienen grupos siloxano (Si – H). La diferencia se hace evidente al ver las imágenes de la Tabla 3.

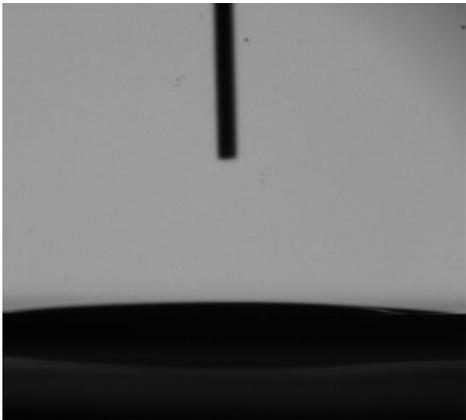
Como referencia, el ángulo de contacto observado en superficies sucias de sílica es de alrededor de 50°, este valor se da incluso en superficies recién compradas antes de ser limpiadas.

### Activación de las superficies por medio de plasma



**Figura 16.** Espectros de absorción infrarroja de superficies limpiadas con el método químico (siloxano) y con el método químico y activación con plasma (silanol).

**Tabla 3.** Ángulos de contacto promedio de los diferentes tratamientos de limpieza

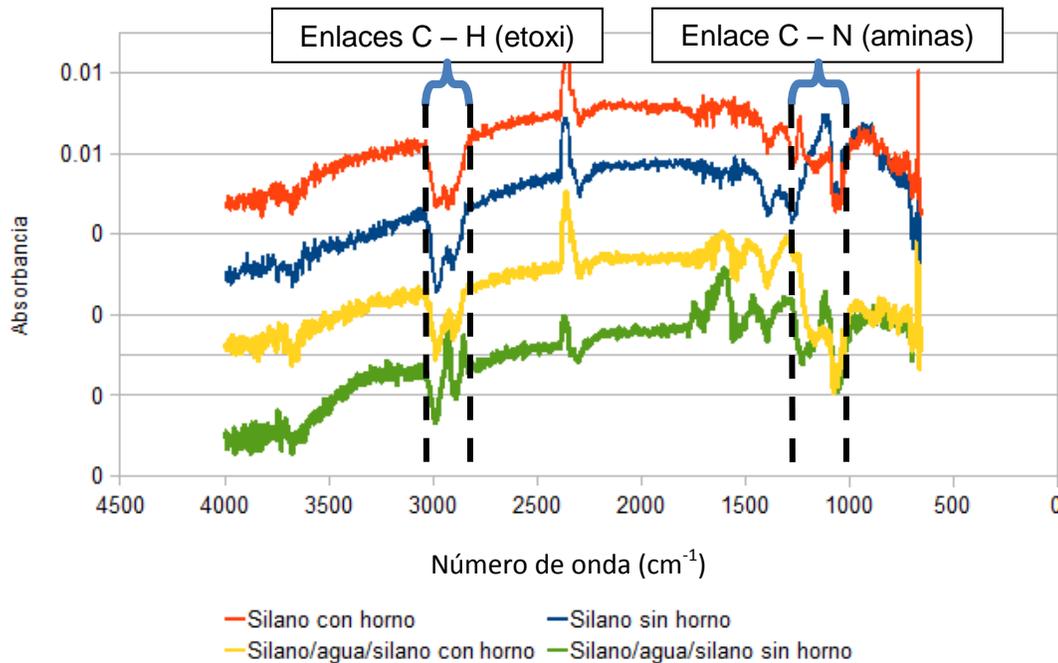
| Siloxano (limpieza química)   | Silanol (limpieza química y con plasma)  |
|---|--|
| 11.99 ± 2.89 °  | 5.6 ± 1.28 °   |
|  |  |

## 5.3. Funcionalizaciones

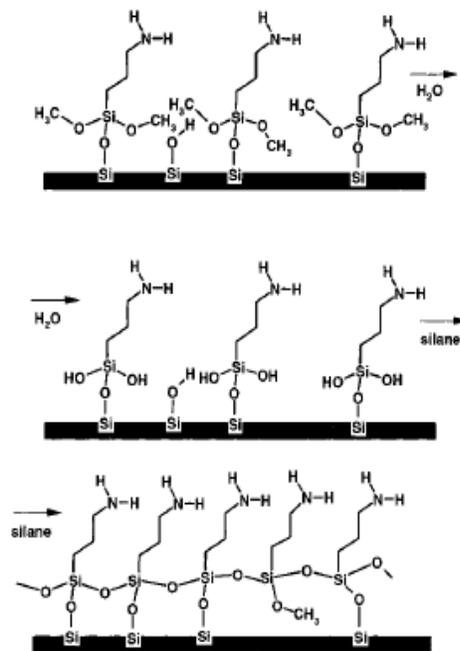
### 5.3.1. Silanización

Después de la limpieza de las superficies, se procede a la silanización, y para este paso en primer lugar se debe de comprobar la presencia del silano en las superficies funcionalizadas. En la Figura 17 se observan los diferentes espectros de absorción infrarroja de los tratamientos de silanización en fase vapor. En cada uno de los casos se observan las bandas características de los enlaces C – H de los grupos etoxi ( $2850 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ ) del 3 aminopropil trietoxisilano [17], por lo que puede confirmarse que el material sí se unió a las superficies.

En los tratamientos silano / agua /silano se observa una banda más pronunciada entre los  $1000$  y los  $1250 \text{ cm}^{-1}$ , característica del enlace C – N de aminas [76] a diferencia de los tratamientos con solamente silano. Este último resultado va de acuerdo con lo reportado por Krasnoslobostsev y Smirnov en el 2002 [85], quienes explican que el silano pierde su grupo metilo (etilo para el caso del silano utilizado en este estudio) al unirse covalentemente al silanol de la superficie, quedando este metilo libre y pudiéndose unir a otros silanoles de la superficie, lo que impide la unión de más silanos y por lo tanto disminuye la eficiencia del proceso de silanización. Esto se muestra en la Figura 18. Los autores sugieren que un tratamiento intermedio con agua puede mejorar la silanización, lo que debido a la banda del espectro infrarrojo antes mencionada, puede ser el caso en este estudio. Finalmente, se escogió el tratamiento sin enjuague y secado en el horno, ya que es el que presenta un ángulo de contacto y absorbancia mayores, esto permitió una mejor funcionalización con glutaraldehído, lo que se discute en la próxima sección.



**Figura 17.** Espectros de absorción infrarroja de los diferentes tratamientos de funcionalización desde fase vapor. Los tratamientos sin enjuague presentan una mayor absorbancia. El secado con horno se realiza ya que puede promover la formación de un mayor número de enlaces covalentes por deshidratación.

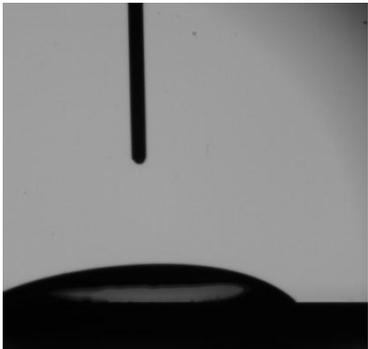
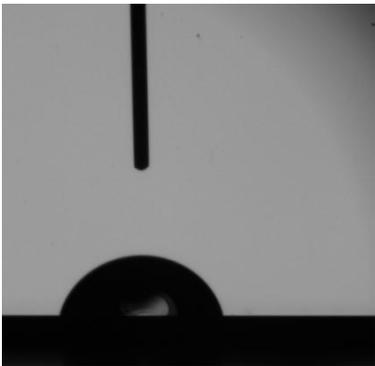


**Figura 18.** Efecto del agua sobre la silanización. El enjuague arrastra grupos metilo, permitiendo así la formación de una capa más homogénea de silano. Tomada de la referencia [85].

A su vez, en la Tabla 4 se muestran ángulos de contacto de las superficies silanizadas desde fase vapor, los cuales están dentro del rango que ha sido reportado anteriormente en la literatura [63,86]. Sin embargo, existen diferencias entre los tratamientos, las cuales pueden explicarse de acuerdo a Chauhan et. al [87] de las siguientes maneras:

- 1) Las mediciones de ángulo de contacto fueron hechas a diferentes tiempos después de la formación de la capa de silano. Este fue el caso para todas las superficies silanizadas desde fase vapor.
- 2) Puede haber una alta rugosidad de la muestra, es decir, que la superficie no fue silanizada de manera homogénea, por lo que una fracción de las cadenas hidrofóbicas del silano quedan expuestas a la superficie. En el caso de los tratamientos con solamente silano este podría ser el caso, ya que el ángulo de contacto resultó mayor (indicando mayor hidrofobicidad de la superficie). En el caso de los tratamientos con silano / agua / silano, esta pérdida fue menor, y finalmente, en los tratamientos donde se seca la superficie en el horno a 100°C durante una hora, puede haber aumentado el número de enlaces covalentes del silano con la superficie gracias a la deshidratación.

**Tabla 4.** Promedio de los ángulos de contacto medidos en los tratamientos de funcionalización desde fase vapor. Se muestra el ángulo de contacto antes (A) y después (B) de silanizar por los diferentes métodos.

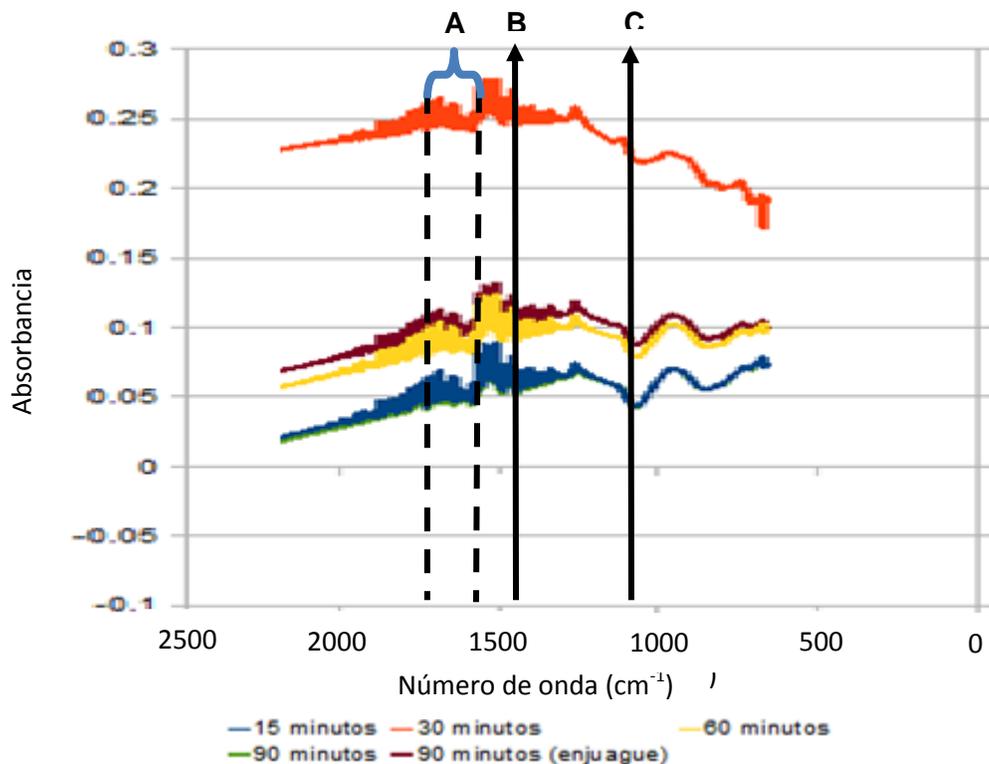
| Control (sílica)  | Silano secado con horno  | Silano secado con Nitrógeno | Silano / agua / silano secado con horno | Silano / agua / silano secado con Nitrógeno |
|---|--|-----------------------------|---|---|
| 37.22 ± 2.34 °  | 76.33 ± 0.18 °   | 72.54 ± 1.92°               | 70.22 ± 0.14°                           | 65.05 ± 0.50°                               |
|  |  |                             |   |   |
| A   | B  |                             |   |   |

### 5.3.2. Funcionalización con glutaraldehído

Después de la silanización, se prosigue a la funcionalización con glutaraldehído. La adsorción de éste sobre el silano se lleva a cabo a través de un ataque nucleofílico de la amina primaria expuesta del silano hacia el Carbono del grupo aldehído del glutaraldehído. El resultado de esta reacción es un compuesto en el cual un doble enlace C=O es sustituido por uno C=N, formando una imina. Esta reacción es agilizada teniendo un pH ácido y removiendo agua del medio de reacción, ya que de esta manera se desplaza el equilibrio hacia la formación de la imina [76].

En nuestro caso, durante la funcionalización con glutaraldehído se observó un aumento de la adsorción de éste cuanto mas grande era el ángulo de contacto formado en la silanización (razón por la cual se eligió la silanización sin enjuague y con secado en el horno, como se describe en la sección anterior), llegando a ser imposible la adsorción en superficies con ángulos de contacto inferiores a 45°. Este fenómeno se debe a que el glutaraldehído forma hidratos con el agua al estar en solución, los cuales no son capaces de formar un enlace con la amina del silano, sino simplemente interacciones electrostáticas, por lo que es necesario un ambiente más hidrofóbico para poder llevar a cabo la formación de la imina. Por esta razón, la formación de este enlace es favorecida al estar en una superficie considerablemente silanizada, ya que la interfase posee un carácter hidrofóbico. Hay una correlación entre el ángulo de contacto y el grado de silanización, es decir, a mayor grado de silanización, mayor ángulo de contacto.

Para confirmar la presencia del glutaraldehído sobre las superficies funcionalizadas, se midieron sus espectros infrarrojos. En la Figura 19 se puede ver una gran similitud entre todos los espectros infrarrojos obtenidos a diferentes tiempos de funcionalización, teniendo picos característicos de los enlaces C=N de iminas ( $1615 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ ), además de sobretonos de enlaces C – C – C de aldehídos ( $1100 \text{ cm}^{-1}$ ) y sobretonos de enlaces  $\alpha - \text{CH}_2$  ( $1400 - 1450 \text{ cm}^{-1}$ ) [76], grupos presentes en el glutaraldehído como puede verse en la Figura 20, por lo que se puede afirmar que el glutaraldehído se está adsorbiendo sobre la superficie.



**Figura 19.** Espectros de absorción infrarroja de superficies con glutaraldehído a diferentes tiempos de funcionalización. A) Enlaces imina ( $1615 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ ) B) Enlaces  $\alpha - \text{CH}_2$  ( $1400 - 1450 \text{ cm}^{-1}$ ) C) enlaces C - C - C de aldehídos ( $1100 \text{ cm}^{-1}$ )

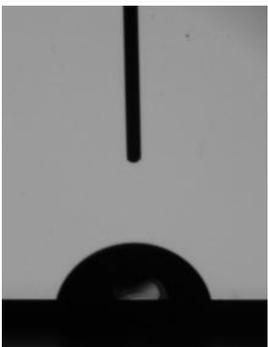
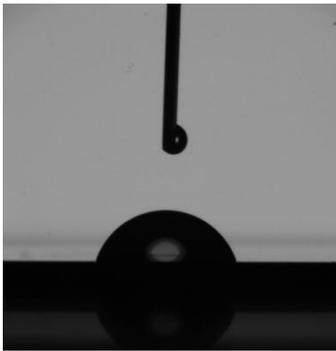


**Figura 20.** Estructura molecular del glutaraldehído

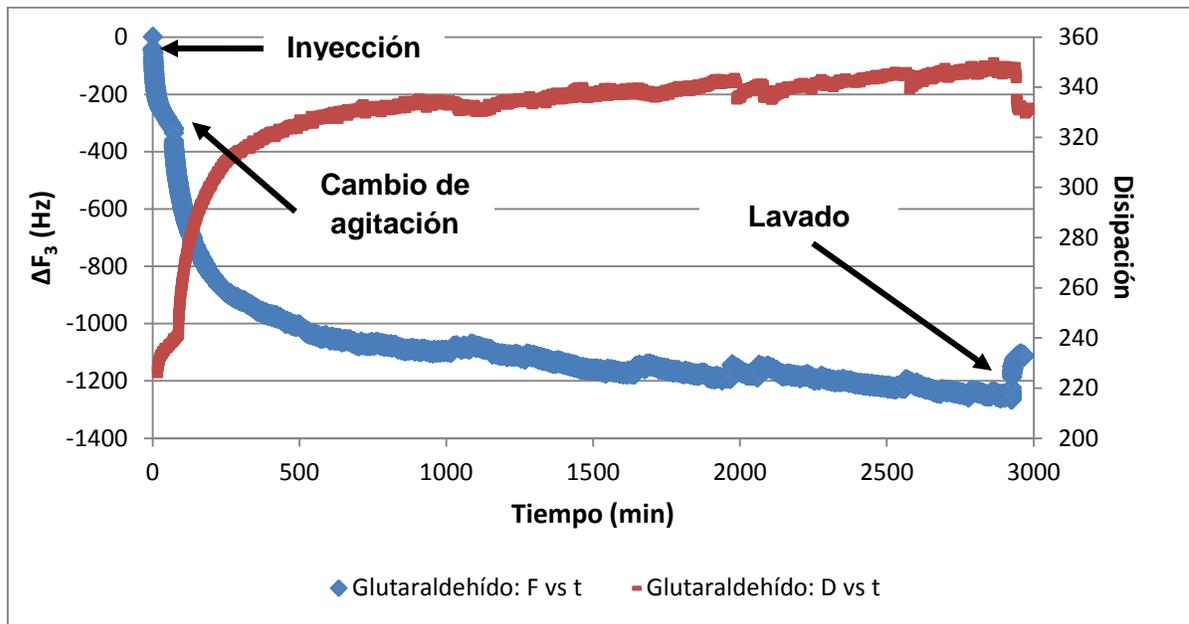
En la Tabla 5 observamos los ángulos de contacto de las superficies funcionalizadas con glutaraldehído. En nuestro caso el valor más alto (obtenido a los 30 minutos) es superior al reportado por Blinka y colaboradores en el 2010 ( $59^\circ$ ) [88]. En un principio el ángulo de contacto aumenta porque aunque el glutaraldehído es altamente hidrofílico, su presencia en pequeñas cantidades provoca un aumento en la rugosidad de las superficies [87] como se

mencionó en la sección anterior. Al aumentar el tiempo de funcionalización, el valor se acerca al reportado, por lo que se puede decir que se está creando una capa más homogénea. Por otro lado, es importante mencionar que el exceso de grupos aldehídos también podría causar una disminución en la cantidad de enzima inmovilizada, ya que las moléculas de glutaraldehído pueden comenzar a polimerizarse al formar una multicapa sobre las superficies [89].

**Tabla 5.** Promedio de los ángulos de contacto medidos en los tiempos de funcionalización con glutaraldehído.

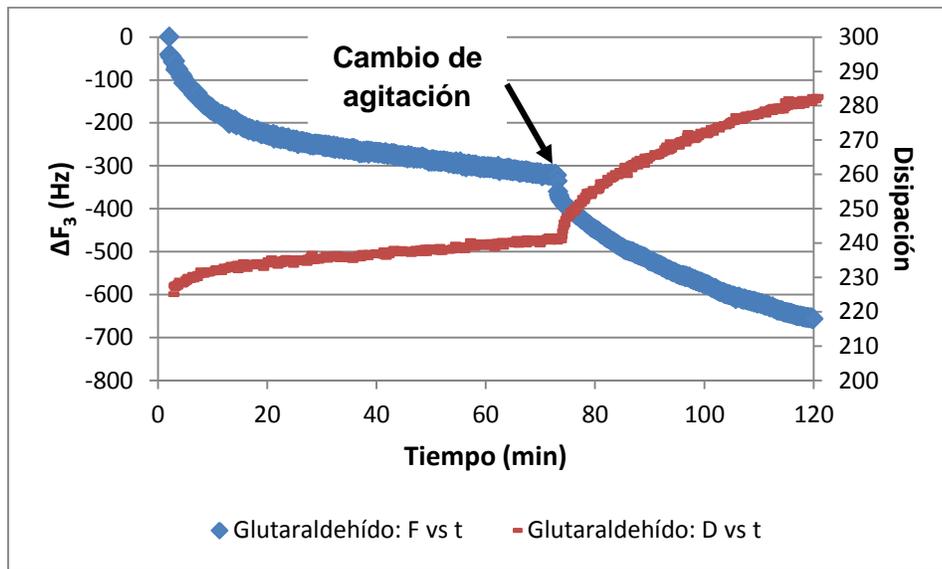
| Control (APTE sin glutaraldehído)  | 15 minutos de funcionalización  | 30 minutos de funcionalización | 60 minutos de funcionalización | 90 minutos de funcionalización |
|--|---|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 67.6 ± 0.19 °  | 62.68 ± 0.62 °  | 65.36 ± 1.76 °                 | 56.49 ± 4.37 °                 | 57.52 ± 1.41 °                 |
|  |  |                                |                                |                                |

Una vez que se sabe que el glutaraldehído está siendo adsorbido en las superficies, se procede a medir las cinéticas de estas adsorciones en la QCM; en la Figura 21 se observa un ejemplo. En los primeros 500 minutos (8 horas) se lleva a cabo la mayoría de la adsorción (-1000 Hz en el tercer sobretono) sobre el silano. Se describen los perfiles del tercer sobretono en particular, y no de la frecuencia fundamental de resonancia ya que éste es representativo de los otros sobretonos y la fundamental presenta comportamientos atípicos, debido al tipo de corte del cuarzo (corte AT) [91]. Por lo anterior, en la literatura especializada siempre se utiliza el tercer sobretono.



**Figura 21.** Adsorción de glutaraldehído sobre una superficie silanizada, donde se muestra el momento de la inyección, el cambio de agitación y el comienzo del lavado,

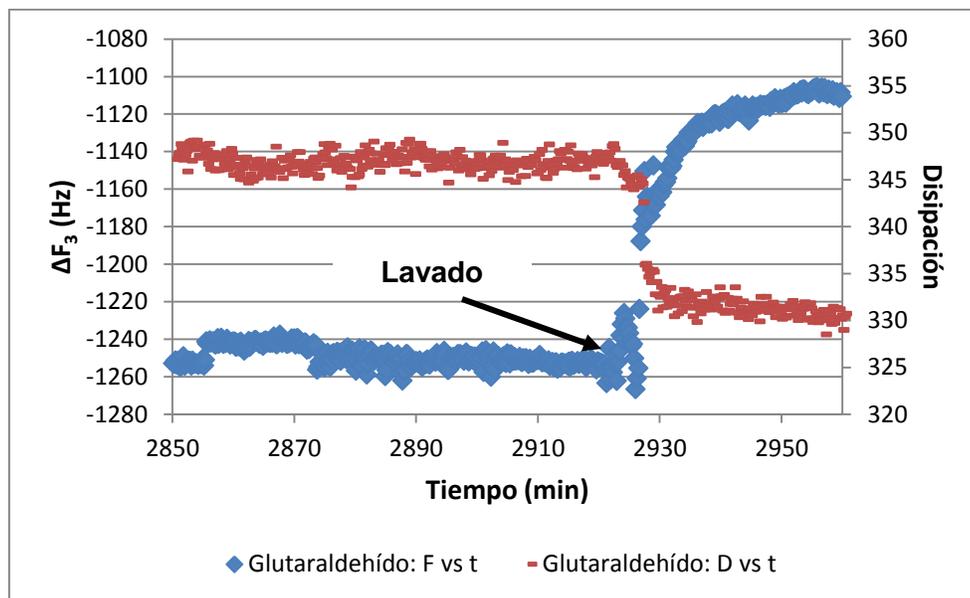
En la Figura 22 se observa que en un principio se adsorbe el glutaraldehído sobre la superficie y empieza a estabilizarse. Sin embargo, alrededor de los 70 minutos de adsorción se observa un incremento en la velocidad de adsorción (disminución de  $\Delta F$ ) sobre la superficie. Esto se debe a que en este momento se aumentó la velocidad de agitación de 350 a 550 rpm, ya que la adsorción se estaba llevando a cabo lentamente. Esta fue la agitación que se utilizó para el resto de los experimentos. El aumento en disipación indica la formación de una capa de glutaraldehído con una menor rigidez que la que presenta la superficie silanizada, lo cual va de acuerdo con la formación de una película más viscoelástica sobre la superficie.



**Figura 22.** Acercamiento de los primeros 120 minutos de la adsorción de glutaraldehído sobre una superficie silanizada, donde se muestra el momento del cambio en la velocidad de agitación.

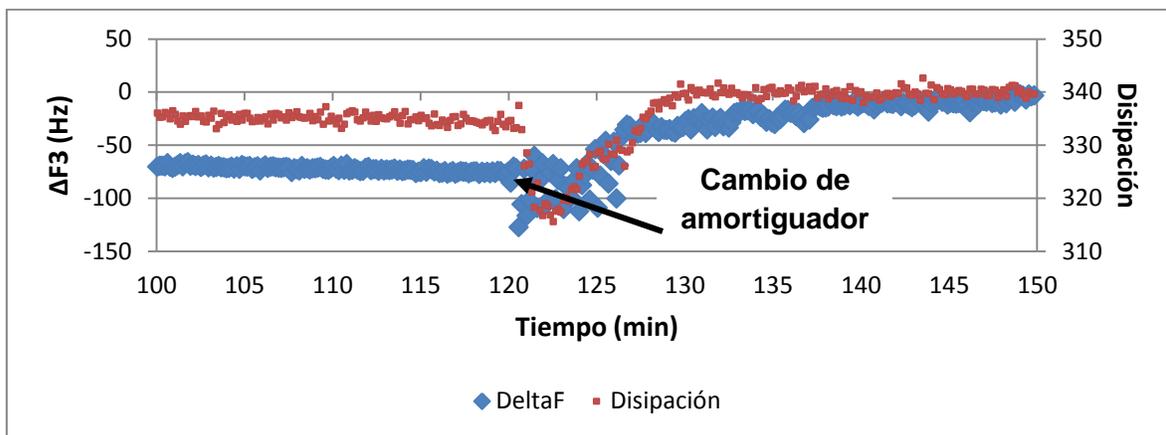
En la Figura 23 se muestra el efecto de los lavados con el mismo amortiguador utilizado para la funcionalización. Estos lavados tienen como objetivo el asegurar que la cantidad de glutaraldehído adsorbida sobre la superficie se mantiene estable al eliminarlo de la solución. Se observa que durante los lavados (realizados a partir de los 2920 minutos) la frecuencia aumenta 140 Hz, representando una pérdida de alrededor del 10% del material adsorbido. En una funcionalización similar realizada, la pérdida con los lavados fue de cerca del 50% [83], por lo que la adsorción observada en este estudio se considera estable ya que después de los lavados la frecuencia se mantiene constante.

Así mismo, se observa una disminución proporcional de la disipación, lo que indica que hubo una desorción del exceso de material viscoelástico (el glutaraldehído que no se encuentra unido covalentemente) de la superficie.



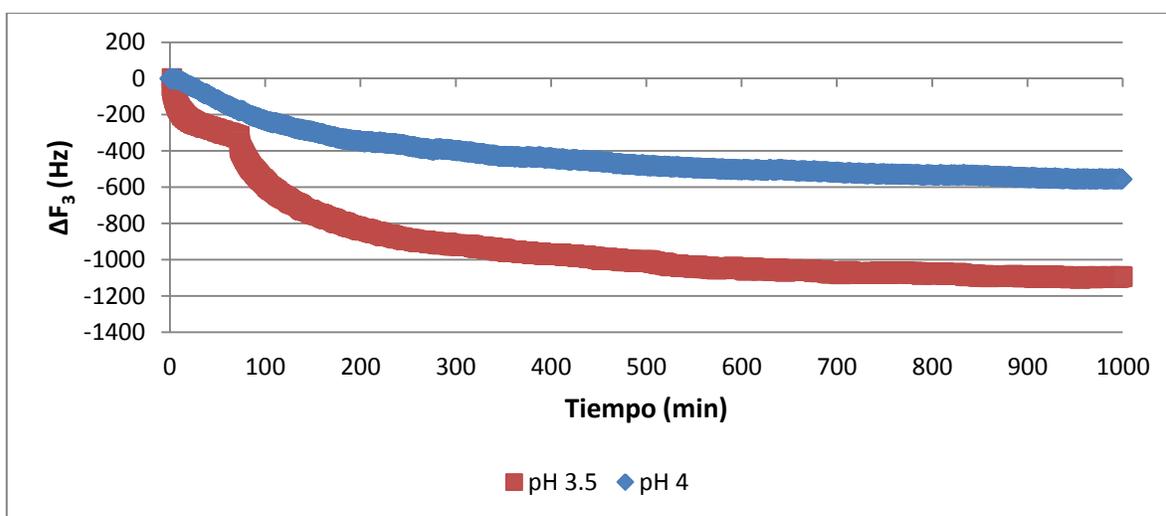
**Figura 23.** Acercamiento de los lavados durante la adsorción de glutaraldehído sobre una superficie previamente silanizada.

La inmovilización de nanopartículas es el siguiente paso a la funcionalización con glutaraldehído, para lo que se requiere un cambio de amortiguador. Esto se realizó después de un tiempo de estabilización cercano a las 2 horas. En la Figura 24 se muestra el efecto que este cambio de amortiguador tiene sobre la adsorción del glutaraldehído. Cabe mencionar que el valor inicial de la frecuencia observado en la Figura 24 es la continuación de la estabilidad de la Figura 23, es decir, alrededor de -1110 Hz. Se observa que la frecuencia aumenta, esto quiere decir que se pierde masa de la superficie y se debe a que la formación de imidas es favorecida a pH ácido, y al cambiarlo a pH 6 se desfavorece esta reacción, lo que causa una desorción de 80 Hz, o 6% del glutaraldehído adsorbido.



**Figura 24.** Efecto del cambio de amortiguador en la estabilidad del glutaraldehído adsorbido

Corroborando lo anterior, en la Figura 25 se muestran las cinéticas de adsorción de glutaraldehído en diferentes condiciones de funcionalización, en el caso de la adsorción recién descrita de -1000 Hz, se utilizó un amortiguador de acetatos 60 mM con pH de 3.5, mientras que en el otro caso se manejó un pH de 4. La mayor adsorción en el caso con el amortiguador con pH de 3.5 se debe a que la reacción de formación de iminas es favorecida en medios más ácidos. Esto se observa en la Figura 25, ya que las demás condiciones de funcionalización permanecieron constantes, por lo que se puede afirmar que la diferencia entre estas adsorciones se debe a la diferencia de pH en el medio.



**Figura 25.** Cinéticas de adsorción de glutaraldehído sobre silano a diferentes pH.

A partir de tres experimentos realizados, se tiene que al finalizar los lavados se obtuvo un cambio de frecuencia promedio de  $-733 \pm 230$  Hz, lo que utilizando la ecuación de Sauerbrey nos daría una masa adsorbida de  $43.25 \text{ mg/m}^2$ , o  $862 \pm 27$  ng de glutaraldehído. Con este valor podemos calcular la densidad de moléculas de glutaraldehído sobre la superficie, que es  $2.6 \times 10^{16}$  moléculas/cm<sup>2</sup>. Se inyectaron 40  $\mu\text{L}$ , que son 10.62 mg, por lo que se adsorbió solamente el 0.008% de lo que se inyectó.

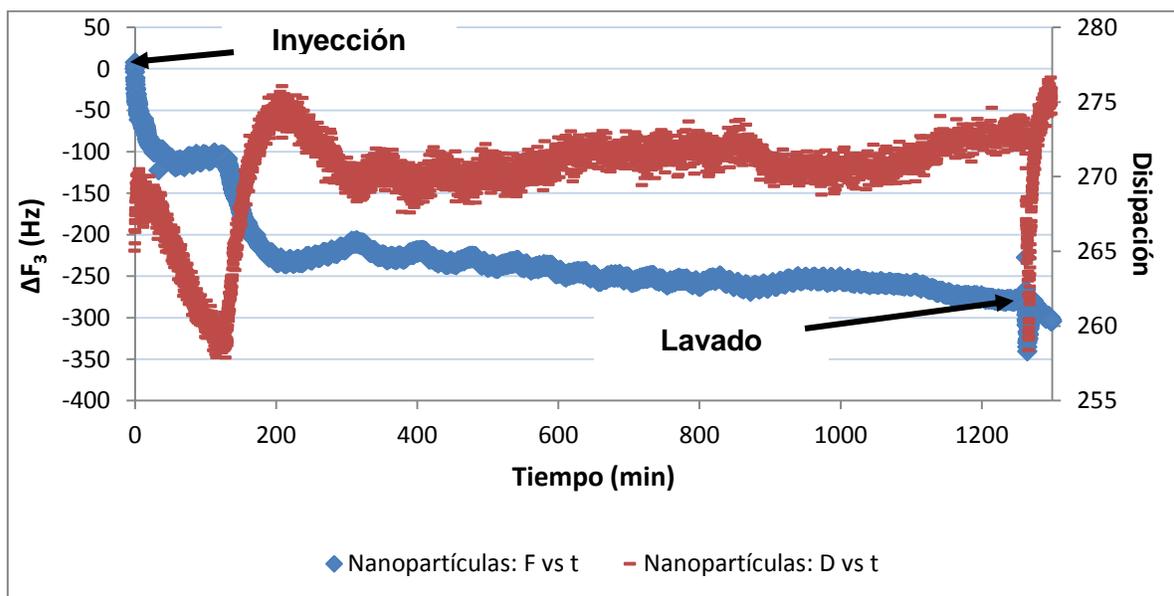
Razumovitch y colaboradores [83] realizaron una funcionalización de glutaraldehído sobre aminopropil trietoxisilano al sumergir la superficie en una solución de glutaraldehído al 1% (v/v), donde encontraron un cambio de frecuencia de alrededor de -20 Hz, o  $180 \text{ ng/cm}^2$  la cual se estabilizó en 3 horas. El valor encontrado en el presente estudio es de  $4325 \text{ ng/cm}^2$ , el cual es mucho mayor debido a que se utilizó un pH ácido, además de tener tiempos de estabilización mucho mayores (de hasta 20 horas). Cabe señalar que para estas estimaciones se utiliza el área piezoeléctricamente activa de la superficie, que sólo corresponde a una parte (alrededor de 1/16) de ésta. Usando el área real aproximada, este valor aumenta a  $13.58 \pm 4.2 \mu\text{g}$  adsorbidos, o 0.128%. Esto equivale a 135.6 nanomoles de glutaraldehído adsorbidos sobre la superficie.

Teniendo en cuenta la cantidad de masa por unidad de área encontrado y dividiéndolo por la densidad del glutaraldehído ( $1.062 \text{ g/cm}^3$ ) se obtiene un grosor de la película formada de 40.725 nm, lo cual es muy grande para tratarse de una monocapa de glutaraldehído, por lo que se concluye que la adsorción de glutaraldehído sobre el silano ha formado en este caso una multicapa, donde incluso pueden estarse formando polímeros de glutaraldehído [93] y obteniendo una superficie rugosa. En la Figura 21 se observa que alrededor de los 500 minutos (aproximadamente 8 horas) ya se ha realizado la mayor parte de la adsorción de glutaraldehído sobre la superficie, siendo el resto de la masa adsorbida en las siguientes horas cerca de 200 Hz, cantidad similar a la que llega a perderse con los lavados (Figura 23) y el cambio de amortiguador (Figura 24), por lo que el tiempo de reacción puede ser disminuido hasta 8 horas reteniendo una película gruesa (con multicapas) pero estable.

## 5.4. Inmovilizaciones

### 5.4.1. Inmovilización de nanopartículas

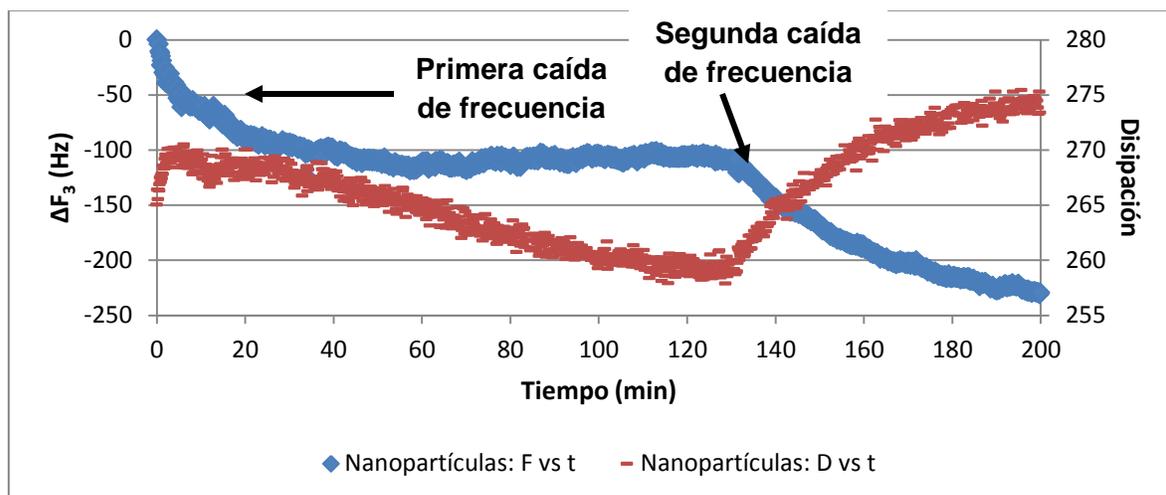
Como se describió en la sección anterior, la inmovilización de nanopartículas se lleva a cabo sobre una capa recién formada de glutaraldehído. Esta última tiene idealmente un grupo aldehído terminal, mientras que las nanopartículas de CdS están recubiertas con una capa de ácido mercaptoacético, teniendo de esta manera una superficie de grupos carboxilo. Estos grupos tienen un pKa de 3.67 [94], por lo que por arriba de este pH las nanopartículas tienen una carga negativa. De esta manera tenemos que las interacciones entre el glutaraldehído y las nanopartículas son principalmente ión (el carboxilo) – dipolo (el aldehído). La cinética de la adsorción de las nanopartículas se puede ver en la Figura 26. El experimento se llevó a cabo en un amortiguador de fosfatos 60 mM con un pH de 6, a una temperatura de 7.8 °C.



**Figura 26.** Adsorción de nanopartículas sobre glutaraldehído, donde se muestran los tiempos de inyección y comienzo del lavado.

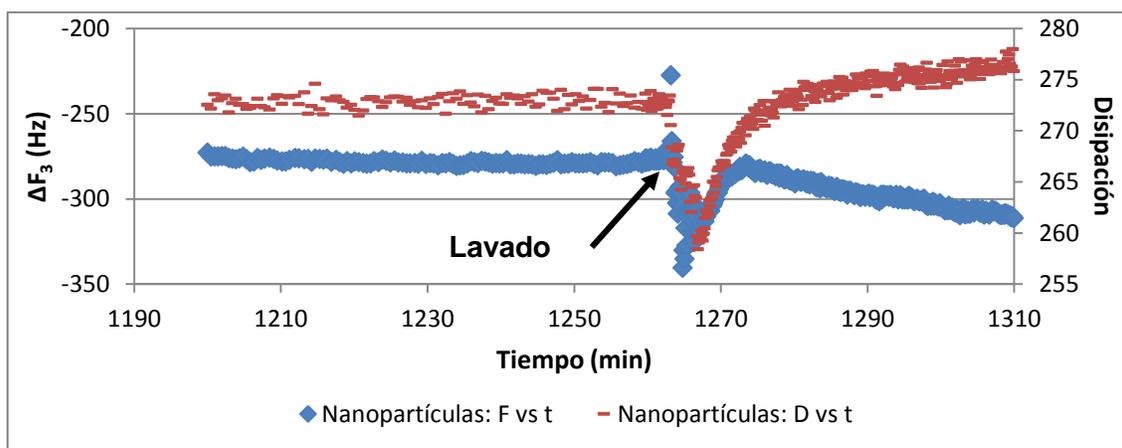
En la Figura 27 se muestra un acercamiento de los primeros 200 minutos de esta adsorción, donde se observó una doble caída de la frecuencia a diferentes tiempos. Durante la primera, la disipación también disminuyó, mientras que en la segunda la disipación

aumenta. Esto puede indicar que en un principio las nanopartículas se adsorben en los espacios vacíos entre moléculas de glutaraldehído, haciendo más rígida la capa (evidenciado por la disminución en la disipación) y posteriormente se adsorben por encima de ésta (formando una nueva capa menos rígida, aumentando la disipación).



**Figura 27.** Acercamiento del inicio de la adsorción de nanopartículas sobre glutaraldehído, donde se muestran las dos caídas de frecuencia que fueron observadas.

En la Figura 28 se observa que los lavados no causan desorción de las nanopartículas de la superficie, e incluso se observa una disminución en la frecuencia, debido a una posible incorporación de agua y iones debido a su interacción con la carga negativa del carboxilo, lo cual también se ve evidenciado por el aumento de la disipación.



**Figura 28.** Acercamiento de los lavados durante la adsorción de nanopartículas sobre glutaraldehído

Hasta antes de los lavados, se obtuvo una disminución en la frecuencia de -268 Hz, este valor se toma ya que la disminución de frecuencia posterior simplemente se debe a una hidratación de la superficie. Utilizando la ecuación de Sauerbrey se obtiene una masa adsorbida de 15.81 mg/m<sup>2</sup>, o 315.09 ng de nanopartículas. Con este valor y la masa de las nanopartículas (48kDa) podemos calcular la densidad de nanopartículas sobre la superficie, que es  $3.95 \times 10^{12}$  nanopartículas/cm<sup>2</sup>. Se inyectaron 256  $\mu$ L a una concentración 78  $\mu$ M, que son 958.46  $\mu$ g, por lo que se adsorbió solamente el 0.033% de la cantidad inicial.

Si tomamos en cuenta el área teórica ocupada por una nanopartícula (del tamaño que se reportó en la sección 5.1), podemos calcular que hay  $0.543 \times 10^{12}$  nanopartículas en una monocapa. Comparando este dato con la cantidad adsorbida, tenemos que teóricamente se formaron 1.44 capas de nanopartículas, alcanzándose la adsorción equivalente a una monocapa en -185 Hz o alrededor de los 156 minutos de adsorción.

Es interesante señalar que con este tipo de cálculo podemos señalar que 0.44 capas de nanopartículas equivalen a -81.46 Hz, esta magnitud es alcanzada cerca de los 17 minutos, tiempo en el que empieza a estabilizarse la frecuencia por primera vez en el experimento, lo que podría confirmar que las nanopartículas se adsorben entre los espacios vacíos dejados por el glutaraldehído y posteriormente forman una monocapa homogénea sobre la superficie. Si este fuera el caso, significaría que las nanopartículas no continúan adsorbiéndose después de formar una monocapa, esto puede ser debido a repulsiones entre las cargas negativas de los carboxilos del recubrimiento de ácido mercaptoacético alrededor de las nanopartículas.

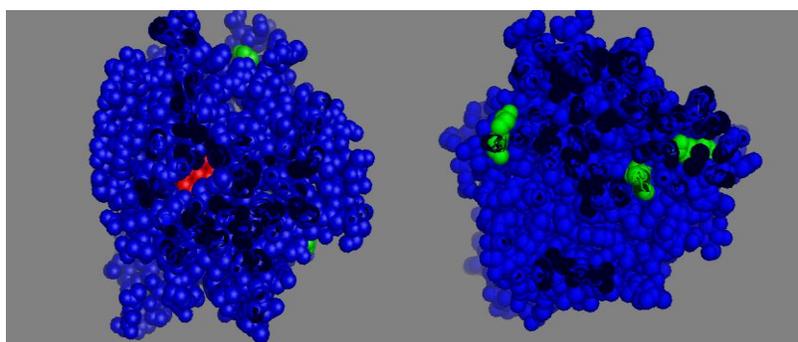
Cabe señalar que para estas estimaciones se utiliza el área piezoeléctricamente activa de la superficie, que sólo corresponde a una parte (alrededor de 1/16) de ésta. Usando el área real aproximada, este valor aumenta a 4.96  $\mu$ g adsorbidos, o 0.51%. Esto equivale a 0.1033 nanomoles de nanopartículas de CdS en la superficie.

La magnitud final de la adsorción (con una disminución de frecuencia de -268 Hz) es similar a la reportada por Feifel y colaboradores [97] con la adsorción de nanopartículas de sílica recubiertas con ácido mercaptoacético sobre citocromo c a pH 7 (alrededor de -200 Hz). Sin embargo, el tiempo en el que se llega al 90% de la adsorción fue de alrededor de 500 minutos (8.3 horas), como se observa en la Figura 26. Este tiempo es muy superior al reportado por los mismos autores (<1 hora). Esto se debe a que el punto isoeléctrico del

citocromo c es de 10, por lo que al pH al cual se realiza este estudio esta proteína está cargada positivamente, lo que favorece la interacción entre la proteína y los grupos carboxilo del ácido mercaptoacético. Por el contrario, en nuestro caso la carga negativa del carboxilo interactúa con la carga parcial positiva del dipolo del glutaraldehído.

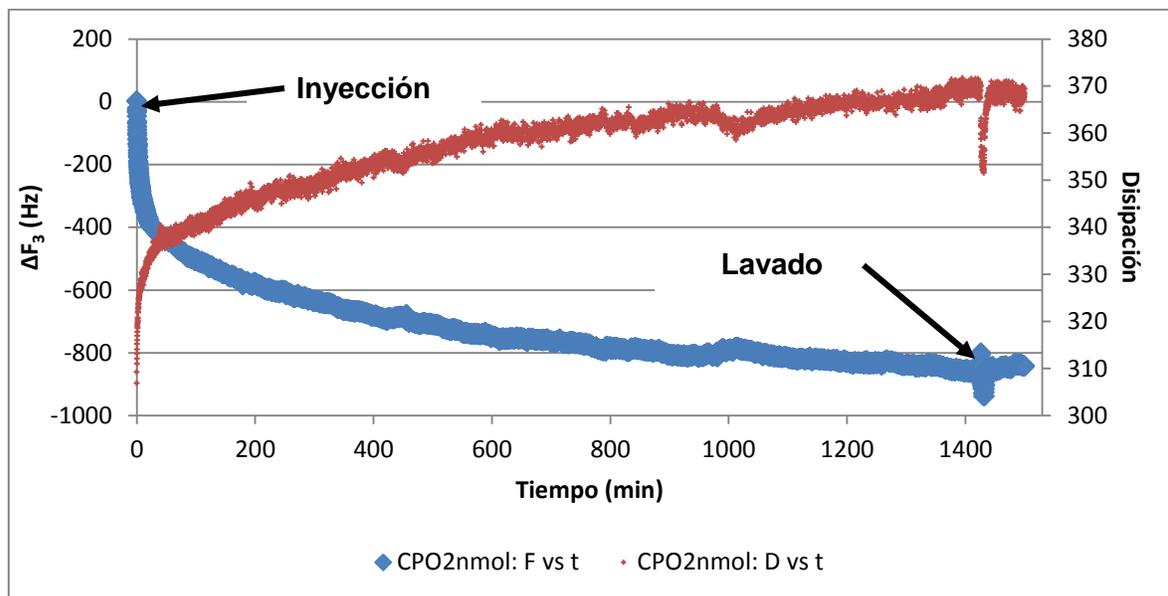
#### 5.4.2. Inmovilización de CPO

El último paso de esta sección es la inmovilización de CPO sobre las superficies creadas. En este punto la interacción puede estarse dando entre el grupo carboxilo terminal de las nanopartículas y/o aldehído terminal del glutaraldehído con las aminos de las lisinas de la CPO, las cuales se encuentran del lado contrario al sitio activo como se observa en la Figura 29.



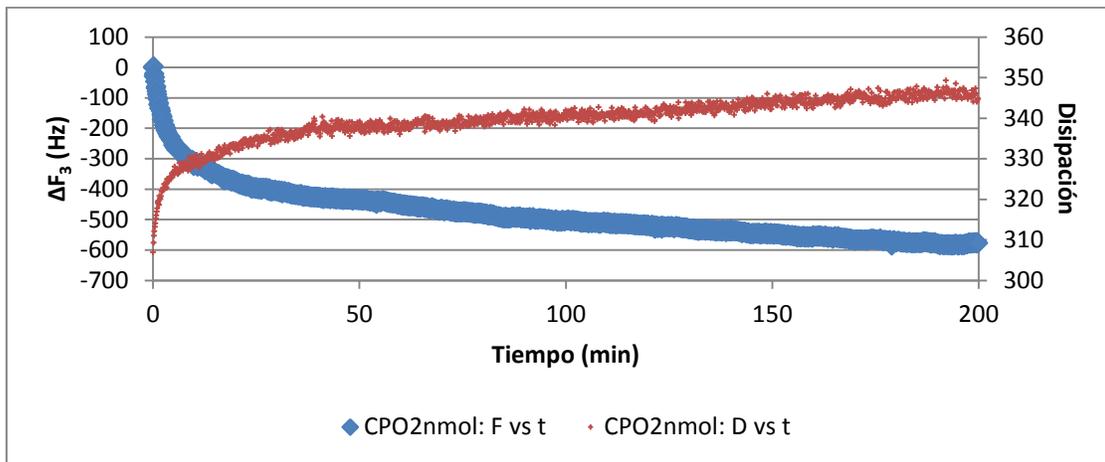
**Figura 29.** Sitio activo (en rojo, izquierda) y grupos amino libres (en verde, derecha) de la CPO. Estos dos esquemas son de lados opuestos de la enzima. Tomada de [17]

Esta interacción no es favorecida en ambientes acuosos [98]. Sin embargo, el punto isoelectrico de la CPO que se está utilizando es alrededor de 4 [95], por lo que al realizar la inmovilización a un pH de 3.5 se obtiene una carga positiva de la enzima, que favorece la interacción. La cinética de adsorción de CPO puede observarse en la Figura 30.



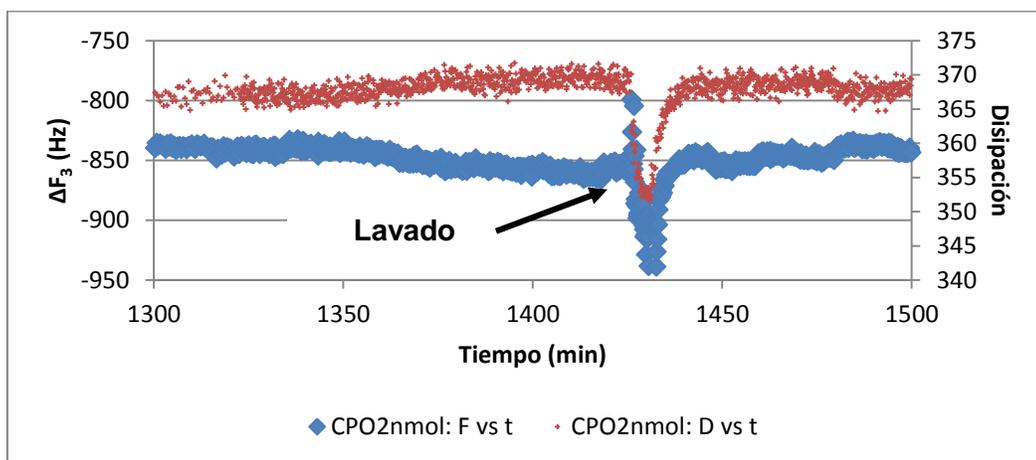
**Figura 30.** Cinética de adsorción de la CPO sobre la capa de nanopartículas

En la Figura 31 se muestra un acercamiento de los primeros 200 minutos de la adsorción de la CPO sobre la superficie. Podemos observar que la adsorción inicial se presenta de una manera rápida, si la comparamos con la adsorción de nanopartículas que se mencionó en la sección 5.4.1, se llega a un nivel de -200 Hz en alrededor de 3 minutos, esto se debe a que la inmovilización se realiza a pH 3.5, por debajo del punto isoeléctrico de la CPO, por lo que la reacción se ve favorecida, de igual manera que en el trabajo de Feifel y colaboradores [97] mencionado con anterioridad.

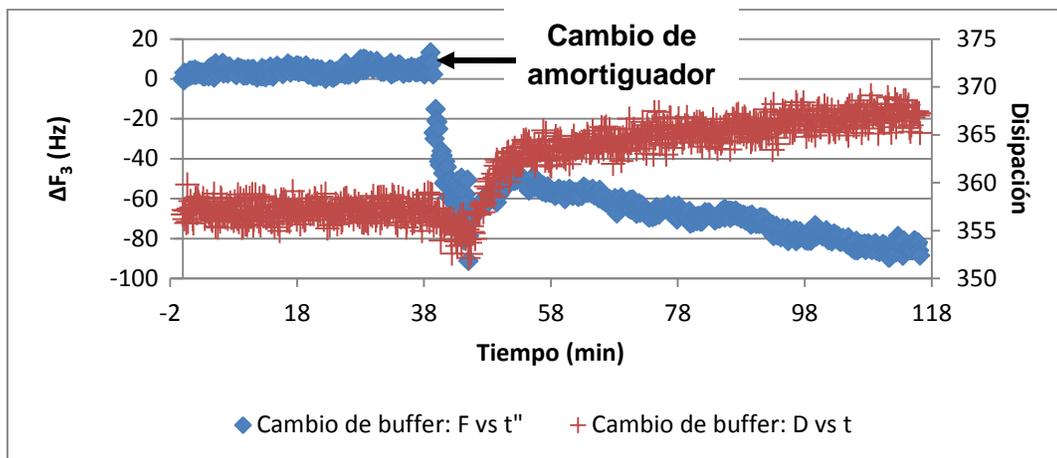


**Figura 31.** Acercamiento de los primeros 200 minutos de la adsorción de CPO

En la Figura 32 se muestra un acercamiento de los lavados, donde se observa que no existe una desorción de la CPO inmovilizada. Por otro lado, se realiza un cambio de amortiguador para llevar a cabo la reacción enzimática a pH 6, como se muestra en la Figura 33. En este caso tampoco se observa una pérdida de material de la superficie, incluso se observó más adsorción, debido posiblemente a la inclusión de agua e iones en la película formada (evidenciada por el aumento en la disipación). A pesar de que se cambia a un amortiguador con un pH más elevado que el punto isoeléctrico de la CPO (4), ésta no se desorbe debido a que el pKa del grupo amino de la lisina es de 10.53, por lo que mantiene una carga positiva, aunque la carga neta de la enzima sea en este caso negativa.



**Figura 32.** Acercamiento de los lavados posteriores a la adsorción de CPO



**Figura 33.** Cambio de amortiguador de pH 3 a pH 6 para la subsecuente prueba de actividad enzimática

En los experimentos de inmovilización de CPO realizados se obtuvo un cambio de frecuencia de -840 Hz después de los lavados. Utilizando la ecuación de Sauerbrey se obtiene una masa adsorbida de  $49.56 \text{ mg/m}^2$ , o  $987.73 \text{ ng}$  de la enzima. Con este valor y la masa de la CPO ( $42 \text{ kDa}$ ) podemos calcular la densidad enzimática sobre la superficie, que es  $7.1 \times 10^{13} \text{ CPO/cm}^2$ . Se inyectaron  $87 \text{ }\mu\text{l}$  a una concentración  $23 \text{ }\mu\text{M}$ , que son  $84.04 \text{ }\mu\text{g}$ , por lo que se adsorbió solamente el 1.175% de lo que se inyectó.

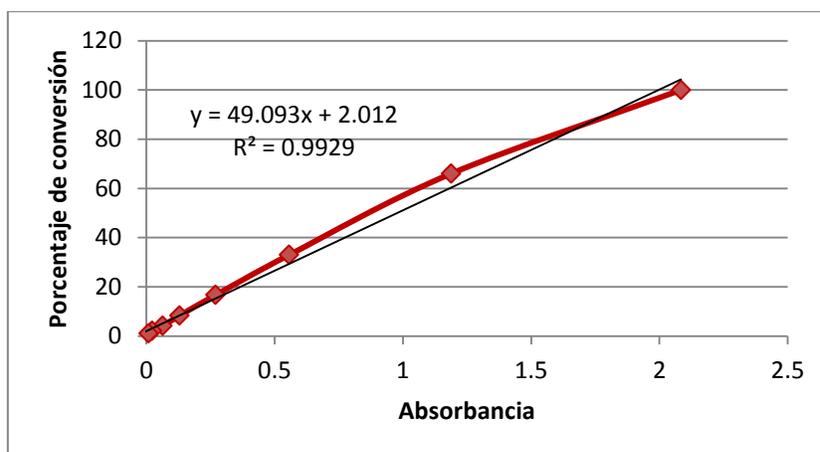
Si tomamos en cuenta el área teórica ocupada por la CPO (del tamaño que se reportó en la sección 5.1), podemos calcular que hay  $0.027 \times 10^{13}$  enzimas en una monocapa. Comparando este dato con la cantidad adsorbida, tenemos que teóricamente se formaron 52.4 capas de enzimas, alcanzándose la adsorción equivalente a una monocapa en -16 Hz o alrededor de los 10 segundos de adsorción. Este resultado nos indica por un lado la gran afinidad de la CPO por la superficie con nanopartículas inmovilizadas y por otro lado el hecho de que las enzimas pueden adsorberse fácilmente sobre sí mismas, lo cual refuerza la noción de que estas enzimas tienden a aglomerarse, como se conjeturó en el análisis de las Figuras 14 y 15.

Cabe señalar que para estas estimaciones se utiliza el área piezoeléctricamente activa de la superficie, que sólo corresponde a una parte (alrededor de 1/16) de ésta. Usando el área real aproximada, este valor aumenta a  $15.57 \text{ }\mu\text{g}$  adsorbidos, o 18.52%. Esto equivale a  $0.3707$  nanomoles de CPO. Estos resultados nos indican que la inmovilización de CPO fue llevada a

cabo exitosamente y se ha formado una capa de enzima estable. En la siguiente sección se muestran los resultados de actividad de este sistema de nanopartículas de CdS-CPO inmovilizadas en superficies de sílica.

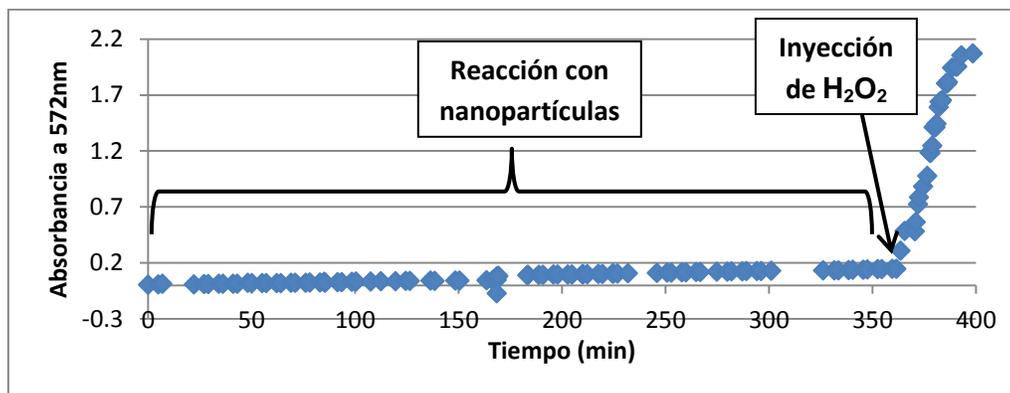
## 5.5. Actividad enzimática del sistema CPO - nanopartículas

En primer lugar se hizo la curva de conversión de Amplex Red normalizada, tomando la mayor conversión lograda con agua oxigenada en solución como el 100% como se explica en la metodología en la sección 4.5, este resultado se muestra en la Figura 34. Cabe señalar que se pierde la linealidad por arriba de 1.2 unidades de absorbancia, sin embargo todas las mediciones de actividad con nanopartículas tuvieron una absorbancia menor a 0.3, por lo que esta pérdida de linealidad no afecta los la actividad enzimática calculada.



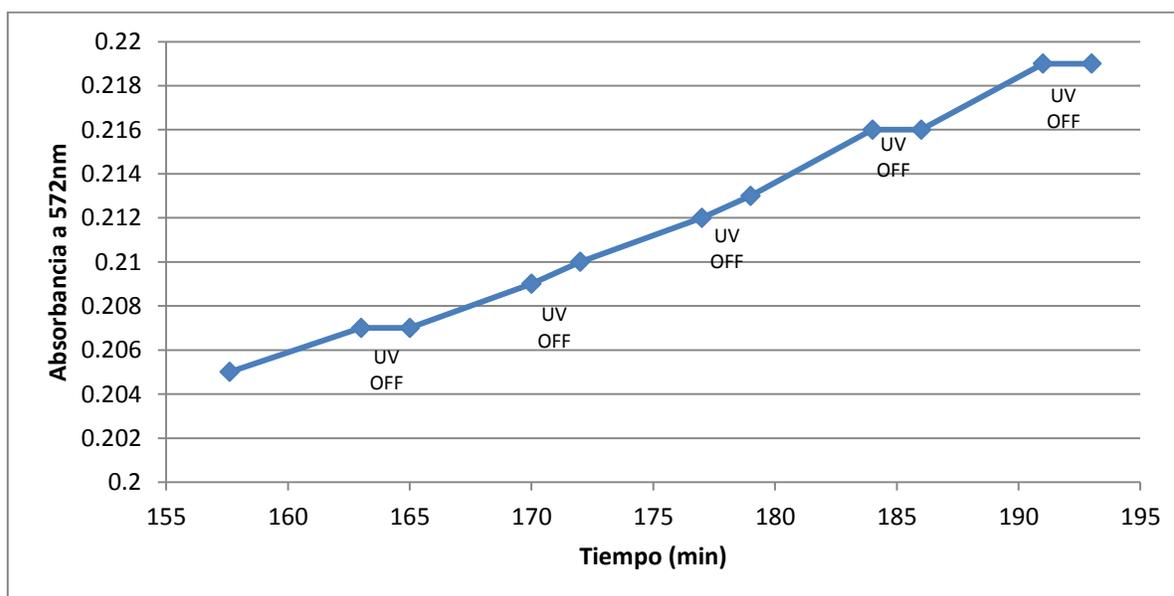
**Figura 34.** Curva estándar normalizada de conversión de Amplex Red (UV-Vis), el 100% se refiere a la máxima conversión alcanzada utilizando peróxido de Hidrógeno.

En la Figura 35 se muestra la reacción en solución, iniciada con irradiación de nanopartículas de CdS hasta alcanzar la máxima absorbancia, y una vez que este valor no cambiaba después de varios ciclos de irradiación, se continuó la oxidación del sustrato con  $H_2O_2$ .



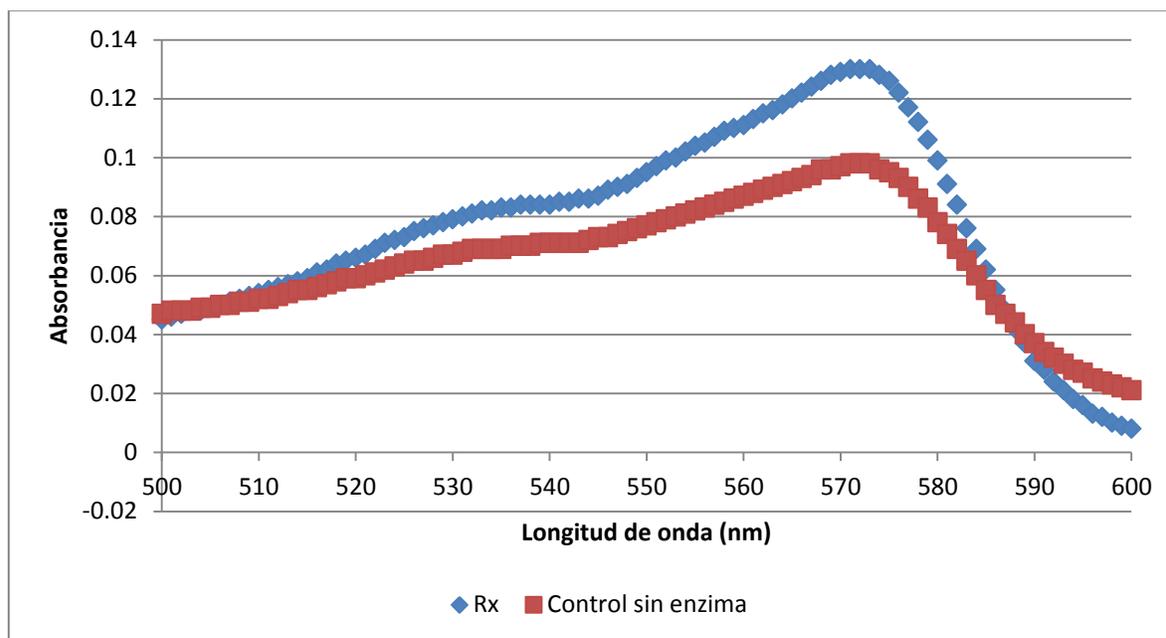
**Figura 35.** Seguimiento de la absorbancia de la resorufina en la reacción en solución utilizando nanopartículas de CdS y CPO en la primera parte; y  $H_2O_2$  como activador de la CPO en la última etapa

En la Figura 36 se muestra un acercamiento de una parte de la oxidación realizada a través de la irradiación de nanopartículas de CdS. Se observa que existe la posibilidad de modular la reacción al encender y apagar la lámpara UV a 365 nm, lo cual permite mantener constante la temperatura de la reacción, así como evitar parte del posible daño a la CPO por la irradiación.



**Figura 36.** Acercamiento del cambio de la absorbancia en la reacción en solución utilizando nanopartículas de CdS y CPO, utilizando ciclos de 5 minutos de irradiación y 2 minutos sin irradiar con luz UV a 365 nm.

La absorbancia máxima de la reacción en el sistema inmovilizado se muestra en la Figura 37, junto con el control que se utilizó, con las mismas condiciones excepto sin enzima. Se puede observar que el solo hecho de irradiar el Amplex Red provoca cierto nivel de oxidación, esto se debe a que es una molécula parcialmente sensible a la luz ultravioleta.



**Figura 37.** Espectro de absorbancia después de la oxidación de Amplex Red con el sistema inmovilizado (azul) y control con la misma concentración de Amplex Red y condiciones de irradiación pero sin agregar enzima (rojo) en solución.

En la Tabla 6 podemos observar que en solución se alcanza 4.17% de la conversión utilizando nanopartículas y 10 ciclos de irradiación, como se describe en la metodología. Si dividimos esto por 2 nanomoles de CPO (cantidad presente en solución) obtenemos 2.09% de conversión por nanomol. En el caso de la CPO inmovilizada se obtuvo 3.58% de conversión, si lo dividimos por 0.3707 nanomoles de CPO (cantidad de enzima que se logró inmovilizar, como se reportó en la sección 5.4.2) obtenemos 9.67 % de conversión por nanomol de CPO, lo cual es 4.62 veces mayor que el presentado por la enzima en solución.

También se puede ver que aunque la relación nanopartículas:CPO pasó de 10 : 1 a 0.278 : 1, la actividad inmovilizada es más del doble, por lo que se puede afirmar que las nanopartículas están en exceso en solución.

**Tabla 6.** Porcentajes de oxidación en las reacciones en solución y con el sistema inmovilizado. Se muestran los porcentajes de oxidación, teniendo en cuenta la conversión con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como 100%, y utilizando la ecuación de la recta obtenida en la Figura 34.

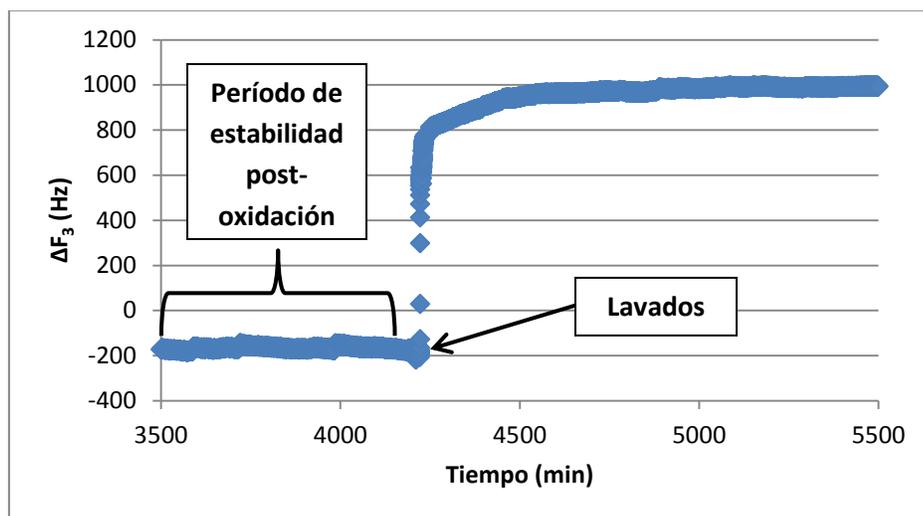
|  | En solución | Con el sistema inmovilizado |
|--|-------------|-----------------------------|
| Absorbancia  | 0.145       | 0.130                       |
| Porcentaje de oxidación<br>% = 49.093 Abs + 2.012          | 9.13        | 8.39                        |
| Porcentaje de oxidación<br>Restando el control (Abs 0.098) | 4.17        | 3.58                        |
| [CPO] presente   | 2 nmol      | 0.3701 nmol                 |
| Porcentaje de oxidación / [CPO]                            | 2.09        | 9.67                        |

## 5.6. Estabilidad del sistema

Un parámetro operacional muy importante del biosensor es su estabilidad. Esto implica en primer lugar que el sistema mantiene todos los elementos sobre la superficie después de realizar una oxidación. Esto se ilustra en la Figura 38, donde se puede ver la cinética de adsorción del sistema durante la oxidación y después de ésta, al realizar un lavado.

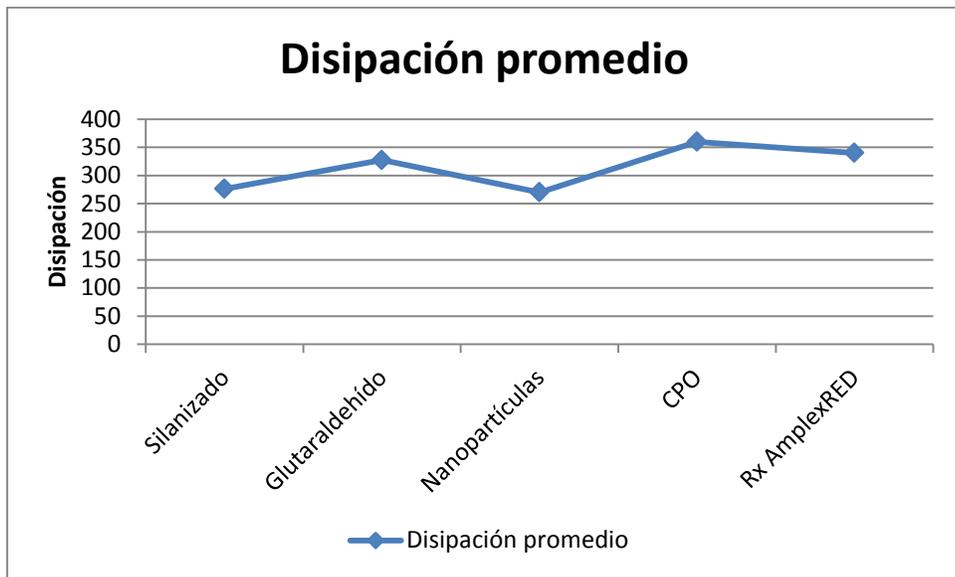
Se observa que durante la oxidación el sistema presenta una alta estabilidad, pero al realizar los lavados (alrededor de los 4150 minutos) la frecuencia aumenta alrededor de 1200 Hz, lo que equivale prácticamente al cambio de frecuencia combinado de nanopartículas y CPO (alrededor de -1080 Hz), más una parte del cambio del glutaraldehído. Esto puede deberse a que este último puede ser degradado por la irradiación o por la oxidación con radicales hidroxilo, lo que se ha reportado previamente sobre el glioxal (un

dialdehído homólogo) [90]. También puede deberse a que las nanopartículas presenten una gran afinidad por el producto de la reacción, la resorufina. Recordemos que las nanopartículas están unidas por interacciones ion – dipolo al glutaraldehído, siendo la interacción más débil del sistema.



**Figura 38.** Seguimiento del cambio de frecuencia durante los lavados después de la oxidación de Amplex Red

En cuanto al cambio de rigidez en el sistema, en la Figura 39 se observa la evolución de la disipación durante todo el ciclo de inmobilizaciones. Al inmobilizar glutaraldehído sobre la superficie, se puede ver que la disipación aumenta, esto quiere decir que la elasticidad de la película se incrementa, lo que va de acuerdo con la teoría, ya que se está formando una capa elástica de glutaraldehído sobre el 3-aminopropil trietoxisilano. En el siguiente paso, de inmobilización de las nanopartículas, la disipación promedio disminuye. Esto quiere decir que la capa inmobilizada sobre la superficie es más rígida, lo cual puede deberse a que las nanopartículas se adsorben en espacios vacíos entre moléculas de glutaraldehído, como ya se había mostrado anteriormente (Figura 27). La disipación vuelve a aumentar al inmobilizar la CPO, ya que ésta forma una capa elástica en la superficie. Finalmente la disipación disminuye durante la oxidación del Amplex Red, esto puede deberse a la inclusión del sustrato dentro de la enzima, formando una capa con mayor rigidez.



**Figura 39.** Cambio de la disipación promedio de las superficies durante los pasos de inmovilización.

## 6. Conclusiones

Se logró la síntesis de nanopartículas de CdS, con la capacidad de activación de las enzimas cloroperoxidasas tanto en solución como en superficie. Sin embargo, es necesario estudiar más a fondo la estabilidad de las nanopartículas sintetizadas, ya que se observó que existe un proceso de aglomeración de las nanopartículas con el tiempo.

Mediante el uso de la QCM principalmente, se encontraron las condiciones que permiten la inmovilización de las nanopartículas de CdS y la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* en superficies modelo planas de sílica funcionalizadas con glutaraldehído, analizando las características de cada una de las capas que forman el sistema, así como sus interacciones:

- La silanización de las superficies se llevó a cabo con una deposición desde fase vapor, obteniendo valores de ángulo de contacto acordes con lo reportado en la literatura. Se encontró que para la funcionalización con glutaraldehído es necesario realizar silanizaciones que produzcan ángulos de contacto  $>45^\circ$ . Este resultado sugiere que la interacción del glutaraldehído con la superficie se da principalmente debido a interacciones hidrofóbicas.
- Con respecto a la funcionalización con glutaraldehído puede decirse que se logró de manera positiva, sin embargo la capa formada es muy grande (44 nm), por lo que podría existir una polimerización, produciendo una superficie poco homogénea y reduciendo así la estabilidad del sistema en conjunto. Los resultados encontrados sugieren que puede reducirse el tiempo de funcionalización para formar una capa más delgada y homogénea.
- La inmovilización de nanopartículas se llevó a cabo de manera adecuada, adsorbiéndose un total de 1.44 capas. De esta manera, podría reducirse el tiempo de inmovilización a alrededor de 156 minutos sobre una capa homogénea de glutaraldehído y bajo las mismas condiciones de adsorción.

- La inmovilización de cloroperoxidasa en último lugar se lleva a cabo de manera ordenada, mostrando una gran afinidad por la capa de nanopartículas evidenciada por la alta velocidad de adsorción inicial, así como por la formación de una monocapa en alrededor de 10 segundos. Es importante controlar el tiempo de adsorción, ya que llegan a formarse multicapas de enzimas sobre la superficie, lo cual aumentaría el costo del biosensor sin ninguna ventaja aparente.

Se logró medir la actividad de la enzima inmovilizada, utilizando nanopartículas de CdS irradiadas como activador de la enzima, sustituyendo al peróxido de Hidrógeno. La actividad de la enzima inmovilizada fue casi 4.6 veces mayor que la que se presentó cuando la enzima y las nanopartículas estaban en solución, por lo que si se considera inmovilizar el sistema en un material mesoporoso donde hay más área disponible, la inmovilización del sistema es una propuesta adecuada.

La estabilidad del sistema es un parámetro muy importante, sin embargo existe un desprendimiento de los componentes del mismo después de realizar una cinética y realizar un lavado para remover los productos de reacción. Al observar el aumento de frecuencia (1200 Hz), se notó que es un valor similar al de la suma de las adsorciones de nanopartículas y CPO, por lo que probablemente el punto de ruptura estuvo en la unión entre las nanopartículas y el glutaraldehído, siendo así la principal limitante de la estabilidad del biosensor. Por otro lado, es posible también que el glutaraldehído sea degradado por la irradiación o por la oxidación con radicales hidroxilo, ya que estos fenómenos se han reportado con un dialdehído homólogo (glioxal).

En resumen, se logró entender los mecanismos e interacciones entre los componentes del sistema, permitiendo de esta manera la correcta inmovilización de los componentes del sistema. En el caso de las limitaciones de estabilidad que se presenta el sistema, éstas podrían superarse al inmovilizarlo en materiales mesoporosos.

## 7. Perspectivas

- Investigar los efectos del confinamiento inmovilizando el sistema en diferentes materiales, como los mesoporosos, esto nos dará una mejor perspectiva para poder estudiar los fenómenos de difusión de las especies de Oxígeno reactivas, pudiendo así optimizar estequiometrías de los componentes inmovilizados, para mejorar la actividad y estabilidad del sistema.
- Investigar el mecanismo de creación de complejos nanopartícula – enzima en solución para determinar la posibilidad de su inmovilización manteniendo o aumentando niveles de actividad del sistema.
- Realizar la silanización de las superficies (o los materiales) desde fase líquida, para poder seguir la cinética de adsorción y tener un mayor control sobre el proceso en general.
- Estudiar diferentes candidatos de moléculas espaciadoras para sustituir al glutaraldehído, incluyendo el uso de las mismas nanopartículas cumpliendo la función de espaciador.
- Estudiar la cinética enzimática de la cloroperoxidasa, de esta manera puede darse una comparación más completa entre las reacciones en solución e inmovilizadas, posibilitando así un mejor análisis de la actividad y un mejor entendimiento de los parámetros necesarios para el desarrollo de biosensores.
- Utilizar elipsometría como técnica para la determinación del grosor de las películas formadas, así como microscopía de fuerza atómica (AFM) para poder observar las características morfológicas de las capas de cada uno de los componentes del sistema.
- Entender y aplicar los métodos numéricos necesarios para calcular de una manera más precisa la masa adsorbida en las superficies en el caso de películas viscoelásticas.
- Probar el sistema ya optimizado en determinación de compuestos azufrados en muestras de combustibles.

## Glosario y abreviaturas

**Absorbancia.** Medida de la capacidad de una sustancia de absorber luz a una longitud de onda específica.

**Absorción.** Introducción de átomos, moléculas o iones al interior de otro material.

**Adsorción.** Adhesión de átomos, iones o moléculas desde un gas, líquido o sólido disuelto a una superficie.

**Banda de conducción.** Intervalo de energías electrónicas que permite a los electrones sufrir aceleraciones por la presencia de un campo eléctrico externo y por tanto permite la presencia de corrientes eléctricas. En semiconductores se encuentra por encima de la banda prohibida.

**Banda de valencia.** Es la banda más alta que se encuentra ocupada por electrones a una temperatura de 0 absoluto en sólidos. En semiconductores, estos electrones pueden pasar a la banda de conducción.

**Banda prohibida.** Conocida como bandgap en inglés, es la diferencia de energía entre la parte superior de la banda de valencia y la parte inferior de la banda de conducción en semiconductores.

**Biosensor.** Dispositivo que utiliza un organismo vivo o biomoléculas, en especial enzimas o anticuerpos, para detectar la presencia de químicos.

**Confinamiento cuántico.** Cuando se da este fenómeno, las partículas que originalmente tenían la libertad de moverse en 3 dimensiones son forzadas a ocupar una zona acotada en 2 dimensiones.

**Cromofórico.** Propiedad de las moléculas que absorben energía electromagnética, responsable del color.

**Disipación.** El cociente entre las energías disipadas y almacenadas por la oscilación en una película viscoelástica.

**Enzima.** Catalizador de reacciones bioquímicas. Muchas de ellas son proteínas con un gran complejo molecular cuya acción depende de su forma particular.

**Especie reactiva de Oxígeno.** Moléculas químicamente reactivas que contienen Oxígeno. Pueden ser peróxidos o iones de Oxígeno.

**Excitón.** Combinación entre un electrón y un hueco.**Peroxidasa.** Enzima que cataliza reacciones de oxidación de un sustrato utilizando peróxido de hidrogeno como cofactor.

**Fisorción.** Adsorción física en la que la estructura electrónica de la molécula adsorbida no cambia, es decir, no hay una interacción química.

**Fluorescencia.** Emisión de fotones a una longitud de onda diferente de la luz absorbida por la sustancia.

**Funcionalización.** Adición de grupos funcionales a la superficie de un material por métodos químicos.

**FRET (Transferencia de Energía por Resonancia Fluorescente).** Técnica fluorescente que permite la investigación de las interacciones moleculares. Esta depende de la transferencia de energía de un fluoróforo a otro fluoróforo cuando las dos moléculas se encuentran en proximidad.

**Grupo hemo.** Grupo prostético de proteínas conjugadas hemoproteínas como hemoglobina, mioglobina y citocromos de la cadena de transferencia de electrones y de enzimas como catalasas y peroxidasas. Su estructura consiste en un anillo de porfirina constituido por cuatro anillos pirrol que rodean un átomo de hierro el cual puede establecer seis enlaces de coordinación con átomos diferentes.

**Interfase.** Superficie entre dos fases físicas o químicas diferentes.

**Material mesoporoso.** De acuerdo a la clasificación de IUPAC son aquellos materiales que contengan poros con diámetros entre 2 y 50 nm. Sus estructuras porosas ordenadas con distribuciones de poros estrechos y paredes gruesas les dan gran estabilidad.

**Movimiento Browniano.** Movimiento aleatorio que se observa en partículas microscópicas que se hallan en un medio fluido.

**Nanobiocatalizador.** Catalizador biológico conjugado con una nanopartícula.

**Nanohíbrido.** Ver nanobiocatalizador

**Nanomateriales.** Materiales de escala nanométrica.

**Punto isoeléctrico.** Es el valor de pH en el cual la carga total de una molécula es eléctricamente neutra.

**Radio de excitón de Bohr.** Un par electrón-hueco se suelen enlazar dentro de una longitud característica, y se calcula mediante la sustitución del núcleo atómico cargado positivamente con el agujero en la fórmula de Bohr.

**Semiconductor.** Elemento que se comporta como conductor o como aislante dependiendo del ambiente en el que se encuentre.

**Transductor.** Dispositivo capaz de transformar un determinado tipo de energía o señal de entrada en otra diferente de salida.

## **ABREVIATURAS**

AOT: Dioctil sulfoxinato de sodio.

CPO: Cloroperoxidasa.

DBT: Dibenzotiofeno.

FSM: Folded Sheet Material.

HRP: Peroxidasa de rábano, por sus siglas en inglés.

IR: Infrarrojo.

MAA: Ácido mercaptoacético, por sus siglas en inglés.

MCM: Mobil Crystalline Materials.

ppb: Partes por billón en inglés, partes por mil millones en español.

QCM: Microbalanza de cuarzo, por sus siglas en inglés.

QD: Punto cuántico, por sus siglas en inglés.

ROS: Especies de Oxígeno reactivas, por sus siglas en inglés.

SBA: Santa Barbara Amorphous type material.

TEV: Virus mosaico del tabaco, por sus siglas en inglés.

UV: Ultravioleta.

## Referencias

1. Vazquez – Duhalt, Torres E, Valderrama B, Le Borgne S. *Will biochemical catalysis impact the petroleum refining industry?* Energy and Fuels **2002**; 16: 1239 – 1250.
2. Legge AH, Krupa SV. *Acidic deposition: Sulphur and nitrogen oxides*. Alberta Government / Industry acid deposition research program, Lewis Publishers Inc **1990**: 659
3. Norma Oficial Mexicana NOM-086-SEMARNAT-SENER-SCFI-2005: *Especificaciones de los combustibles fósiles para la protección ambiental*. **2006**
4. Shafi R & Hutchings GJ. *Hydrodesulfurization of hindered dibenzothiophenes: an overview*. Catalysis Today **2000**; 59: 423 – 442
5. Gupta N, Roychoudhury PK, Deb JK. *Biotechnology of desulfurization of diesel: prospects and challenges*. Applied Microbiology and Biotechnology **2005**; 66: 356 – 366.
6. Babich IV, Mouliin JA. *Science and technology of novel processes for deep desulfurization of oil refinery streams: A review*. Fuel **2003**; 82: 607 – 631.
7. Torres E, Aburto J. *Chloroperoxidase-catalyzed oxidation of 4,6-dimethyldibenzothiophene as dimer complexes: Evidence for kinetic cooperativity*. Archives of Biochemistry and Biophysics **2005**; 437: 224-232.
8. Paulina Aburto Ríos. *Cuantificación del contenido de azufre en diesel mediante catálisis enzimática*. Tesis de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ingeniería Química. Febrero **2012**.
9. Alvarado B, Torres E. *Recent patents in the use of peroxidases*. Recent Patents on Biotechnology **2009**; 3:88-102.
10. Longoria A, Tinoco R, Torres E. *Enzyme Technology of Peroxidases: Immobilization, Chemical and Genetic Modification*. In Biocatalysis based on heme peroxidases, Eduardo Torres and Marcela Ayala (Eds). Springer-Verlag, **2010**. 1st Edition, Germany. ISBN 978-3-642-12626-0.
11. Hartmann M, Jung D. *Biocatalysis with enzymes immobilized on mesoporous hosts: the status quo and future trends*. Journal of Materials Chemistry **2010**; 20: 844–857.
12. Nicell JA, Wright H. *A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide*. Enzyme and Microbial Technology, **1997**; 21: 302 – 310.
13. Ipe BI, Lehning M, Niemeyer CM. *On the generation of free radical species from quantum dots*. Small **2005**; 1:706–709.
14. Ipe BI, Niemeyer CM. *Nanohybrids composed of quantum dots and citocromo P450 as photocatalysts*. Angewandte Chemie International Edition **2006**; 45:504–507.
15. Fruk L, Rajendran V, Spengler M, Niemeyer CM. *Light – induced triggering of Actividad peroxidasa using quantum dots*. Chembiochem **2007**; 8:2195–2198.

16. Gandubert VJ, Torres E, Niemeyer CM. *Investigation of cytochrome P450-modified cadmium sulfide quantum dots as photocatalysts* Journal of Materials Chemistry **2008**; 18, 3824-3830.
17. Aburto J, Ayala M, Bustos-Jaimes I, Montiel C, Terres E, Dominguez JM, Torres E. *Stability and catalytic properties of chloroperoxidase immobilized on SBA-16 mesoporous materials*. Microporous and Mesoporous Materials **2005**; 83:193-200.
18. Montiel C, Terrés E, Domínguez JM, Aburto J. *Immobilization of chloroperoxidase on silica-based materials for 4,6-dimethyl dibenzothiophene oxidation*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **2007**; 48:90-98.
19. Rosales-Hernández MC, Mendieta-Wejebe JE, Correa-Basurto J, Vázquez-Alcántara JI, Terres-Rojas E, Trujillo-Ferrara J. *Catalytic activity of acetylcholinesterase immobilized on mesoporous molecular sieves*. International Journal of Biological Macromolecules **2007**; 40:444-448.
20. Rosales Hernandez MC, Mendieta Wejebe JE, Vazquez Alcantara JI, Miranda Ruvalcaba R, García Serrano LA, Trujillo Ferrara J. *Immobilization of cytochrome P-450 on MCM-41 with different silicon/aluminum ratios*. Microporous and Mesoporous Materials **2005**; 80:25-31.
21. Niemeyer CM, Mirkin CA. *Nanobiotechnology. Concepts, Applications and Perspectives*. Wiley Interscience: **2004**; ISBN 3-527-30658-7: p 469.
22. Cheng MM, Cuda G, Bunimovich YL, Gaspari M, Heath JR, Hill HD, Mirkin CA, Nijdam AJ, Terracciano R, Thundat T, Ferrari M. *Nanotechnologies for biomolecular detection and medical diagnostics*. Current Opinion on Chemical Biology **2006**; 10:11-19.
23. A. Bianco MP. *Can Carbon Nanotubes be Considered Useful Tools for Biological Applications?* Advanced Materials **2003**; 15:1765-1768.
24. Boswell C. *The Technology Frontier in Alkane Activation*, Chemical Market Reporter. New York. **1999**.
25. Adam W, Lazarus M, Saha-Möller CR, Weichold O, Hoch U, Häring D, Schreier P. *Biotransformations with Peroxidases*. Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology **1999**; 63:73-108.
26. Dembitsky VM. *Oxidation, epoxidation and sulfoxidation reactions catalysed by haloperoxidases*. Tetrahedron **2003**; 59:4701–4720.
27. Hofrichter M, Ullrich R, Pecyna MJ, Liers C, Lundell T. *New and classic families of secreted fungal heme peroxidases*. Applied Microbiology and Biotechnology **2010**; 87: 871–897.
28. Ortiz de Montellano PR. *Catalytic Mechanisms of Heme Peroxidases*. In Biocatalysis based on heme peroxidases, Eduardo Torres and Marcela Ayala (Eds). Springer-Verlag **2010**. 1st Edition, Germany. ISBN 978-3-642-12626-0.
29. Casella L, Monzani E, Nicolis S. *Potential Applications of Peroxidases in the Fine Chemical Industries*. In Biocatalysis based on heme peroxidases, Eduardo Torres and Marcela Ayala (Eds). Springer-verlag **2010**. 1st Edition, Germany. ISBN 978-3-642-12626-0.
30. Torres E, Bustos-Jaimes I, Le Borgne S. *Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants*. Applied Catalysis B **2003**; 46: 1–15.

31. Husain Q, Husain M, Kulshrestha Y. *Remediation and treatment of organopollutants mediated by peroxidases: a review*. Critical Reviews in Biotechnology **2009**; 29(2): 94–119.
32. Polizzi KM, Bommarius AS, Broering JM, Chaparro-Riggers JF. *Stability of biocatalysts*. Current Opinion in Chemical Biology **2007**; 11:220-225.
33. Cao L. *Immobilized enzymes: science or art?* Current Opinion in Chemical Biology **2005**; 9:217-226.
34. Hartmann M. *Ordered mesoporous materials for bioadsorption and biocatalysis*. Chemistry of Materials **2005**; 17:4577–4593.
35. Cao L, van Langen L, Sheldon RA. *Immobilized enzymes carrier-bound or carrier-free?* Current Opinion in Biotechnology **2003**; 14:387-394.
36. Burness LT. *Mesoporous materials. Properties, preparation and applications*. Nova science Publisher, New York. **2009**, 1st Edition. ISBN 978-1-60741-051-5.
37. Diaz JF, Balkus KJ. *Enzyme immobilization in MCM-41 molecular sieve*. Journal of Molecular Catalysis B **1996**; 2:115-126.
38. Aburto J, Ayala M, Bustos-Jaimes I, Montiel C, Terrés E, Domínguez JM, Torres E. *Stability and catalytic properties of chloroperoxidase immobilized on mesoporous materials*. Microporous and Mesoporous Materials **2005**; 83:193-200.
39. Takahashi H, Li B, Sasaki T, Miyasaki C, Kajino T, Inagaki S. *Catalytic activity in organic solvents and stability of immobilized enzymes on the pore size and the surface characteristics of mesoporous silica*. Chemistry of Materials **2000**; 12:3301-3305.
40. Pichot C. *Reactive nanocolloids for nanotechnologies and microsystems*. In Colloidal Nanoparticles in Biotechnology, Abdelhamid Elaissari (Ed). John Wiley & Sons, Inc. **2008**. ISBN 978-0-470-23052-7.
41. Lin CA, Liedl T, Sperling RA, Fernandez-Arguelles MT, Costa-Fernandez JM, Pereiro R, Sanz-Medel A, Chang WH, Parak WJ. *Bioanalytics and biolabeling with semiconductor nanoparticles (quantum dots)*. Journal of Materials Chemistry **2007**; 17:1343–1346.
42. Bruchez M. Jr, Moronne M, Gin P, Weiss S, Alivisatos AP. *Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels*. Science **1998**; 281:2013–2016.
43. Smith AM, Gao X, Nie S. *Quantum-dot nanocrystals for in-vivo molecular and cellular imaging*. Photochemistry and Photobiology **2004**; 80:377–385.
44. Medintz IL, Uyeda HT, Goldmann ER, Mattoussi H. *Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing*. Nature Materials **2005**; 4:435–446.
45. Marinkovic S, Hoffmann N. *Efficient radical addition of tertiary amines to electron-deficient alkenes using semiconductors as photochemical sensitizers*. Chemical Communications **2001**; 17:1576-1578.
46. Hines MA, Guyot-Sionnest P. *Synthesis and characterization of strongly luminescing ZnS-capped CdSe nanocrystals*. Journal of Physical Chemistry **1996**; 100:468 – 471.
47. Sukhanova A, Venteo L, Devy J, Artemyev M, Oleinikov V, Pluot M, Nabiev I. *Highly stable fluorescent nanocrystals as a novel class of labels for immunohistochemical analysis of paraffin-embedded tissue sections*. Laboratory Investigation **2002**; 82: 1259 – 1262.

48. Somers RC, Bawendi MG, Nocera DG. *CdSe nanocrystal based chem/bio – sensors*. Chemical Society Reviews **2007**; 36:579 – 591.
49. Galian RE, DeLaGuardia M. *The use of quantum dots in organic chemistry*. Trends in Analytical Chemistry **2009**; 28:279 – 291.
50. Alivisatos AP. *Perspectives on the physical chemistry of semiconductor nanocrystals*. Journal of Physical Chemistry **1996**; 100:13226–13239.
51. Nabiev I, Sukhanova A, Artemyev M, Oleinikov V. *Fluorescent colloidal particles as detection tools in Biotechnology systems*. In Colloidal Nanoparticles in Biotechnology, primera edición, Abdelhamid Elaissari (Ed). John Wiley & Sons, Inc. Estados Unidos de América, **2008**. ISBN 978-0-470-23052-7.
52. Sukhanova A, Devy J, Venteo L, Kaplan H, Artemyev A, Oleinikov V, Klinov D, Pluot M, Cohen JHM, Nabiev I. *Biocompatible fluorescent nanocrystals for immunolabeling of membrane proteins and cells*. Analytical Biochemistry **2004**; 324:60-67.
53. Rajendran V, Lehnig M, Niemeyer CM. *Photocatalytic activity of colloidal CdS nanoparticles with different capping ligands*. Journal of Materials Chemistry **2009**; 19:6348–6353.
54. Duong HD, Rhee JI. *Use of CdSe / ZnS core-shell quantum dots as energy transfer donors in sensing glucose*. Talanta **2007**; 73:899–905.
55. Rajendran V, König A, Rabe KS, Niemeyer CM. *Photocatalytic activity of protein-conjugated CdS nanoparticles*. Small **2010**; 6:2035–2040.
56. Urlacher VB, Eiben S. *Cytochrome P450 monooxygenases: perspectives for synthetic application*. Trends in Biotechnology **2006**; 24:324-330.
57. Valderrama B, Ayala M, Vazquez-Duhalt R. *Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes*. Chemistry and Biology **2002**; 9:555-565.
58. Burton SG. *Oxidizing enzymes as biocatalysts*. Trends in Biotechnology **2003**; 21:543-549.
59. Xu, F. *Applications of oxidoreductases: Recent progress*. Industrial Biotechnology **2005**; 1:38-50.
60. Yiu HHP, Wright PA. *Enzymes supported on ordered mesoporous solids: a special case of an inorganic-organic hybrid* Journal of Materials Chemistry **2005**; 15:3690-3700.
61. Ayala M, Verdin J, Vazquez-Duhalt R. *The prospects for peroxidase-based biorefining of petroleum fuels* Biocatalysis and Biotransformation **2007**; 25:114 – 129.
62. Zuñiga K. *Actividad enzimática de la cloroperoxidasa en sistemas con solventes orgánicos*. UNAM, Ciudad Universitaria, **2002**.
63. Montiel M. *Inmovilización de la cloroperoxidasa en materiales mesoporosos*. UNAM, Ciudad Universitaria, **2003**.
64. Adler JF, McCallum JJ. *Piezoelectric crystals for mass and chemical measures. A review*. Analyst **1983**; 108: 1169
65. Deakin MR, Buttry DA. *Electrochemical applications of the quartz crystal microbalance*. Analytical Chemistry **1989**; 61(20): 1147A – 1154A.

66. Guibault GG, Jordan JM. *Analytical uses of piezoelectric crystals: A review*. CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry **1988**; 1: 1 – 28.
67. Sauerbrey G. *The use of quartz oscillators for weighing thin layers and for microweighing*. Z. Phys. **1959**; 155:206
68. Rajakovic L, Ghaemmaghami V, Thompson M. *Adsorption of film-free and antibody-coated piezoelectric sensors*. Analytica Chimica Acta **1989**; 217:111.
69. Carter RM, Jacobs MB, Lubrano GJ, Guilbault GG. *Piezoelectric detection of ricin and affinity-purified goat anti-ricin antibody*. Analytical Letters **1995**; 28:1379.
70. Kontturi ET, Tammelin T. *Cellulose - model films and the fundamental approach*. Chemical Society Reviews **2006**; 35:1287-1304.
71. Davis F, Higson SPJ. *Structured thin films as functional components within biosensors*. Biosensors and Bioelectronics **2005**; 21:1 – 20.
72. Josefsson P, Henriksson G, Wagberg L. *The physical action of cellulases revealed by a Quartz Crystal Microbalance study using ultrathin cellulose films and pure cellulases*. Biomacromolecules **2008**; 9:249 – 254
73. Hovgaard MB, Dong M, Otzen DE, Besenbacher F. *Quartz crystal microbalance studies of multilayer glucagon fibrillation at the solid liquid interface*, Biophysics Journal **2007**; 93:2162 – 2169.
74. Alvarez-Icaza M, Bilitewzki U. *Mass production of biosensors*. Analytical Chemistry **1993**; 65:525A – 533A.
75. Guibault GG, Luong JHT, Prusak-Sochaczewski E. *Immobilization methods for piezoelectric biosensors*. Nature Biotechnology **1989**; 7:349 – 351.
76. Reusch William. *Virtual text of Organic Chemistry*  
<http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/intro1.htm> (Consultado 05/Oct/2012), **1999**
77. Zetasizer Nano Series User Manual, Malvern Instruments, Issue 1.1. Feb **2004**
78. Lakowicz JR. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd edition. Springer Science, **2006** ISBN – 13: 978 – 0387 – 31278 – 1.
79. Owen T. *Fundamentals of modern UV – Visible spectroscopy*. Agilent Technologies, Germany **2000**. Publication number: 5980 – 1397E.
80. Yang X, Wang P, Zhu Y, Li C. *Photoelectric properties of horseradish peroxidase-functionalized CdSe/silica mesoporous composite and its sensing towards hydrogen peroxide*. Journal of Solid State Electrochemistry **2011**; 15:731–736.
81. Wang Z, Xu Q, Wang HQ, Yang Q, Yu JH, Zhao YD. *Hydrogen peroxide biosensor based on direct electron transfer of horseradish peroxidase with vapor deposited quantum dots*. Sensors and Actuators B - Chemical **2009**; 138:278–282.
82. Wang HQ, Li YQ, Wang JH, Xu Q, Li XQ, Zhao YD. *Influence of quantum dots' quantum yield to chemiluminescent resonance energy transfer*. Analytica Chimica Acta **2008**; 610,68–73.
83. Razumovitch J, De Franca K, Kehl F, Wiki M, Meier W, Vebert C. *Optimal Hybridization efficiency upon immobilization of oligonucleotide double helices*. Journal of Physics Chemistry B **2009**; 113:8383 – 8390.

84. Zhou M, Diwu Z, Panchuk-Voloshina N, Haugland RP. *A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide*. Analytical Biochemistry **1997**; 253:162.
85. Krasnoslobodstev AV, Smirnov SN. *Effect of water on silanization of silica by trimethoxysilanes*, Langmuir **2002**; 18: 3181 – 3184.
86. Howarter JA, Youngblood JP. *Optimization of silica silanization by 3-aminopropyltriethoxysilane*, Langmuir **2006**; 22:11142 – 11147.
87. Chauhan AK, Aswal DK, Koiry SP, Gupta SK, Yakhmi JV, Sürgers C, Guerin D, Lenfant S, Vuillaume D. *Self – assembly of the 3 – aminopropyltriethoxysilane multilayers on Si and hysteretic current – voltage characteristics*, Applied Physics A **2008**; 90:581 – 589.
88. Blinka E, Loeffler K, Hu Y, Gopal A, Hoshino K, Lin K, Liu X, Ferrari M, Zhang XJ. *Enhanced microcontact printing of proteins on nanoporous silica surface*. Nanotechnology **2010**; 21: 415302
89. Tanrizeven A, Ölcer Z. *A novel method for the immobilization of glucoamylase onto polyglutaraldehyde – activated gelatin*, Biochemical Engineering Journal **2008**; 39:430 – 434
90. Ervens B, Volkamer R. *Glyoxal processing outside clouds: towards a kinetic modeling framework of secondary organic aerosol formation in aqueous particles*. Atmospheric Chemistry and Physics Discussions **2010**; 10:12371 – 12431.
91. Eriksson J, Malmsten M, Tiberg F, Callisten TH, Johansen KS. *Model cellulose films exposed to H. insolens glucoside hydrolase family 45 endo-cellulase—the effect of the carbohydrate-binding module*. Journal of Colloid and Interface Science **2005**; 285:94–99.
92. Liu JZ, Wang M. *Improvement of activity and stability of chloroperoxidase by chemical modification*. BMC Biotechnology **2007**; 7: 23.
93. Migneault I, Dartiguenave C, Bertrand MJ, Waldron KC. *Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking*. BioTechniques **2004**; 37: 790 – 802.
94. Edsall JT, Wyman J. *Biophysical Chemistry*. Academic Press, **1958**. New York
95. Jung D, Streb C, Hartmann M. *Covalent Anchoring of Chloroperoxidase and Glucose Oxidase on the Mesoporous Molecular Sieve SBA-15*. International Journal of Molecular Sciences **2010**; 11:762-778.
96. Cooper MA, Singleton VT. *A survey of the 2001 to 2005 quartz crystal microbalance biosensor literature: applications of acoustic physics to the analysis of biomolecular interactions*. Journal of Molecular Recognition **2007**, 20: 154 – 184.
97. Feifel SC, Ludwig R, Gorton L, Lisdat F. *Catalytically active silica nanoparticle based supramolecular architectures of two proteins – cellobiose dehydrogenase and cytochrome c on electrodes*. Langmuir **2012**, 28: 9189 – 9194.

98. Griffith EC, Vaida V. *In situ observation of peptide bond formation at the water-air interface*. Proceeding of the National Academy of Sciences **2012**; 109: 15529 – 15530.
99. Ian D Johnson and Michael W. Davidson, National High Magnetic Field Laboratory, Florida State University.  
<http://www.olympusmicro.com/primer/java/jablonski/lightandcolor/index.html>,  
consultado en Octubre de **2012**
100. Norde W. *Colloids and Interfaces in Life Sciences*. Editorial Marcel Dekker, New York, **2003**. ISBN 0-8247-0996-9.

**ANEXO : Capítulo aceptado para publicación.**

---

# 16

---

## ENHANCED FUNCTIONALITY OF PEROXIDASES BY ITS IMMOBILIZATION AT THE SOLID-LIQUID INTERFACE OF MESOPOROUS MATERIALS AND NANOPARTICLES

JOSÉ CAMPOS-TERÁN, IKER IÑARRITU, JORGE ABURTO, AND EDUARDO TORRES

### 16.1 INTRODUCTION

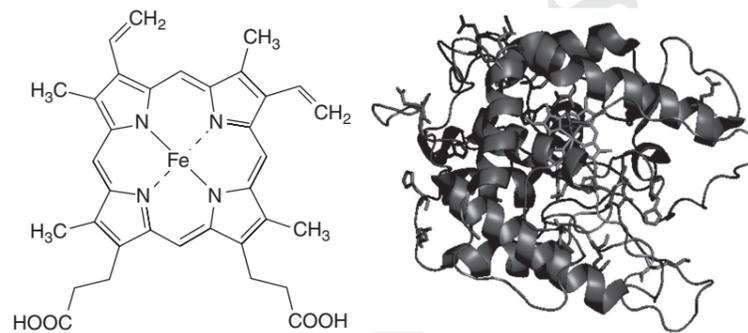
Enzymes are excellent biocatalysts with high specificity, selectivity, and efficiency. The exciting possibility of using enzymes in industry or laboratory is severely limited due to the high price and poor stability of most enzymes (1). Enzymes bound to solid supports can overcome some of these limitations (2). In addition, improved performance of immobilized enzymes is essential to achieve economical and widespread use of enzymes as biocatalysts. A range of supports have been described for proteins, each has associated advantages and disadvantages, for example, sol gels, hydrogels, organic microparticles, and nonporous and porous inorganic supports. The latter has proven to be an effective method for improving the functionality of enzymes, such as the immobilization on mesoporous materials (3). Immobilization of enzymes within a pore or on a surface with special physical chemistry characteristics such as the ones of the mesoporous materials, has allowed to enhance the enzyme performance and to produce more robust biocatalysts that are adapted to industrial conditions or commercial requirements (4).

On the other side, it is important to consider that nowadays it is possible to manipulate nanometer-length atoms and molecules in order to create, according to a bottom up technology, larger structures with outstanding properties (5). In this respect, inorganic semiconductor nanoparticles, often referred to as quantum dots (QDs), have attracted considerable interest in the past decade due to their unique size-tunable properties, strong luminescence, and high photo and physical stability. These nanomaterials have potential

applications in diverse fields including diagnostics (bioimaging, bioanalysis, biosensing), drug delivery, microarrays, nanosensing, nanoelectronics, and nanophotonics (5–9). Furthermore, QDs have been used as photosensitizers in organic reactions (10) and to generate reactive oxygen species (ROS) (11), which in turn can activate oxygen-consuming enzymes (12, 13). In this chapter the state-of-the-art in the generation of biocatalysts with peroxidases and mesoporous materials or nanoparticles is reviewed, detailing the methodology and the parameters that affect enzyme adsorption on the material, such as the pore size, superficial electrical charge of the enzyme and the material, chemistry of the material, enzyme concentration, enzyme structure, etc. Finally, the biocatalytic behavior of the biocatalyst is compared to other enzyme preparations, in terms of operational stability and catalytic activity.

### 16.2 PEROXIDASES' STRUCTURE AND ACTIVITY

Two major issues govern current interest in the use of catalytic oxidative transformations in industry. The first issue is the replacement of oxidations, which use a stoichiometric amount of heavy metal salts, by catalytic processes using hydrogen peroxide or oxygen as the oxidant. The second major issue is the need for high chemo-, regio-, or enantioselectivity in order to improve chemical yields, minimize waste streams, and avoid enantiomeric ballast (14). Peroxidases are enzymes found in all domains of life, which are potentially suitable biocatalysts for meeting these goals (15, 16).



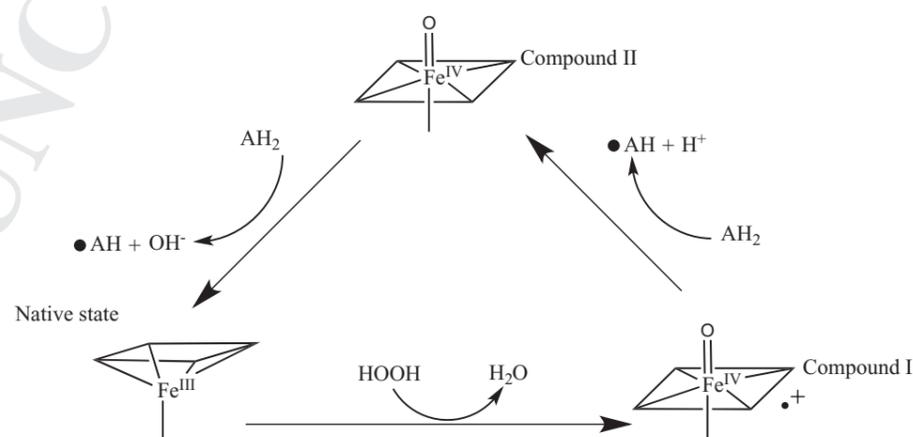
**FIGURE 16.1** (a) Molecular scheme of iron protoporphyrin IX, the heme active site of peroxidases. (b) Ribbon diagram of a chloroperoxidase with the heme active site shown in red color.

The majority of peroxidases are heme proteins bearing an iron protoporphyrin IX in the active site (see Fig. 16.1), but there are also several nonheme peroxidases containing either metals (vanadium haloperoxidases, manganese catalases) or specific metal-free prosthetic groups like the thiol peroxidases or the alkyl hydroperoxidases (17). They use hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) or organic hydroperoxides (ROOH) as electron-accepting cosubstrates while oxidizing a variety of compounds.

The reaction mechanism of peroxidases can be described in general terms as follows (18) (see Fig. 16.2): the heme group of the enzyme first reacts with one molecule of hydrogen peroxide to produce compound I. This compound is an oxoiron (IV)–porphyrin radical, or an oxoiron (IV)–protein radical, which is two oxidizing equivalents above the ferric state. During this reaction step, the hydrogen peroxide is reduced to water while the enzyme is oxidized. Compound I then oxidizes the reduced substrate ( $\text{AH}_2$ ) to give a substrate radical ( $\text{AH}\bullet$ ) and is reduced to compound II, which contains an oxyferryl center coordinated to a porphyrin. Usually, both

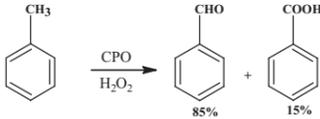
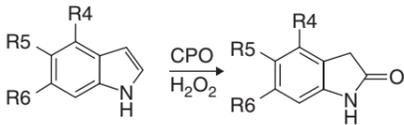
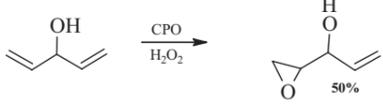
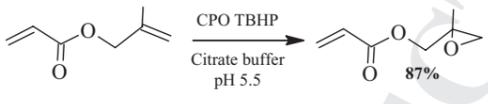
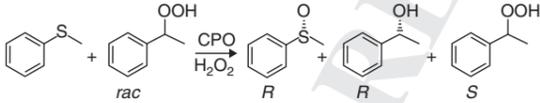
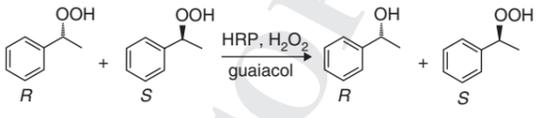
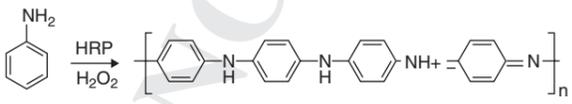
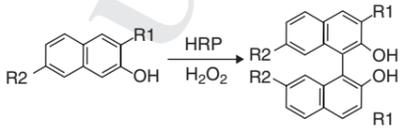
compounds I and II react with the same  $\text{AH}_2$ . Therefore, once the reaction between compounds I and  $\text{AH}_2$  start, compound II is produced and simultaneously reacts with a second molecule of  $\text{AH}_2$ . As a result, compound II is reduced back to the ferric state, corresponding to the native form of the enzyme, with concomitant oxidation of a second molecule of the substrate and production of water.

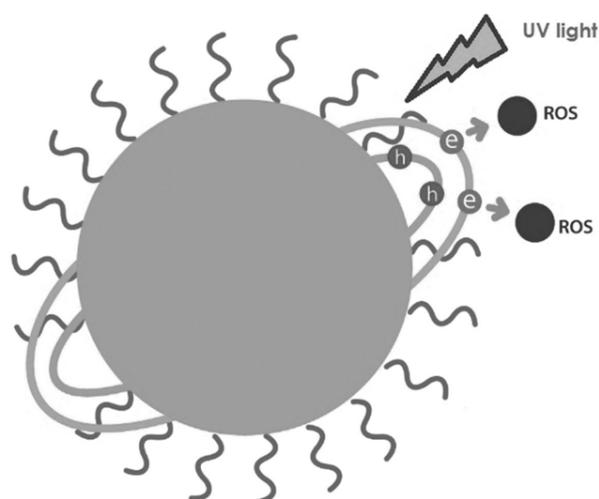
Through this general mechanism, peroxidases catalyze several oxidation reactions of industrial relevance such as the enantioselective oxidations of sulfides, enantioselective epoxidation of disubstituted alkenes, and enantioselective oxidation of racemic epoxyalcohols (19). They also catalyze the oxidations of pollutants like azo dyes, pesticides, and polycyclic aromatic hydrocarbons to less toxic and more degradable products (20, 21). Table 16.1 shows some characteristic reactions of oxidation carried out by chloroperoxidase (CPO), one of the most versatile of peroxidases. In addition, peroxidases have been frequently employed in biosensors as a final catalyst for the oxidation of a colorimetric substrate in an indirect way to quantify another analyte



**FIGURE 16.2** Catalytic cycle of peroxidases.

TABLE 16.1 Some Reactions Catalyzed by Peroxidases

| Reaction  | Observations  |
|---|---|
| <p>Oxidation of aromatic compounds</p>                       | Aliphatic hydrocarbon hydroxylation is a very important reaction that is difficult to achieve by chemical methods in soft conditions. The oxidation of toluene resulted in its quantitative conversion to benzaldehyde and benzoic acid.                    |
| <p>Oxidation of heteroatoms</p>                             | Selective indole oxidation is not an easy task and usually requires several steps with conventional synthetic organic methods. CPO allows the synthesis of oxindoles with high yields and selectivity.  |
| <p>Epoxidation</p>   | A very important tool for the preparation of chiral building blocks. The oxidation of shorter terminal olefins such as the C-5 prochiral dienes proceeded much more efficiently and resulted exclusively in the formation of the monoepoxides.              |
| <p>Enantioselectivities for epoxidation</p>                | The acrylate was an excellent substrate for CPO epoxidation and selectively afforded the monoepoxide in high yield and excellent enantioselectivity (87% yield).  |
| <p>Enantioselectivities for sulfoxidation</p>              | The best efficiency, both in terms of reaction rate and product, approaching 100% in several cases, was obtained with CPO.  |
| <p>Kinetic resolution of racemic alkyl hydroperoxides</p>  | One enantiomer of the oxidant preferentially reacted with the enzyme and the other enantiomer was left behind and accumulated in solution. The enzyme shows high selectivity in this reaction, and often almost enantio-pure hydroperoxide can be isolated. |
| <p>Oxidation of amines</p>                                 | The peroxidase reaction with amines usually gives rise to the formation of polymers, in this case polyaniline.  |
| <p>Oxidation of naphthyl derivatives</p>                   | In the presence of suitable substituents blocking the rotation of the naphthyl moieties, chiral binaphthyls can be obtained with enantiomeric enrichment.   |



**FIGURE 16.3** Schematic representation of a semiconductor nanoparticle quantum dot (QD).

and also to quantify directly analytes like polycyclic aromatic hydrocarbons, plaguicides, and phenols (22). Using peroxidases to catalyze the selective oxygen insertion reactions usually leads to energy savings, lower operating costs, increased safety and reduced pollutant emissions. When used in a biosensor, peroxidases showed high selectivity and high amplification signals for detection of ultralow analyte concentration. A complete description of the molecular structure and activity of peroxidases can be found elsewhere (23) (Fig. 16.3).

Nevertheless, a major limitation in the commercial use of peroxidases is their low stability due to different aspects including heme deactivation, redox potential modulation, protein denaturation, and substrate availability (24). Therefore, it is necessary to produce or find more robust enzymes for an eventual industrial process or commercial exploitation. As mentioned before, immobilization on a solid support can enhance enzyme stability as well as ease the separation and recovery for reuse while maintaining activity and selectivity. An immobilized enzyme is defined as a composite consisting of two essential components: the noncatalytic structural component (carrier) and the catalytic functional component, the enzyme. Therefore, an immobilized enzyme has to be characterized by two sets of variables, the noncatalytic and the catalytic parameter (25). In this regard, no matter which method is selected for immobilization, two essential needs should be accomplished for a given application, the catalytic (expressed as productivity, space–time yield, stability, and selectivity) and the noncatalytic ones (separation, control, downstreaming process, etc.). Nowadays, mesoporous materials and nanoparticles are two systems for immobilization of peroxidases that fulfill these requirements, and they will be described in the next sections.

### 16.3 IMMOBILIZATION OF PEROXIDASES IN MESOPOROUS MATERIALS

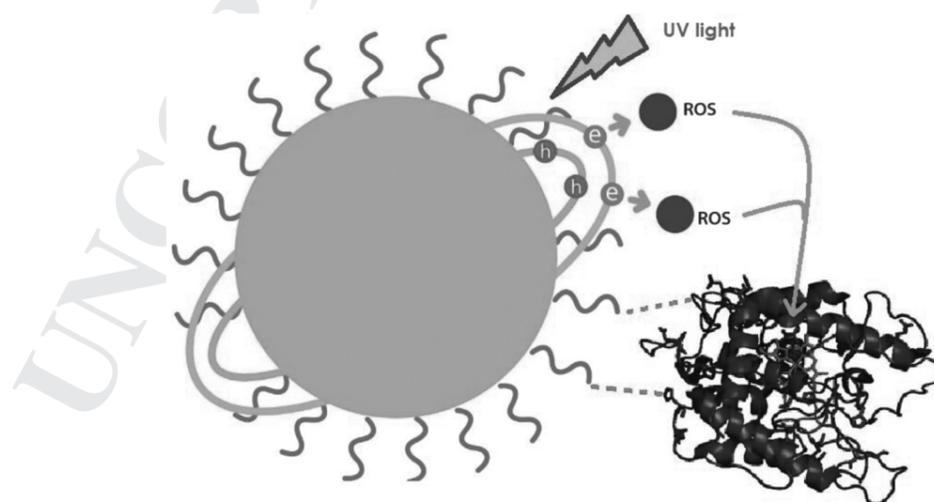
Mesoporous materials are synthesized through silica polymerization around regularly aligned micelles and subsequent template removal by extraction or calcination. According to the IUPAC classification, materials containing pores with diameters between 2 and 50 nm are named mesoporous materials. The term “nanoporous” materials is also used to describe these materials, although only loosely define them as materials having pores in the nanometer range. Mesoporous materials have attracted the attention of the scientific community due to their ordered porous structures with narrow pore size distributions and thick walls, which provide them with high stability, high pore volumes, and surface areas (26). The large regular repeating mesoporous structures of mesoporous silicates offer the possibility of adsorbing large molecules into their pores or surfaces like proteins, enzymes, or even whole microorganism. Additionally, depending on the conditions and chemical precursors used for their synthesis, different morphologies, such as hexagonal, cubic, or lamellar, and different pore sizes can be obtained (3, 26).

Table 16.2 describes some mesoporous materials reported for enzyme immobilization. As can be seen, mesoporous materials are characterized by high specific surface areas (up to ca. 1500 m<sup>2</sup>/g) and pore volumes (up to ca. 1.5 cm<sup>3</sup>/g), which renders them excellent candidates as inorganic hosts for biomolecules. Additionally, as can be observed in Table 16.2, mesoporous materials offer an important variety of structures and properties that allow choosing among different alternatives to carry out the biomolecule immobilization. Moreover, mesoporous silicates are silanol-containing surface materials that can be functionalized through conventional chemistry (27, 28). The functional groups required for such modification are likely to depend strongly on the chemical composition and structure of the enzyme being studied. Recent studies have shown that numerous functional groups, including amines, chlorides, thiols, carboxylic acids, and phenyl, may be attached successfully to the surface of mesoporous molecular sieves via tethering alkyl chains. These groups subsequently provide different interactions between the surfaces of the support and the enzyme molecules. By examining the functional groups on the surface of an enzyme molecule, a suitable “counter-functional group” on the surface of the support could provide strong interaction for immobilization. All these unique features make mesoporous materials excellent candidates for enzyme immobilization (4, 27, 28) (Fig. 16.4).

As shown before, different enzymes have been immobilized on mesoporous materials for adsorption and biocatalysis (see Table 16.2). The versatility of these materials has allowed enzyme immobilization of different nature like hydrolases, oxidases, and transferases. The factors governing the adsorption/immobilization of enzymes in mesoporous

**TABLE 16.2** Characteristics of Some Mesoporous Materials Used for Enzyme Adsorption and Catalysis

| Material Family | Surface Area (m <sup>2</sup> /g) | Pore Size (nm) | Pore Volume (cm <sup>3</sup> /g) | Observations   | Immobilized Enzymes   |
|-----------------|----------------------------------|----------------|----------------------------------|--|---|
| M41S            | Up to more than 1000             | 1.5–10         | 1.01–1.15                        | Three main subgroups have been reported: unidimensional hexagonal (MCM-41), three-dimensional (MCM-48), and thermally unstable lamellar (MCM-50) | MCM-41: cytochrome c, trypsin, papain, horseradish peroxidase, lipase, penicillin acylase, $\alpha$ -chymotrypsin, cytochrome P450, lysozyme  |
| SBA             | Up to more than 1000             | 5–30           | 0.56–0.94                        | Hexagonal array of 1D channels prepared under acidic conditions (SBA-15)<br>Body centered arrangement of cages (SBA-16)                          | SBA-15: cytochrome c, trypsin, horseradish peroxidase, cytochrome P450, chloroperoxidase, lysozyme, organophosphorus hydrolase, penicillin acylase, $\alpha$ -amylase, bovine serum albumin |
| MCF             | 700                              | 20–40          | 2.35                             | Three-dimensional, continuous, ultralarge-pore mesoporous materials. Consist of uniform spherical cells  | Glucose oxidase, $\alpha$ -amylase, chloroperoxidase, trypsin   |
| HMS             | 644–1100                         | 2–4            | 0.31–0.80                        | Channels arranged over a much shorter range in a hexagonal-like fashion and possess wormhole-like or sponge-like framework structures            | Hemoglobin, myoglobin   |
| FSM             | 950–1150                         | 2–9            | 0.64–2.3                         | Hexagonal array of channels prepared from kanemite   | FSM 16: horseradish peroxidase, subtilisin Carlsberg, acetylcholinesterase  |

**FIGURE 16.4** Sketch of a possible immobilization of peroxidases on a nanoparticle.

## 340 ENHANCED FUNCTIONALITY OF PEROXIDASES

materials have been already established in the scientific literature (4). A first evident factor is the pore size of the mesoporous material where those enzymes with higher molecular size will not have the ability to be retained in measurable quantities in the inner pore. However, if the pH is appropriate, some interactions between the protein and the material surface will be strong enough to retain an appreciable amount of organic molecules on the surface. For good physical adsorption and high enzyme load, it has been reported that the pore size of the material must be at least three times the size of the enzyme to avoid blocking the entrance of the pore (29).

Diaz and Balkus deduced that horseradish peroxidase (HRP,  $37 \times 43 \times 64 \text{ \AA}$ ) was not successfully immobilized, as it was too large to fit into the pores of the MCM (mobil corporate materials)-41 material (pore diameter ca. 4 nm) (30). Aburto et al. reported that CPO ( $60 \times 53 \times 46 \text{ \AA}$ ) was not immobilized in measurable amounts in SBA (Santa Barbara amorphous type)-16 material of 40 Å pore size (31). However, when the pore size was increased to 90 Å, it adsorbed up to 23 nmol enzyme/g material. Using SBA-15, 67 nm pore size, a maximum load of 622 nmol CPO enzyme/g material was achieved, and by increasing twice the pore size (143 Å), it was possible to immobilize up to 5725 nmol CPO/g material, at nine times higher enzyme load. Takahashi et al. reported a similar result for the immobilization of HRP using a FSM (folded sheet mesoporous) material, where it immobilized six times more enzyme when the pore size increased from 27 Å to 89 Å (32). Since the silica material contains an overall negative charge by its low isoelectric point (about 2), it is necessary that the enzyme bear a positive average charge for a good electrostatic interaction. However, it has been reported that the proper pH is the one for the isoelectric point of the protein because it provides a number of appropriate charges to interact with the material without causing enzyme–enzyme repulsions on the surface.

In terms of enzyme stability, both material pore size and enzyme should have similar size in order to protect the protein from the external environment. Takahashi et al. reported that for improved activity and enhanced stability in systems containing organic solvents, pores for the immobilization of HRP should be large enough to accommodate the enzyme but should size match; therefore they suggest that if the pore is too big, the enzyme will not be as well protected as it might be when the enzyme just fits inside the pores (32). They immobilized HRP on several silica mesoporous materials such as FSM-16, MCM-41, and SBA-15 with various pore diameters from 27 Å to 92 Å. The immobilized HRP on FSM-16 and MCM-41 with pore diameter 50 Å showed the highest enzymatic activity in organic toluene and also thermal stability in aqueous solution at the temperature of 70°C. The immobilized enzymes on the other mesoporous materials including large- or small-pore-sized FSM-16 showed lower enzymatic activity in organic solvent and lower thermal stability (32).

Aburto et al. physically immobilized CPO from *Caldariomyces fumago* on SBA-16 of 90 Å. In this case, the enzyme had a higher thermostability than the free enzyme, retaining 50% of its activity at 45°C after 187 h while the free enzyme was half-inactivated after 68 hours (31). This could be due to the restricted movement of the immobilized enzyme confined in the pores of this material. In contrast, the immobilization in a material with a larger pore of 117 Å did not improve the thermostability of the enzyme, probably due to the fact that larger pores did not prevent the increased conformational flexibility of the enzyme at this temperature (33). The same preparation with 90 Å improved the stability against urea, a common protein denaturant (34). Han et al. immobilized CPO in mesoporous mesocellular foam (MCF) silicate material of 15 nm pore size, several times bigger the enzyme size (35). The immobilization of CPO on this material did not improve the stability of the enzyme against urea and guanidine denaturants, supporting the previous knowledge that a similar pore size is necessary to stabilize the enzyme by restricting the conformational change of the biomolecule.

As mentioned earlier, functionalization of mesoporous silica support is widely employed to improve the adsorption and catalysis of immobilized peroxidases. Hudson et al. synthesized and applied six mesoporous materials functionalized with amine groups as supports for CPO (36). The material with pore entrances large enough (4–10 nm) to allow the enzyme entry was found to be the best support. When CPO was immobilized onto this material, it could be reused 20 times with retention of activity.

For the covalent immobilization of CPO, a tailored strategy was designed by Aburto et al. (31). The idea behind this strategy was to orient the substrate access channel to the outside of the material in order to observe catalysis. For this purpose, a SBA-16 (90 Å pore size) was modified with an organosilane derivative (4-(aminopropyltriethoxysilane)-4-oxo-butanoic acid) bearing a free carboxyl group. The resulting material was reacted, via 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide chemistry, with the amino groups of the only three surface lysines of the enzyme (Lys 112, Lys 145, Lys 211). Such lysines are exposed to the environment and located on the opposite side of the substrate access to the heme group (see Fig. 16.1). The covalent binding of CPO to SBA-16 through superficial lysines allowed an important improvement on halogenation activity as well as the biocatalyst stability against urea when compared to the physical adsorption. A similar strategy but using SBA-16 instead of SBA-15 was used for the same enzyme. The enzyme preparation showed enhanced enzymatic activity, thermal stability, and reusability when it was immobilized in SBA-15 of 143 Å pore size (107 Å after functionalization). The preparation showed 50% residual activity at 50°C; meanwhile the free enzyme was completely inactivated; regarding reusability, the immobilized enzyme kept 70% activity after five reaction cycles (33).

**TABLE 16.3 Emission Spectra of Various QDs**

| ZnS       | ZnSe      | CdS       | CdSe       | CdTe      | InP       | PbS       |
|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|
| UV–420 nm | UV–450 nm | UV–510 nm | 490–670 nm | 520 nm–IR | 650 nm–IR | 680 nm–IR |

One more strategy for peroxidase immobilization is encapsulation into the pores of a suitable mesoporous support. However, the encapsulation requires a modification of the mesoporous material after the protein is adsorbed and may have an adverse effect on the stability and catalytic activity of enzymes due to the physicochemical conditions applied in the chemical modification of the material. To overcome this limitation, Jung et al. applied a novel strategy where the authors crosslinked CPO once it was adsorbed into the pores of a MCF material; this resulted in an increment of the molecular size of the enzyme within the pore to a value larger than the pore size of the material, avoiding its desorption (37). This biocatalyst was more resistant to leaching and four times catalytically more active than the conventional catalyst prepared by physisorption.

#### 16.4 IMMOBILIZATION OF PEROXIDASES ON NANOPARTICLES

Nanotechnology has been applied in various domains of biotechnology: diagnostics, microarrays, biological analysis, biochips, biominiaturization, drug delivery systems, and so forth. These new systems need appropriate tools as regards to transport, extraction, and detection, and it has been found that colloidal particles, especially those having one dimension below 500 nm, are very suitable and efficient due to their unique and versatile properties. A number of processes allow to carefully control the shape, particle size, size distribution, structure, and surface properties according to the application needed (5). For example, colloidal semiconductor nanoparticles, known as QDs, are single crystals a few nanometers in diameter whose size and shape can be precisely controlled by the duration, temperature, and ligand molecules used in their synthesis (38–40). QDs are based on inorganic atoms stabilized by an organic ligand layer. In this case, the inorganic part is formed by atoms from group II (alkyl metals, metal oxides, or organic salts) and group VI (Se, S, and Te) (41).

QDs have found applications in different areas (e.g., medicine, biology, electronics and, most recently, in analytical and catalytic chemistry). The reason for their wide use in different fields relates to their particular photophysical properties that make them interesting compared to classic organic dyes, like broad absorption spectra, very narrow emission spectra, long fluorescence lifetime, and high photostability. These properties depend strongly on the particle

size as a consequence of their quantum confinement, coming from changes in density of their electronic states (42).

In these fluorophores, absorption of a photon results in the creation of an electron–hole pair (i.e., exciton). When the crystals are a few nanometers in size (smaller than the Bohr exciton radius) energy levels are quantized, with values directly related to the QD size. The radiative recombination of an exciton leads to the emission of a photon in a narrow energy band. However, surface defects in the crystal structure can temporarily trap the electron or hole, preventing radiative recombination and reducing the quantum yield (photons emitted/photons absorbed). To deal with this problem and to protect surface atoms from oxidation and other chemical reactions, shells of a few monolayers of a material with a larger band gap (such as ZnS) can be grown on top of the nanocrystal cores, yielding core/shell QDs (e.g., CdSe/ZnS core/shell QDs) (43). This process also enhances photostability by several orders of magnitude (44). Table 16.3 shows that QDs of different chemical composition and diameters have emission spectra that cover all regions of optical spectrum from UV to IR.

The synthesis of these semiconductor nanocrystals is based on a high-temperature reaction between organometallic precursors (or cadmium and organic salts) and coordinating media (usually trioctylphosphine oxide). The general synthetic procedure involves the fast injection of precursors at high temperature (300–350°C) followed by slow growth of nanocrystals at relatively low temperature (250–300°C) in an inert atmosphere (43). QDs have also been synthesized by reverse micelles, in an AOT (dioctyl sodium sulfosuccinate)/heptane microemulsion (45). In order to solubilize QDs in aqueous solution, the hydrophobic surface ligands must be replaced by amphiphilic multifunctional molecules, such as mercapto acids (39), cysteine (44), cysteamine (46), oligomeric phosphines (47), dendrons (48), peptides (49), and so forth. These nanoparticles can also be encapsulated by a layer of polymers or in silica shells (7), phospholipids micelles (50), polymer beads (51–53), or amphiphilic polysaccharides (54).

One application for this QDs is Förster (or fluorescence) resonance energy transfer (FRET), which is a process where energy is transferred nonradiatively (via long-range dipole–dipole coupling) from a fluorophore, in an electronic excited state serving as a donor, to another chromophore or acceptor (55). The use of this physical process is an effective method to investigate the distance between donor and acceptor in the nanometer scale (56). QDs have also been used for chemiluminescent resonance energy transfer (CRET). Compared

## 342 ENHANCED FUNCTIONALITY OF PEROXIDASES

with FRET, CRET occurs by the oxidation of a luminescent substrate and does not need an exciting light source. In 2008, Wang et al. reported the resonance energy transfer between chemiluminescence donor (luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system) and different CdSe/ZnS QD acceptors (56). This included oil-soluble QDs, water-soluble QDs, and QD-HRP conjugates. They found that the quantum yield (photons emitted/photons absorbed) of the different QDs is the crucial factor to the CRET efficiency. Since this method does not use an exciting light source, it has the advantage of reducing the fluorescence bleaching and lessening the autofluorescence of the system.

As mentioned before, semiconductor QDs absorb photons when the excitation energy exceeds the band gap. During this process, electrons are promoted from the valence band to the conduction band, thus resulting in the formation of electron-hole pairs (excitons). These pairs can recombine to emit a photon or else undergo electron transfer with the surrounding environment. A consequence of the latter is that several QDs are capable of generating radicals upon irradiation in aqueous media (11). This photochemical reaction makes QDs interesting candidates for the generation of light-switchable photocatalysts, when they are combined with enzymes capable of conducting chemical transformations by employment of the free radical species (57).

Using this concept, Niemeyer's group have used CdS nanoparticles capped with a layer of mercaptoacetic acid (MAA) as direct electron donors for the production of photochemical ROS (i.e., superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) and hydroxyl radicals (OH<sup>-</sup>) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), thus activating different heme-containing peroxidases like cytochrome P450 enzyme CYP152A1 to conduct  $\alpha$ - and  $\beta$ -hydroxylation of myristic acid (12, 45) or with HRP or cytochrome c peroxidase (CcP) to oxidize several typical peroxidase substrates, such as Amplex Red (*N*-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine), guaiacol, or diammonium 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) (13).

As with the immobilization of peroxidases in mesoporous materials, in the use of QDs one has to consider catalytic and noncatalytic factors for the right development of the QD-enzyme photocatalyst. Some of these factors are, for example, the right stoichiometric ratio between QDs and enzymes, type of enzyme binding, production of ROS, stability against UV irradiation, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and temperature, etc. In general, enzyme molecules have been adsorbed onto the surface of the QDs via electrostatic interactions, where the amine groups of the enzymes interact with the carboxyl groups from the capping ligands in the surface of the QDs (58). In some cases, as for the enzyme CYP152A1 (45), this interaction was enhanced and directed by the presence of a hexahistidine tail that interacted with the negatively charged MAA ligands present in the nanoparticles. On the other side, it has also been observed that physical interaction between the enzyme and the QD is not essential for the coupled reactivity (12, 45). Nevertheless, it is important to consider more

sophisticated routes of enzyme covalent bioconjugation with the nanoparticles since they will increase the enzyme adsorption and stability. In addition, this will provide a better system regarding reusability. However, one concern in this matter is that functionalization of QDs could reduce or inhibit the production of ROS.

To investigate this subject, Rajendran et al. studied the effect of different ligands covering CdS nanoparticles. In this work, they synthesized this CdS-QD with two types of capping molecules, namely, cysteamine and 2-mercaptoethanesulfonic acid (CM), tiopronin (TPN) and compared their results with the ones obtained with MAA (57). The formation of hydroxyl radicals upon irradiation of the CdS-QDs was monitored by a hydroxyl-radical-specific fluorometric assay. In this assay nonfluorescent disodium terephthalate reacts with hydroxyl radicals to form 2-hydroxyterephthalate, which forms a highly fluorescent anion in the presence of sodium hydroxide (11). Electron paramagnetic resonance spectroscopy was also used for this characterization. In summary, they observed that ROS were formed with all three capping ligands but in different quantities that correlated with the fluorescence emission observed for each QD system. In addition, it was also observed that different ROS species were produced for each QD. CdS-MAA produced hydroxyl and superoxide radicals while CdS-CM only generated hydroxyl radicals. For CdS-TPN, hydroxyl and carbonyl radicals were observed, where the latter was probably formed by a rapid chemical reaction of initially produced superoxide radicals with the TPN ligand. Either way, all three types of CdS-QDs were able to initiate peroxidase activity of HRP, thus suggesting that sufficient amounts of ROS are generated during the photoirradiation of the QDs (57). It is noteworthy that the ligands do have an effect on the quantum yield of QDs (18.5, 14.6, and 1.6% for CdS-MAA, CdS-TPN, and CdS-CM, respectively), so the decision to choose a ligand depends entirely on whether the QDs are being used for biocatalysis or bioimaging systems.

This same group investigated the effect of protein-QD conjugation by using CdS-MAA QDs conjugated to various proteins like enhanced yellow fluorescent protein, lysozyme, tobacco etch virus (TEV) protease, and CYP152A1 (59). They found that coating the nanoparticles with proteins effectively suppresses the production of short-living ROS and increases the formation of hydrogen peroxide, a longer-living radical species. The authors proposed a mechanism for this phenomenon that involves a pathway of amino acid oxidation by hydroxyl radicals in the presence of oxygen, which eventually produces hydrogen peroxide. Interestingly, this result was capitalized and it was shown that CdS-TEV nanohybrids increased hydroxylation of myristic acid (by CYP152A1 not conjugated to QDs) as much as twofold compared with CdS nanoparticles alone (59).

As mentioned before, an important photocatalyst factor to consider is the stability of the enzymes against UV

**TABLE 16.4** Characteristics of Some Nanoparticles Used for Enzyme Adsorption and Catalysis

| QD(s)                          | Substrate(s)  | Enzyme(s)   | Technique                                 | Relevant Information  | Authors, year                          |
|--------------------------------|---------------|---|---|---|--|
| CdS-MAA                        | Myristic acid | P450 cytochrome CYP152A1                          | QD-FRET, peroxidase activity              | CYP152A1 turnover decreased sixfold in nanohybrids, but produces similar amounts of hydroxylation products                            | Ipe et al., 2006                       |
| CdSe/ZnS core-shell            | Glucose, ABTS | GOx and HRP                                       | QD-FRET, peroxidase activity              | Large range of glucose detection (0–5 g/L), minor effects of T, pH, ions  | Duong et al., 2007                     |
| CdSe/Zns                       | —             | HRP   | QD-CRET                                   | CRET reduces fluorescence bleaching and autofluorescence  | Wang et al., 2008                      |
| CdSe-mesoporous silica         | —             | HRP   | Electrode response                        | Immobilized in mesoporous silica (MS0029)   | Yang et al., 2011                      |
| CdSe-ZnS<br>CdS-MAA            | Amplex Red    | HRP, cytochrome c peroxidase, myoglobin, CYP152A1 | Electrode response<br>Peroxidase activity | Vapor deposition of QDs<br>UV activation generally applicable to heme-containing peroxidases, possibly other oxygen-consuming enzymes | Wang et al., 2009<br>Fruk et al., 2007 |
| CdS-MAA                        | Myristic acid | P450 cytochrome CYP152A1                          | Peroxidase activity                       | QDs can be preirradiated for light-sensitive substrates   | Gandubert et al., 2008                 |
| CdS-MAA,<br>CdS-CM,<br>CdS-TPN | Amplex Red    | HRP   | Peroxidase activity                       | Although each QD produces a different ROS, all of them were able to activate HRP  | Rajendran, et al., 2009                |
| CdS-MAA-TEV                    | Myristic acid | CYP152A1  | Peroxidase activity                       | QD conjugation with TEV enhances H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> production and activation of HRP                                       | Rajendran, et al., 2010                |

irradiation and the ROS generated. In this regard, Fruk et al. found that CdS nanoparticles could be preradiated with UV light as a way to prevent damage to the enzymes by direct exposure (13). This effect was also studied using QD-CYP152A1 nanohybrids (45). Here, it was found that preirradiation of the nanohybrids improved the substrate conversion as compared to nonpreirradiated samples. However, it was also observed that after a certain time of preirradiation there is a decrease in the conversion that suggests that larger amounts of radicals are produced, which most probably inhibit or denature the CYP152A1 enzyme. Therefore, it is important to optimize the composition of the nanohybrids such that irradiation periods can be kept as short as possible without reducing the amounts of radicals necessary to obtain a desired substrate conversion. However, another way to circumvent this problem was also found by these authors by simply turning on and off the UV light source.

In this case, by considering the right stoichiometric ratio of QD : CYP152A1 to produce enough radicals in the light phase it was possible to have a continuous catalytic activity. Table 16.4 summarizes and compares the most relevant characteristics of all the works mentioned in this section (45).

### 16.5 APPLICATIONS OF IMMOBILIZED PEROXIDASES ON MESOPOROUS MATERIALS AND NANOPARTICLES

Based on the foregoing, it has been proven that the immobilization of peroxidases in mesoporous silica materials and QDs can help to produce oxidative biocatalysts catalytically more active and stable, while maintaining its characteristics of chemo-, regio-, or enantioselectivity. Below are some examples illustrating the potential applications of these immobilized enzymes.

### 16.5.1 Peroxidases' Industrial Biocatalysis

Oxidative enzymes like peroxidases and oxidases have been introduced, more recently than other enzymes, in the textile industry (60). Even if their application is still in soluble form, there is a huge potential to use immobilized enzymes to enhance performance and reduce processing costs during washing and finishing cloths, and reduce or eliminate the use of water as well as harsh and polluting chemical oxidizing agents. Such an application deals with the oxidation of natural or synthetic dyes before they bleed off cloths that cause coloration of white ones or to enhance color finishing by removing unbound dyes, which is known as dye transfer inhibition (DTI) technology when using a recombinant peroxidase from *Coprinus cinereus* (61). Here, the electron acceptor is either hydrogen peroxide or the oxidant of bleach-containing laundry detergents, commonly generated from perborate by its activator tetra-acetyl-ethylene-diamine. The use of a mediator, an additional oxidizable substance such as hydroxybenzo-triazole (HBT) or phenothiazine-10 propionic acid (PPT), improves the bleaching performance of the enzyme. The net reaction that occurs is



Another innovative application of peroxidases is in the paper and pulp industry as bleaching agents (62). The removal of lignin from chemical pulps is called bleaching, and is done in order to eliminate color and improve paper properties. Nowadays, many paper manufactures use large amounts of chlorine and derivatives that produce toxic, mutagenic, recalcitrant, and bioaccumulating chlorinated compounds. There are several alternatives to traditional chlorine technology like oxygen delignification, extended cooking, replacement of chlorine by hydrogen peroxide and/or ozone, and the use of enzymes as hemicellulases and ligninolytic (peroxidases and oxidases) enzymes. The first enzymes act indirectly by breaking chemical bonds between lignin and hemicelluloses, facilitating the release of lignin. The second enzymes act directly on lignin and may be more efficient. Even if peroxidases and laccases play an important role in degrading the lignin *in vivo*, the first assays *in vitro* resulted in further polymerization of lignin, which is not desirable. In the middle nineties, Lignozyme GmbH developed a technology employing a laccase, a mediator (HBT), and oxygen that permitted the diminution of lignin content ( $\kappa$  number) in bleached pulps (63). Another interesting approach is the removal of ink from waste paper by peroxidases. Even if just the use of a laccase has been reported (64), such technology may allow superior paper properties, higher brightness, lower residual ink, and use of chemical agents. Here, the development of a deinking peroxidase-based biocatalyst immobilized in the surface of a nanomaterial may result in higher efficiencies and low processing costs. Kraft lignin is a

polymer byproduct of the Kraft pulping process. The conversion of wood chips to pulp for manufacturing paper generates huge quantities of lignins as byproducts. One manner to valorize such coproducts has been proposed by Suparno et al. (65). Hence, the oxidation of Kraft lignin is undertaken by hemin, a peroxidase biomimetic system, and hydrogen peroxide to vanillic acid, 2-methoxyphenol, etc. Then, a laccase is used for subsequent dyeing and leather tanning.

Nowadays, most of the world's leather is tanned with basic chromium (III) sulfate due to the ease of processing, the wide applicability, and the excellent properties of the leather. However, environmental pollution on the mineral tannage obliges to develop nonmineral tanning processes for leather manufacturing. Here, the use of hemin, a peroxidase mimic, and laccase may be enhanced through its immobilization on meso- and/or nanoporous surfaces.

Another important field for application of peroxidases is the petroleum industry, and extensive works are found in the literature (31, 33, 66–69). Crude oil is rarely used in its raw form but must instead be processed into various products as liquefied petroleum gas (LPG), gasoline, diesel, solvents, kerosene, middle distillates, residual fuel oil, and asphalt. The refining process involves the use of various thermal and catalytic processes to convert molecules in the heavier fractions to smaller molecules in fractions distilling at lower temperatures (70). Recalcitrant compounds containing sulfur, nitrogen, and metals are mainly associated with the heaviest fraction in petroleum. The demand for low-sulfur fossil fuels has been intensified by the stricter regulatory standards for reduced levels of sulfur oxides in atmospheric emissions. It can be estimated that in next decades, 30% of oil should be desulfurized. Such necessities will increase the cost of conventional process of hydrodesulfurization (HDS). Hence, there is a need to reduce the severity of refining operations to decrease the costs and make the refining through the development of milder physical and chemical processes. An interesting alternative is biorefining, which consists of the use of living organism or part of them like enzymes in order to upgrade petroleum, that is, the application of bioprocesses to the fractionation and enhancing of petroleum, which might contribute to mitigate the associated pollution and upgrading of heavy crude (69).

The biodesulfurization (BDS) of fuels, that is, the elimination of sulfur through biological means with isolated enzymes as peroxidases, have been investigated because of its greater technological utility (33, 71). An enzymatic desulfurization approach would have at least three advantages compared to the utilization of complete microbial cells, that is, activity at low or null water content, thermomechanical stability, and minimized mass-transfer issues. A more advantageous BDS process will consist of immobilized peroxidases where the biocatalyst recycling may allow an enhanced productivity. Recently, the oxidation of dibenzothiophene (DBT), a recalcitrant sulfur compound found in diesel, in a continuous

reactor using an immobilized CPO on mesoporous material (SBA-15) reduced more than 50% of DBT from an organic model solution (72).

Like sulfur, nitrogen is typically found in petroleum as nonbasic and basic-related compounds, which contributes to acid and atmospheric contamination and also interferes with the refining processes, leading to equipment corrosion and catalyst poisoning (69). Quinoline and carbazole are the most widely studied fuel nitrogen-containing compounds as regard to biodegradation of polluted soils, but little has been done as regard to biorefining of fuels using enzymes. The use of laccase from *Corioloropsis gallica* totally accomplished carbazole removal in a reaction medium containing 15% acetonitrile. No oxidation product was identified, suggesting that the product of carbazole oxidation becomes sufficiently condensed and polymerizes (73). In this regard, we obtained the kinetics of carbazole oxidation by CPO and suggest through docking modeling that the enzyme may recognize not only monomeric molecules of carbazole but also  $\pi$ - $\pi$  dimers (67). More recently, the oxidation of indole with CPO and glucose oxidase (GOx) immobilized on mesoporous molecular sieves was reported (37, 74). They found that the operational stability, the space-time yield and turnover frequencies of the immobilized enzymes increase in the order physical adsorption < covalent binding < crosslinking. While the sulfur-specific removal has been reasonably investigated, there is little information concerning the removal of N-heterocycle compounds found in petroleum and related streams without affecting their calorific value.

Crude oil also contains metals in the form of salts and metalloporphyrins in the asphaltene fraction, which is the solid material that precipitates when oil is treated with alkane solvents (*n*-pentane or *n*-heptane). Heavy metals (mostly nickel and vanadium) are furthermore corrosive, poison cracking catalysts during refining, and are released as highly toxic oxides during fuels' combustion to the environment, while asphaltenes are responsible for sludge formation resulting in flow reduction by plugging downstream equipment and production of less valuable coke in current upgrading of petroleum. Moreover, the utilization of distillation residue, constituted mainly by asphaltenes and entrapped metals, is of high interest because petroleum refiners will deal in the near future with much heavier crude from different sources, for example, tar sands, oil shales and off-shore reservoirs (69). The same approach could be applied to metal removal from asphaltenic structures in petroleum using enzymes as oxidative catalysts. Indeed, CPO demetalized asphaltenes by chlorination and successive opening of porphyrinic rings attaining a removal ratio of Ni and V of 93% and 53%, respectively (75). Another approach involving cytochrome *c* reductases from *Bacillus megaterium* and *Catharanthus roseuse* has the advantage to liberate metals like nickel and vanadium by oxidation of porphyrinic rings instead of chlorination, avoiding the formation of halogenated

products that are undesirable due to environmental concerns (76, 77).

Concerning other industrial applications, a patent has been filed in relation to *in situ* crosslinking of proteins, including collagen, using HRP to form biocompatible semisolid gels. This material can be used as wound sealant, delivery vehicle, or as binding agent in food product applications (78). Odorant compounds such as phenols, indoles, volatile fatty acids, ammonia, hydrogen sulfide, and mercaptans are either initially present in manure or result from anaerobic transformation of animal waste (79). Recently, HRP has been proven as an effective alternative for deodorization of manures, that is, minced horseradish with calcium peroxide reduced the concentration of phenol by 70% and for volatile fatty acids by 45%. The horseradish batch could be used five times as an enzymatic source in the deodorization of swine slurry (80).

#### 16.5.2 Peroxidase-Based Biosensors and Conductive Polymers

Electrochemical biosensors offer a great potential for peroxidase application. A number of materials have been used as electrode-modified matrices for the immobilization of HRP (81), for example, polymers (82), sol-gel (83), and inorganic (84). Among these supports, inorganic materials are more attractive because of their regular structure and good mechanical, chemical, and thermal stabilities. At present, various titania (TiO<sub>2</sub>) materials, such as nanoparticles (85), nanosheets (86), nanotubes (87), nanostructure films (88), graphene oxide (89), and ordered 3D macroporous TiO<sub>2</sub> inverse opals deposited on an optically transparent electrode (OTE) (81), have been used to immobilize HRP since they are biocompatible, stable, and environmentally safe.

Hence, peroxidase-based electrodes have had widespread use in analytical systems for determination of hydrogen peroxide and organic hydroperoxides and when peroxidases are coimmobilized with a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing enzyme for the determination of many clinical, food, environmental, and other analytes of interest (79). The determination of glucose contained on several different media have provoked the development of the most studied biosensor, based basically on the use of two enzymes, GOx and HRP. The first enzyme produces gluconic acid and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from glucose while HRP uses the peroxide in conjunction with a chromogenic compound (e.g., ABTS) to develop a spectrophotometrically measurable color. Several biosensor matrices have been reported for glucose determination and other target analytes, that is, sol-gel (90), a polymer thick film with conductive inks integrated on a screen-printed biosensor (91), mesoporous molecular sieve SBA-15 (74, 92), sugar-modified silica monoliths for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensing (93), mesoporous silica fibers for dye oxidation (94), and nanoporous copper for *o*-phenylenediamine detection (95).

## 346 ENHANCED FUNCTIONALITY OF PEROXIDASES

Also, a simple and economical biostrip technology for estimation of lactose was developed by immobilizing  $\beta$ -galactosidase, galactose oxidase, and HRP onto a polymeric support, and the  $\beta$ -galactosidase is the key enzyme to detect lactose. The biostrip dipped in milk or a milk product will develop a color from an added chromogen and serves to estimate lactose in the concentration range <20–100 g/L (96). Also, diagnostic test kits have been developed for the assay of uric acid (97), cholesterol (98), 8-hydroxydeoxyguanosine, and its analogs in urine to identify bladder and prostate cancer risks (99); for the detection of the cystic fibrosis delta F508 mutation in blood (100), mycotoxins (101), etc.; as well as for the determination of environmental concerning compounds. Indeed, nitric oxide (NO) was detected by a FRET-based NO biosensor using a fluorescent-labeled CcP immobilized on a silica matrix (102).

The production of conducting polymers has remarkable interest because of their wide range of applications, including anticorrosive protection, optical display, light-emitting diodes etc. Polyaniline (PANI) is one of the most extensively investigated conducting polymers because of its high environmental stability and promising electronic properties (79). Currently, PANI is synthesized by oxidizing monomer aniline under strongly acidic conditions and low temperature using ammonium persulfate as the initiator of radical polymerization (103). A different approach to control the structure during the synthesis of a polymer is by using a porous inorganic material as template. Mesoporous materials may provide a convenient environment within their pores where the polymerization reaction is carried out under different conditions to that of the reaction media. These materials may act as a template by promoting certain coupling reactions of the radicals. For these reasons, confined monomers usually polymerize in a more ordered and efficient way, and undesirable reactions like multisubstitution in the rings yielding branched chains are reduced, which enhances the optical and electric properties of PANI (104). Although a wide range of peroxidases have been used to synthesize PANI, commercially available HRP and soybean peroxidase (105) have been the most studied.

Regarding nanoparticles, mercaptopropionic acid (MPA)-coated CdSe/ZnS core shell QDs (MPA-QDs) have been conjugated with GOx and HRP enzymes by Duong and Rhee (58). In this case, the enzyme-conjugated QD complex was used as QD-FRET-based probes to sense glucose. The QDs were used as an electron donor, whereas GOx and HRP were used as acceptors for the redox reactions involved in oxidizing glucose to gluconic acid. In this case, the system presented a very high sensitivity in the concentration range of 0–5.0 g/L when a 10/10/10 ratio of MPA-QDs, GOx, and HRP was used, which became smaller when decreasing the amount of HRP. Although the system had a low response time, probably due to the low diffusion of the molecules, the system demonstrates the potential

use of these QDs for QD-FRET detection of glucose in solution.

Nanoparticles can also be used as electrode-sensitivity enhancers. Yang et al. synthesized mesoporous silica spheres, immobilized them on the surface of an optically transparent electrode, and performed amperometric measurements in the presence and absence of  $H_2O_2$  and UV light (106). In this case, the subsequent addition of CdSe nanocrystals within the mesoporous material increased the amperometric response because the QDs are capable of injecting excited electrons to the system, thus reducing the  $H_2O_2$ . Additionally, when HRP was deposited on the surface of the composite material it improved the sensitivity and efficiency of the system toward the sensing of  $H_2O_2$ . Similarly, Wang et al. also used QDs to coat glassy carbon electrodes, using a vapor deposition method or direct dropwise (107). The results showed that CdSe/ZnS QDs could be successfully used to immobilize HRP on the surface of the electrode, thus protecting the enzyme from denaturation and facilitating direct electron transfer onto the electrode surface. The best composite (better amperometric response) was the one obtained by vapor deposition. This may be due to the slowness of the process, which allows for HRP to adjust to an appropriate orientation for direct electron transfer.

### 16.5.3 Removal of Pollutants with Peroxidases

There is a growing recognition that enzymes can be used in many remediation processes to target-specific pollutants for treatment, especially of water streams but also soils. The potential advantages of the enzymatic treatment as compared with conventional treatments include high activity to recalcitrant materials, operation at high and low contaminant concentrations over a wide pH, temperature and salinity range, elimination of biomass acclimatization, and an easier control process (108).

Peroxidases can catalyze the oxidation of phenols, biphenols, anilines, benzidines, and related heteroaromatic compounds which are broadly used textile dyes. About 10–15% of the synthetic dyes produced are discharged into industrial effluents, causing environmental problems. Some dyes are recalcitrant and toxic substances; they are resistant to biological degradation, not being easily degraded in waste water treatment plants (79). Such compounds are found in the waste waters of a wide variety of industries, including coal conversion, petroleum refining, resins and plastics, wood preservation, metal coating, dyes and other chemicals, textiles, mining and dressing, and pulp and paper. In addition, HRP has the ability to coprecipitate certain recalcitrant contaminants, including nonsubstrates of HRP, along with the more easily removable compounds, by inducing the formation of mixed polymers (79), that is, it was demonstrated that polychlorinated biphenyls could be removed from solution through coprecipitation with phenols (109).

HRP is suitable for waste water treatment because it retains its activity over a broad pH and temperature range but most of the work has been done in homogenous media (110–112). The improvement in the use of the enzyme should focus on the reduction in treatment cost and enhancing productivity that may be accomplished through enzyme immobilization (89, 113–118). Most of the research on detoxification of waste waters contaminated with phenols, cresols, and chlorinated phenols have used HRP. Recently, however, peroxidase from other sources such as soybean (119–121) and turnip (122) have been suggested as alternatives to horseradish.

In this area, most of the research is oriented toward the enzymatic immobilization through entrapment or physical adsorption in diverse matrix, but mass transfer concerns with low productivities may be approached with immobilization via covalent grafting on the surface of meso- and/or nanoporous materials. Since enzyme molecules are randomly adsorbed on the surface of materials through physical adsorption, it is not surprising that they could present active site blockage or a change in its enzymatic conformation to inactive forms that reduce residual activity. In fact, such phenomena have already been described for immobilized HRP (32) and CPO (33) on different mesoporous materials. Here, we must consider tailor-made grafting of enzyme molecules to the material's surface to minimize blocking of the active site that may cause activity loss and increment of the  $K_m$  value. Hence, the peroxidase treatment process may be considered still in the experimental stage.

## 16.6 CONCLUSION

The immobilization of peroxidases in mesoporous materials and nanoparticles has allowed the development of biocatalysts with very attractive characteristics from the applicable point of view. Without a doubt, the improvement of the stabilities, the possibility of recycling, and the facility of synthesis of these materials gives them a fundamental place as supports to anchor enzymes. The generation of robust biocatalysts for application in industries like the petroleum, textile, and water treatment stimulates the investigation in this area, which is promising in the scope of biocatalysis.

## ACKNOWLEDGMENT

The authors gratefully acknowledge the financial support from the Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICYTDF-FFUTPICTGDF-2008), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa (UAM-C), Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), and Instituto Mexicano del Petróleo (IMP).

## REFERENCES

1. Polizzi KM, Bommarius AS, Broering JM, Chaparro-Riggers JF. Stability of biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol* 2007;11:220–225.
2. Cao L. Immobilised enzymes: science or art? *Curr Opin Chem Biol* 2005;9:217–226.
3. Hartmann M. Ordered mesoporous materials for bioadsorption and biocatalysis. *Chem Mater* 2005;17(18):4577–4593.
4. Hartmann M, Jung D. Biocatalysis with enzymes immobilized on mesoporous hosts: the status quo and future trends. *J Mater Chem* 2010;20:844–857.
5. Pichot C. Reactive nanocolloids for nanotechnologies and microsystems. In: Elaissari A, editor. *Colloidal Nanoparticles in Biotechnology*. John Wiley & Sons; 2008. ISBN 978-0-470-23052-7.
6. Lin CA, Liedl T, Sperling RA, Fernandez-Arguelles MT, Costa-Fernandez JM, Pereiro R, Sanz-Medel A, Chang WH, Parak WJ. Bioanalytics and biolabeling with semiconductor nanoparticles (quantum dots). *J Mater Chem* 2007;17:1343–1346.
7. Bruchez MJr, Moronne M, Gin P, Weiss S, Alivisatos AP. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* 1998;281:2013–2016.
8. Smith AM, Gao X, Nie S. Quantum-dot nanocrystals for in vivo molecular and cellular imaging. *Photochem Photobiol* 2004;80:377–385.
9. Medintz IL, Uyeda HT, Goldmann ER, Mattoussi H. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nat Mater* 2005;4:435–446.
10. Marinkovic S., Hoffmann N. Efficient radical addition of tertiary amines to electron-deficient alkenes using semiconductors as photochemical sensitizers. *Chem Commun* 2001;17:1576–1578.
11. Ipe BI, Lehning M, Niemeyer CM. On the generation of free radical species from quantum dots. *Small* 2005;1:706–709.
12. Ipe BI, Niemeyer CM. Nanohybrids composed of quantum dots and cytochrome P450 as photocatalysts. *Angew Chem Int Ed* 2006;45:504–507.
13. Fruk L, Rajendran V, Spengler M, Niemeyer CM. Light-induced triggering of peroxidase activity using quantum dots. *Chembiochem* 2007;8:2195–2198.
14. Boswell C. *The Technology Frontier in Alkane Activation*. New York: Chemical Market Reporter; 1999.
15. Adam W, Lazarus M, Saha-Möller CR, Weichold O, Hoch U, Häring D, Schreier P. Biotransformations with peroxidases. *Adv Biochem Eng Biot* 1999;63:73–108.
16. Dembitsky VM. Oxidation, epoxidation and sulfoxidation reactions catalysed by haloperoxidases. *Tetrahedron* 2003;59(26):4701–4720.
17. Hofrichter M, Ullrich R, Pecyna MJ, Liers C, Lundell T. New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;87:871–897.
18. Ortiz de Montellano PR. Catalytic mechanisms of heme peroxidases. In: Torres E, Ayala M, editors. *Biocatalysis Based*

Au: Please provide location of the publisher in Reference 5.

## 348 ENHANCED FUNCTIONALITY OF PEROXIDASES

- on *Heme Peroxidases*. 1st ed. Germany: Springer-Verlag; 2010.
19. Casella L, Monzani E, Nicolis S. Potential applications of peroxidases in the fine chemical industries. In: Torres E, Ayala M, editors. *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases*. 1st ed. Germany: Springer-Verlag; 2010.
  20. Torres E, Bustos-Jaimes I, Le Borgne S. Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Appl Catal B* 2003;46:1–15.
  21. Husain Q, Husain M, Kulshrestha Y. Remediation and treatment of organopollutants mediated by peroxidases: a review. *Crit Rev Biotechnol* 2009;29(2):94–119.
  22. Alvarado B, Torres E. Recent patents in the use of peroxidases. *Recent Pat Biotechnol* 2009;88–102.
  23. Torres E, Ayala M (Eds). *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases*. 1st ed. Germany: Springer-Verlag; 2010.
  24. Longoria A, Tinoco R, Torres E. Enzyme technology of peroxidases: immobilization, chemical and genetic modification. In: Torres E, Ayala M, editors. *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases*. 1st ed. Germany: Springer-Verlag; 2010.
  25. Cao L, van Langen L, Sheldon RA. Immobilised enzymes carrier-bound or carrier-free? *Curr Opin Biotechnol* 2003;14:387–394.
  26. Burness LT. *Mesoporous Materials. Properties, Preparation and Applications*. 1st ed. New York: Nova Science Publisher; 2009. ISBN 978-1-60741-051-5.
  27. Yiu HHP, Wright PA. Enzymes supported on ordered mesoporous solids: a special case of an inorganic-organic hybrid. *J Mater Chem* 2005;15:3690–3700.
  28. Hudson S, Cooney J, Magner E. Proteins in mesoporous silicates. *Angew Chem Int Ed Engl* 2008;8582–8594.
  29. Humphrey HPY, Wright PA. Enzymes supported on order mesoporous solids: a special case of inorganic-organic hybrid. *J Mater Chem* 2005;15:3690–3700.
  30. Diaz, JF, Balkus, KJ Enzyme immobilization in MCM-41 molecular sieve. *J Mol Catal B* 1996;2:115–126.
  31. Aburto J, Ayala M, Bustos-Jaimes I, Montiel C, Terrés E, Domínguez JM, Torres E. Stability and catalytic properties of chloroperoxidase immobilized on mesoporous materials. *Micro Mesoporous Mat* 2005;83:193–200.
  32. Takahashi H, Li B, Sasaki T, Miyasaki C, Kajino T, Inagaki S. Catalytic activity in organic solvents and stability of immobilized enzymes on the pore size and the surface characteristics of mesoporous silica. *Chem Mater* 2000;12:3301–3305.
  33. Montiel C, Terrés E, Domínguez JM, Aburto J. The immobilization of chloroperoxidase on silica-based materials for 4,6-dimethyl dibenzothiophene oxidation. *J Mol Catal B Enzym* 2007;48:90–98.
  34. Terrés E, Montiel M, Le Borgne S, Torres E. Immobilization of chloroperoxidase on mesoporous materials for the oxidation of 4,6-dimethylbenzothiophene, a recalcitrant organic sulfur compound present in petroleum fractions. *Biotechnol Lett* 2008;30:173–179.
  35. Han YJ, Watson JT, Stucky GD, Butler A. Catalytic activity of mesoporous silicate-immobilized chloroperoxidase. *J Mol Catal B Enzym* 2002;17:1–8.
  36. Hudson S, Cooney J, Hodnett BK, Magner E. Chloroperoxidase on periodic mesoporous organosilanes: immobilization and reuse. *Chem Mater* 2007;19:2049–2055.
  37. Jung D, Hartmann M. Oxidation of indole with CPO and GOx immobilized on mesoporous molecular sieves. *Catalysis Today* 2010;157:378–383.
  38. Hines MA, Guyot-Sionnest P. Synthesis and characterization of strongly luminescing ZnS-capped CdSe nanocrystals. *J Phys Chem* 1996;100:468–471.
  39. Sukhanova A, Venteo L, Devy J, Artemyev M, Oleinikov V, Pluot M, Nabiev I. Highly stable fluorescent nanocrystals as a novel class of labels for immunohistochemical analysis of paraffin-embedded tissue sections. *Lab Invest* 2002;82:1259–1262.
  40. Somers RC, Bawendi MG, Nocera DG. CdSe nanocrystal based chem/bio-sensors. *Chem Soc Rev* 2007;36(4):579–591.
  41. Galian RE, DeLaGuardia M. The use of quantum dots in organic chemistry. *Trends Anal Chem* 2009;28:279–291.
  42. Alivisatos AP. Perspectives on the physical chemistry of semiconductor nanocrystals. *J Phys Chem* 1996;100:13226–13239.
  43. Nabiev I, Sukhanova A, Artemyev M, Oleinikov V. Fluorescent colloidal particles as detection tools in Biotechnology systems. In: Elaissari A, editor. *Colloidal Nanoparticles in Biotechnology*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2008.
  44. Sukhanova A, Devy J, Venteo L, Kaplan H, Artemyev A, Oleinikov V, Klinov D, Pluot M, Cohen JHM, Nabiev I. Biocompatible fluorescent nanocrystals for immunolabeling of membrane proteins and cells. *Anal Biochem* 2004;324:60–67.
  45. Gandubert VJ, Torres E, Niemeyer CM. Investigation of cytochrome P450-modified cadmium sulfide quantum dots as photocatalysts. *J Mater Chem* 2008;18:3824–3830.
  46. Wargnier R, Baranov A, Maslov V, Stsiapura V, Sukhanova A, Pluot M, Nabiev I. Energy transfer in aqueous solutions of oppositely charged CdSe/ZnS core/shell quantum dots and in quantum dot-nanogold assemblies. *Nano Lett* 2004;4:451–457.
  47. Kim S, Bawendi MG. Oligomeric ligands for luminescent and stable nanocrystal quantum dots. *J Am Chem Soc* 2003;125:14652–14653.
  48. Guo W, Li JJ, Wang YA, Peng XJ. Conjugation chemistry and bioapplications of semiconductor box nanocrystals prepared via dendrimer bridging. *Chem Mater* 2003;15:3125–3133.
  49. Pinaud F, King D, Moore HP, Weiss S. Bioactivation and cell targeting of semiconductor CdSe/ZnS nanocrystals with phytochelatin-related peptides. *J Am Chem Soc* 2004;126:6115–6123.
  50. Dubertret B, Skourides P, Norris DJ, Noireaux V, Brivanlou AH, Libchaber A. In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science* 2002;298:1759–1762.
  51. Han M, Gao X, Su JZ, Nie S. Quantum dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules. *Nat Biotechnol* 2001;19:631–635.

## REFERENCES 349

52. Stsiapura V, Sukhanova A, Artemyev A, Pluot M, Cohen JHM, Nabiev I. Functionalized nanocrystal-tagged fluorescent polymer beads: synthesis, physicochemical characterization, and immunolabeling application. *Analyt Biochem* 2004;334:257–265.
53. Joumaa N, Lansalot M, Théretz A, Elaissari A, Sukhanova A, Artemyev M, Nabiev I, Cohen JHM. Synthesis of quantum dot-tagged submicrometer polystyrene particles by microemulsion polymerization. *Langmuir* 2006;22:1810–1816.
54. Osaki F, Kanamori T, Sando S, Sera T, Aoyama Y. A quantum dot conjugated sugar ball and its cellular uptake. On the size effects of endocytosis in the subviral region. *J Am Chem Soc* 2004;126:6520–6521.
55. Jares–Erijman EA, Jovin TM. FRET imaging. *Nat Biotechnol* 2003;21:1387–1395.
56. Wang HQ, Li YQ, Wang JH, Xu Q, Li XQ, Zhao YD. Influence of quantum dots' quantum yield to chemiluminescent resonance energy transfer. *Anal Chim Acta* 2008;610:68–73.
57. Rajendran V, Lehnig M, Niemeyer CM. Photocatalytic activity of colloidal CdS nanoparticles with different capping ligands. *J Mater Chem* 2009;19:6348–6353.
58. Duong HD, Rhee JI. Use of CdSe/ZnS core-shell quantum dots as energy transfer donors in sensing glucose. *Talanta* 2007;73:899–905.
59. Rajendran V, König A, Rabe KS, Niemeyer CM. Photocatalytic activity of protein-conjugated CdS nanoparticles. *Small* 2010;6:2035–2040.
60. Galante YA, Formantici C. Enzyme applications in detergency and in manufacturing industries. *Curr Org Chem* 2003;7(13):1399–1422.
61. Damhus T, Vogt U. US Patent No. 6,048,367. 2000.
62. Bajpai P. Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnol Prog* 1999;15(2):147–157.
63. Call HP. PCT Int. Appl. WO 94/29510. 1994.
64. Call HP. German Patent DE 4,008,894. 1991.
65. Suparno O, Covington AD, Evans CS. Kraft lignin degradation products for tanning and dyeing of leather. *J Chem Tech Biotech* 2005;80(1):44–49.
66. Ayala M, Verdin J, Vazquez-Duhalt R. The prospects for peroxidase-based biorefining of petroleum fuels. *Biocat Bio-transformation* 2007;25(2–4):114–129.
67. Correa-Basurto J, Aburto J, Trujillo-Ferrara J, Torres E. Ligand recognition process by chloroperoxidase using molecular interaction fields and quantum chemistry calculations. *Mol Simul* 2007;33:649–654.
68. Aburto J, Correa-Basurto J, Torres E. Atypical kinetics behavior of chloroperoxidase-mediated oxidative halogenation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Arch Biochem Biophys* 2008;480(1):33–40.
69. Montiel C, Quintero R, Aburto J. Petroleum biotechnology: technology trends for the future. *Afr J Biotechnol* 2009;8(12):2653–2666.
70. Speight J.G. *In the Chemistry and Technology of Petroleum*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker; 1998.
71. Torres E, Aburto J. Chloroperoxidase-catalyzed oxidation of 4,6-dimethyl dibenzothiophene as dimer complexes: evidence for kinetic cooperativity. *Arch Biochem Biophys* 2005;437(2):224–232.
72. Montiel C. Estudio de la oxidación biocatalítica de compuestos heteroatómicos por la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* en medio orgánico. PhD Thesis, Instituto Mexicano del Petróleo, México, 2008.
73. Bressler DC, Fedorak PM, Pickard MA. Oxidation of carbazole, p-ethylcarbazole, fluorene and dibenzothiophene by the laccase of *Corioliopsis gallica*. *Biotechnol Lett* 2000;22:1119–1125.
74. Jung D, Streb C, Hartmann M. Covalent anchoring of chloroperoxidase and glucose oxidase on the mesoporous molecular sieve SBA-15. *Int J Mol Sci* 2010;11:762–778.
75. Fedorak PM, Semple KM, Vazquez-Duhalt R, Westlake DWS. Chloroperoxidase-mediated modifications of petroporphyrins and asphaltenes. *Enzyme Microb Technol* 1993;15:429–437.
76. Xu GW, Mitchell KW, Monticello DJ. Fuel product produced by demetalizing a fossil fuel with an enzyme. *US Patent*, 1998;562:48–44.
77. Arellano-García H, Buenrostro-Gonzalez E, Vazquez-Duhalt R. Biocatalytic transformation of petroporphyrins by chemically modified cytochrome c. *Biotechnol Bioeng* 2004;85:790–798.
78. Miller DR, Tizard IR, Keeton JT, Prochaska JF. System for polymerizing collagen and collagen composites in situ for a tissue compatible wound sealant, delivery vehicle, binding agent and/or chemically modifiable matrix. US Patent No. 6509031. 2003.
79. Hamid M, Rehman KU. Potential applications of peroxidases. *Food Chem* 2009;115:1177–1186.
80. Govere EM, Tonegawa M, Bruns, MA, Wheeler EF, Kephart KB, Voigt JW, Dec J. Using minced horseradish roots and peroxidase for the deodorization of swine manure: a pilot scale study. *Biores Technol* 2007;98:1191–1198.
81. Zhu Y, Cao H, Tang L, Yang X, Li C. Immobilization of horseradish peroxidase in three-dimensional macroporous TiO<sub>2</sub> matrices for biosensor applications. *Electrochimica Acta* 2009;54:2823–2827.
82. Kim S, Kim B, Yadavalli VK, Pishko MV. Encapsulation of enzymes within polymer spheres to create optical nanosensors for oxidative stress. *Anal Chem* 2005;77(21):6828–6833.
83. Xu X, Zhao J, Jiang D, Kong J, Liu B, Deng J. TiO<sub>2</sub> sol-gel derived amperometric biosensor for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the electropolymerized phenazine methosulfate modified electrode. *Anal Bioanal Chem* 2002;374:1261–266.
84. Yuan J, Guo W, Wang E. Utilizing a CdTe quantum dots–enzyme hybrid system for the determination of both phenolic compounds and hydrogen peroxide. *Anal Chem* 2008;80:1141–1145.
85. Zhang Y, He P, Hu N. Horseradish peroxidase immobilized in TiO<sub>2</sub> nanoparticle films on pyrolytic graphite electrodes: direct electrochemistry and bioelectrocatalysis. *Electrochimica Acta* 2004;49:1981–1988.

## 350 ENHANCED FUNCTIONALITY OF PEROXIDASES

86. Zhang L, Zhang Q, Lu X, Li J. Direct electrochemistry and electrocatalysis based on film of horseradish peroxidase intercalated into layered titanate nano-sheets. *Biosens Bioelectron* 2007;23:102–106.
87. Xiao P, Garcia BB, Guo Q, Liu D, Cao G. TiO<sub>2</sub> nanotubes arrays fabricated in different electrolytes for biosensing. *Electrochem Commun* 2007;9:2441–2447.
88. Viticoli M, Curulli A, Cusma A, Kaciulis S, Nunziante S, Pandolfi L, Valentini F, Padeletti G. Third generation biosensors based on TiO<sub>2</sub> nanostructured films. *Mater Sci Eng C* 2006;26:947–951.
89. Zhang F, Zheng B, Zhang J, Huang X, Liu H, Guo S, Zhang J. Horseradish peroxidase immobilized on graphene oxide: physical properties and applications in phenolic compound removal. *J Phys Chem C* 2010;114:8469–8473.
90. Wei Y, Dong H, Xu J, Feng Q. Simultaneous immobilization of horseradish peroxidase and glucose oxidase in mesoporous sol-gel host materials. *Chemphyschem* 2002;9:802–808.
91. Gonzalo-Ruiz J, Alonso-Lomillo MA, Muñoz FJ. Screen-printed biosensors for glucose determination in grape juice. *Biosens Bioelectron* 2007;22:1517–1521.
92. Dai Z, Bao J, Yang X, Ju H. A bienzyme channeling glucose sensor with a wide concentration range based on co-entrapment of enzymes in SBA-15 mesopores. *Biosens Bioelectron* 2008;23:1070–1076.
93. Lin TY, Wu CH, Brennan JD. Entrapment of horseradish peroxidase in sugar-modified silica monoliths: toward the development of a biocatalytic sensor. *Biosens Bioelectron* 2007;22:1861–1867.
94. Patel AC, Li S, Yuan JM, Wei Y. In situ encapsulation of horseradish peroxidase in electrospun porous silica fibers for potential biosensor applications. *Nanoletters* 2006;6(5):1042–1046.
95. Qiu H, Lua L, Huang X, Zhang Z, Qu Y. Immobilization of horseradish peroxidase on nanoporous copper and its potential applications. *Bio Technol* 2010;101:9415–9420.
96. Sharma AK, Sehgal N, Kumar A. A quick and simple biostrip technique for detection of lactose. *Biotechnol Lett* 2002;24:1737–1739.
97. Agostini E, Hernandez-Ruiz J, Arnao MB, Milrand SR, Tigier HA, Acosta M. A peroxidase isoenzyme secreted by turnip (*Brassica napus*) hairy-root culture inactivation by hydrogen peroxide and application in diagnostic kits. *Biotechnol Appl Biochem* 2002;35:1–7.
98. Ragland BD, Kourad RJ, Chaffin C, Robinson CA, Hardy RW. Evaluation of homogenous direct LDL-cholesterol assay in diabetic patient: effect of glycemic control. *Clin Chem* 2000;46:1848–1851.
99. Chiou CC, Chang PY, Chan EC, Wu TL, Tsao KC, Wu JT. Urinary 8-hydroxyguanosine and its analogs as DNA marker of oxidative stress development of an ELISA and measurement in both bladder and prostate, cancers. *Clin Chem Acta* 2003;334:87–94.
100. Hopfer SM, Makowski GS, Davis EL, Aslanzadeh J. Detection of cystic fibrosis delta F508 mutation by anti-double stranded DNA antibody. *Ann Clin Lab Sci* 1995;25:475–484.
101. Kawamura O, Sato S, Kajii H, Nagayama S, Ohtani K, Chiba J, Ueno Y. A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin-A based on monoclonal antibodies. *Toxicology* 1989;27:887–897.
102. Strianese M, De Martino F, Pavone V, Lombardi A, Canters GW, Pellicchia C. A FRET-based biosensor for NO detection. *J Inorg Biochem* 2010;104:619–624.
103. Rannou P, Gawlicka A, Berner D, Pron A, Nechtsschein M, Djurado D. Spectroscopic, structural and transport properties of conducting polyaniline processed from fluorinated alcohols. *Macromolecules* 1998;31:1307–1315.
104. Flores-Loyola E, Cruz-Silva R, Romero-Garcia J, Angulo-Sanchez JL, Castillon FF, Farias MH. Enzymatic polymerization of aniline in the presence of different inorganic substrates. *Mater Chem Phys* 2007;105:136–141.
105. Arias-Marin E, Romero J, Ledezma-Perez A, Kniajansky S. Enzymatic mediated polymerisation of functional aniline derivatives in nonaqueous media. *Polym Bull* 1996;37:581–587.
106. Yang X, Wang P, Zhu Y, Li C. Photoelectric properties of horseradish peroxidase-functionalized CdSe/silica mesoporous composite and its sensing towards hydrogen peroxide. *J Solid State Electrochem* 2011;15:731–736.
107. Wang Z, Xu Q, Wang HQ, Yang Q, Yu JH, Zhao YD. Hydrogen peroxide biosensor based on direct electron transfer of horseradish peroxidase with vapor deposited quantum dots. *Sensors Actuat. B-Chem* 2009;138:278–282.
108. Durán N, Esposito E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Appl Cat B: Environ* 2000;28:83–99.
109. Klibanov AM. Peroxidase-catalyzed removal of phenols from coal conversion waste waters. *Science* 1983;221:259–261.
110. Karam J, Nicell JA. Potential applications of enzymes in waste treatment. *J Chem Technol Biotechnol* 1997;69:141–153.
111. Akhtar S, Husain Q. Potential applications of immobilized bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidase in the removal of phenols from polluted water. *Chemosphere* 2006;65:1228–1235.
112. Diao M, Ouedraogo N, Baba-Moussa L, Savadogo PW, N'Guessan AG, Bassole IHN. Biodepollution of wastewater containing phenolic compounds from leather industry by plant peroxidases. *Biodegradation* 2011;22:389–396.
113. Tatsumi K, Wada S, Ichikawa H. Removal of chlorophenols from wastewater by immobilized horseradish peroxidase. *Biotechnol Bioeng* 1996;51:126–130.
114. Fadnavis NW, Koteswar K. An unusual reversible sol-gel transition phenomenon in organogels and its application for enzyme immobilization in gelatin membranes. *Biotechnol Prog* 1999;15:98–104.
115. Dalal S, Gupta MN. Treatment of phenolic wastewater by horseradish peroxidase immobilized by bioaffinity layering. *Chemosphere* 2007;67:741–747.

## REFERENCES 351

116. Shakeri M, Shoda M. Decolorization of an anthraquinone dye by the recombinant dye-decolorizing peroxidase (rDyP) immobilized on mesoporous materials. *J Molec Catal B Enzym* 2008;54:42–49.
117. Matto M, Satar R, Husain Q. Application of calcium alginate–starch entrapped bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidase for the removal of colored compounds from a textile effluent in batch as well as in continuous reactor. *Appl Biochem Biotechnol* 2009;158:512–523.
118. Satar R, Husain Q. Applications of celite-adsorbed white radish (*Raphanus sativus*) peroxidase in batch process and continuous reactor for the degradation of reactive dyes. *Biochem Eng J* 2009;46:96–104.
119. Caza N, Bewtra JK, Biswas N, Taylor KE. Removal of phenolic compounds from synthetic waste water using soybean peroxidase. *Water Res* 1999;33:3012–3018.
120. Kinsley C, Nicell JA. Treatment of aqueous phenol with soybean peroxidase in the presence of polyethylene glycol. *Biores Tech* 2000;73:139–146.
121. Kennedy K, Alemany K, Warith M. Optimization of soybean peroxidase treatment of 2,4-dichlorophenol. *Water Res* 2002;28:149–158.
122. Duarte-Vazquez MA, Ortega-Tovar MA, Garcia-Almendarez BE, Regalado C. Removal of aqueous phenolic compounds from a model system by oxidative polymerization with turnip (*Brassica napus* L Var purple top white globe) peroxidase. *J Chem Tech Biotech* 2003;78:42–47.