



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

**“OXIDACIÓN DEL DIBENZOTIOFENO MEDIANTE LOS SISTEMAS:  
ENZIMA LACASA-ABTS O ÁCIDO FOSFOTÚNGSTICO-PERÓXIDO DE  
HIDRÓGENO Y DESULFURACIÓN OXIDATIVA DEL DIESEL”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA**

P R E S E N T A :

**FRANCISCO VILLASEÑOR ORTEGA**

DIRECTOR DE TESIS:

**DR. GUSTAVO VINIEGRA GONZÁLEZ**

MÉXICO, D.F.

Mayo de 2004

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y además cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93.

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Biología Molecular de Hongos Filamentosos del departamento de Biotecnología de la UAM-Iztapalapa y fue parcialmente financiado por el proyecto FIES 98112-2 del Instituto Mexicano del Petróleo.

El alumno de Doctorado Francisco Villaseñor Ortega recibió el apoyo económico del CONACyT con el registro de becario número 91901.

México, D. F. a 28 de Mayo de 2004

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

**Oxidación del dibenzotiofeno mediante los sistemas: enzima lacasa-ABTS  
o ácido fosfotúngstico-peróxido de hidrógeno y desulfuración oxidativa  
del diesel**

que presentó el alumno:

Francisco Villaseñor Ortega

**Comité tutorial:**

Director de tesis:  
Dr. Gustavo Viniegra González  
*Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa*

Asesor: Dr. Antonio Campero Celis  
*Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa*

Asesor: Dr. Jorge Soriano Santos  
*Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa*



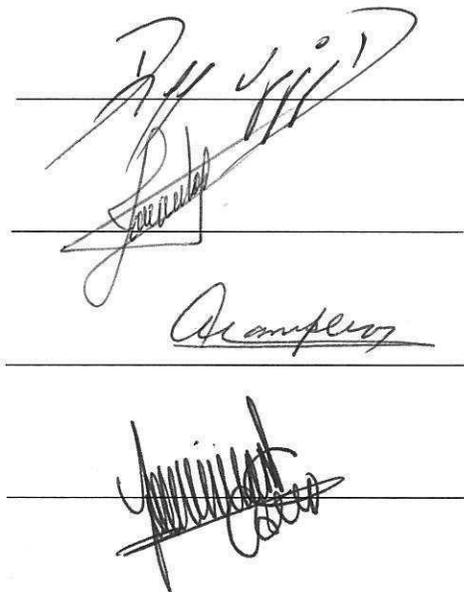
**Comité de evaluación:**

Presidente:  
Dr. Rafael Vázquez Duhalt  
*Instituto de Biotecnología UNAM*

Secretario:  
Dr. Jorge Soriano Santos  
*Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa*

Vocal:  
Dr. Antonio Campero Celis  
*Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa*

Vocal:  
Dr. Octavio Loera Corral  
*Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa*



## *Agradecimientos:*

*A Dios:*

*Por permitirme existir y finalizar esta etapa de mi vida profesional.*

*A mis padres:*

*María del Carmen Ortega Bolaños†:*

*Que con su amor incondicional de madre, supo educar y motivar a todos sus hijos.*

*Miguel Villaseñor Tirado:*

*Que con su esfuerzo, dedicación al trabajo y ejemplo de perseverancia, logró sacar adelante a sus hijos.*

*A mis hermanos:*

*De los cuales he aprendido con su ejemplo.*

*A mis sobrinos:*

*De los cuales he aprendido mucho a pesar de que son muy jóvenes.*

*Al Dr. Gustavo Viniegra González:*

*Por haberme aceptado en su grupo de investigación y compartir conmigo sus valiosas enseñanzas y consejos.*

*A mis asesores: Dr. Jorge Soriano Santos y Dr. Antonio Campero Celis por sus valiosos comentarios para la realización de este trabajo.*

*Al Dr. Rafael Vázquez Duhalt:*

*Por su valiosa cooperación al prestar las instalaciones de su laboratorio y sus importantes comentarios durante la realización de mis estudios de doctorado.*

*Al Dr. Octavio Loera Corral:*

*Por su importante colaboración durante todos mis estudios de Doctorado y su amistad.*

*A mis compañeros y amigos del Instituto Tecnológico de Celaya.*

*A mis compañeros y amigos de laboratorio: Emilio, Javier, Myrna, Marisol, Miriam, Eduardo, Rafael, Aram, Víctor, Divanery, Ruth y Claudia.*

*A mis amigos: Lourdes Celis, Paulina, Antonio, Angélica, Laura, Beatriz, Edith, José Luis y Claudia.*

# Índice general

	Página
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo I</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
<b>Capítulo II</b>	<b>6</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Dibenzotiofeno</b>	<b>7</b>
<b>2.2 Enzima lacasa</b>	<b>8</b>
<b>2.3 Mecanismo de reacción</b>	<b>9</b>
<b>2.4 Mediadores de oxido reducción</b>	<b>13</b>
<b>2.5 Oxidación de compuestos policíclicos aromáticos por lacasa</b>	<b>14</b>
<b>2.6 Oxidación de dibenzotiofeno por lacasa</b>	<b>15</b>
<b>2.7 Otras proteínas que oxidan compuestos azufrados.</b>	<b>15</b>
<b>2.8 Oxidación de dibenzotiofeno con catalizadores químicos</b>	<b>17</b>
<b>2.9 Desulfuración oxidativa del diesel</b>	<b>17</b>
<b>Capítulo III</b>	<b>25</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
<b>HIPOTESIS</b>	<b>26</b>
<b>Capítulo IV</b>	<b>27</b>
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	<b>28</b>
<b>4.1 Enzima lacasa</b>	<b>28</b>
<b>4.2 Separación de la enzima lacasa de DeniLite II S mediante precipitación con acetona fría</b>	<b>28</b>
<b>4.3 Determinación de proteína</b>	<b>28</b>
<b>4.4 Determinación de actividad</b>	<b>29</b>
<b>4.5 Parámetros cinéticos de Michaelis-Menten</b>	<b>29</b>
<b>4.6 Oxidación del DBT con la enzima lacasa y ABTS</b>	<b>29</b>
<b>4.7 Inmovilización de la enzima lacasa sobre perlas de alginato</b>	<b>30</b>

4.7.1 Alginato-sílice gel	30
4.7.2 Alginato-bentonita	30
4.7.3 Alginato-carbón activado	30
4.8 Inmovilización sobre sílice gel	31
4.9 Oxidación del ABTS por la enzima lacasa inmovilizada	32
4.10 Oxidación de siringaldazina por el ABTS oxidado en sistema abierto	32
4.11 Oxidación de siringaldazina por ABTS oxidado en condiciones anóxicas	32
4.12 Determinación del coeficiente de distribución del DBT en los sistemas hexano-fase polar	32
4.13 Distribución del DBT en un sistema de dos fases: hexano-etanol o hexano-acetonitrilo	33
4.14 Determinaciones analíticas de azufre	33
4.15 Oxidación del DBT con peróxido de hidrógeno y ácido fosfotúngstico en una mezcla hexano/disolvente polar	33
4.16 Desulfuración del diesel por oxidación con peróxido de hidrógeno	34
Capítulo V	35
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	36
5.1 Separación y concentración de la enzima lacasa	36
5.2 Determinación de los parámetros cinéticos de la enzima lacasa	37
5.2.1 Parámetros cinéticos con ABTS como sustrato	37
5.2.2 Parámetros cinéticos con siringaldazina como sustrato	38
5.3 <i>Efecto de la concentración de alcoholes y acetonitrilo sobre la actividad de la enzima lacasa</i>	39
5.4 Distribución del DBT en hexano/fase polar	41
5.5 <i>Reacción de oxidación del DBT con la enzima lacasa en un sistema de dos fases hexano/fase polar</i>	45
5.5.1 Reacción en un sistema de dos fases hexano/fase polar con enzima libre	46

5.5.2 Reacción en un sistema de dos fases hexano/fase polar con enzima inmovilizada	48
5.6 Oxidación del DBT por el sistema lacasa-ABTS en acetonitrilo-agua	49
5.7 Oxidación de la siringaldazina por el ABTS oxidado en ausencia de la enzima lacasa	53
5.8 Oxidación de la siringaldazina por el ABTS oxidado en condiciones anóxicas	55
5.9 Distribución del DBT entre hexano y una fase polar	56
5.10 Reacción de oxidación del DBT con el peróxido de hidrógeno sin catalizador	57
5.11 <i>Oxidación del DBT por peróxido de hidrógeno con ácido fosfotúngstico como catalizador</i>	58
5.12 Desulfuración oxidativa del diesel	61
Capítulo VI	69
CONCLUSIONES	70
Bibliografía	72
Apéndice	78

## Índice de figuras

	Página
Figura 2.1.- Estructura molecular del dibenzotiofeno	7
Figura 2.2.- Ciclo catalítico de la lacasa mostrando el mecanismo para la reducción y reoxidación de los sitios del cobre.	12
Figura 2.3.- Mediadores de oxido-reducción de la enzima lacasa.	13
Figura 2.4.- Estructura del activador TAML.	19
Figura 2.5.- Diagrama de proceso para la desulfuración oxidativa del diesel.	24
Figura 5.1.- Efecto de la concentración % (v/v) de acetona utilizada para precipitar la proteína sobre la actividad relativa remanente de la enzima lacasa recuperada y disuelta en un volumen igual al del extracto crudo.	36
Figura 5.2.- Cinética tipo Michaelis-Menten de la enzima lacasa con el ABTS como sustrato a 40°C.	38
Figura 5.3.- Cinética tipo Michaelis-Menten de la enzima lacasa con siringaldazina como sustrato a 30°C.	39
Figura 5.4.- Efecto de la concentración de los alcoholes metanol, etanol, isopropanol y del acetonitrilo sobre la actividad enzimática de la lacasa.	40
Figura 5.5.- Efecto de la concentración del disolvente acetonitrilo o etanol %(v/v) sobre el valor de Log D a 40°C.	42
Figura 5.6.- Efecto de la concentración del disolvente acetonitrilo o etanol %(v/v) sobre el valor de Log D a 50°C.	43
Figura 5.7.- Perfiles de HPLC de la fase hexano de la reacción de oxidación del DBT con la enzima lacasa en un sistema dos fases hexano-agua utilizando enzima libre.	46

Figura 5.8.- Perfiles de HPLC de la fase hexano de la reacción de oxidación del DBT con la enzima lacasa en un sistema dos fases hexano-agua/acetonitrilo con 15% de este solvente en base al volumen de la fase polar utilizando enzima libre.	47
Figura 5.9.- Perfiles de HPLC de la fase hexano de la reacción de oxidación del DBT con la enzima lacasa en un sistema dos fases hexano-agua utilizando enzima inmovilizada sobre perlas de alginato.	48
Figura 5.10.- Perfiles de HPLC de la fase hexano de la reacción de oxidación del DBT con la enzima lacasa en un sistema dos fases hexano-agua/acetonitrilo con 15% de este solvente en base al volumen de la fase polar utilizando enzima inmovilizada sobre perlas de alginato.	49
Figure 5.11.– Perfiles de cromatografía líquida (HPLC) de la reacción de oxidación del DBT con la enzima lacasa y ABTS en presencia de aire, después de 72 h a 40° C.	50
Figura 5.12.– Dependencia de la concentración de oxígeno sobre la oxidación del DBT con la enzima lacasa y el mediador ABTS.	51
Figura 5.13.– Cinética de oxidación del DBT en un medio constituido con agua-acetonitrilo mediante el sistema enzima lacasa-mediador ABTS a 40° C y una relación molar inicial de $[O_2]/[ABTS] = 396$ .	52
Figura 5.14.- Barridos de longitud de onda de diferentes especies químicas: mezcla ABTS oxidado/ABTS, siringaldazina, mezcla de los reactivos anteriores a la misma concentración final.	53
Figura 5.15.- Oxidación del ABTS por la enzima lacasa inmovilizada y oxidación de la siringaldazina por el $ABTS^+(.)$ .	54

Figura 5.16.- Perfiles de HPLC de la reacción de oxidación del DBT con peróxido de hidrógeno sin catalizador.	58
Figura 5.17 – Perfiles de cromatografía líquida (HPLC) de la oxidación del DBT con peróxido de hidrógeno y ácido fosfotúngstico en hexano-etanol.	59
Figura 5.18 – Cinéticas de oxidación de 10 mM DBT en el sistema hexano-etanol, utilizando diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno.	59
Figura 5.19.- Efecto de la concentración de peróxido de hidrógeno sobre la constante de velocidad $k_2$ .	60
Figura 5.20.- En esta gráfica se muestran las concentraciones de DBT y fluoreno a tiempo 0 y después de 150 min de reacción con peróxido de hidrógeno utilizando el ácido fosfotúngstico como catalizador en un medio de hexano-etanol.	61
Figura 5.21 – Efecto de la concentración de peróxido de hidrógeno sobre la remoción de azufre en diesel, utilizando el etanol como disolvente.	63
Figura 5.22 – Perfil de hidrocarburos en diesel obtenidos en un analizador fotométrico de flama (FPD).	64
Figura 5.23 – Perfil de hidrocarburos azufrados presentes en el diesel, obtenidos en un analizador fotométrico de flama (FPD).	65

## Índice de tablas

	Página
Tabla 2.1.- Comparación de diversos catalizadores que oxidan el dibenzotiofeno y su constante de velocidad de pseudo primer orden.	23
Tabla 5.1- Comparación de las constantes cinéticas de la lacasa recuperada por precipitación con acetona y las reportadas por Li et al., 1999.	38
Tabla 5.2 – Determinación del coeficiente estequiométrico de reacción con cambios de absorbancia en mezclas de ABTS oxidado y siringaldazina a diferentes proporciones.	55
Tabla 5.3.- Distribución del DBT (10 mM) en 10 mL de hexano en un sistema de dos fases constituido por 2.4 mL de solvente (etanol o acetonitrilo) y 0.5 mL de agua.	57
Tabla 5.4.- Comparación del etanol con el acetonitrilo para la reacción de oxidación con peróxido de hidrogeno y ácido fosfotúngstico y remoción de los compuestos azufrados del diesel.	62

## RESUMEN

Este trabajo pretende comparar la velocidad y rendimiento de la oxidación del dibenzotiofeno (DBT) por dos métodos alternativos:

- a) La oxidación mediada por el ácido 2,2'-azinobis-(3-etil benzotiazolin-6-sulfónico) o (ABTS) con la participación catalítica de una enzima oxidasa (lacasa), el oxígeno como aceptor final de electrones y el DBT como el donador de ellos.
- b) La oxidación del DBT por la acción del ácido fosfotúngstico oxidado previamente por peróxido de hidrógeno.

La justificación de este estudio, radica en la necesidad de encontrar métodos alternativos a la reducción catalítica de los compuestos azufrados presentes en los combustibles, para que estos se ajusten a las nuevas normas ambientales de menos de 50 ppm de azufre y se reduzca la contaminación de óxidos de azufre generados durante el funcionamiento de motores de trabajo pesado, que actualmente operan utilizando combustibles con un contenido de más de 350 ppm de azufre.

La hidrogenación de los compuestos azufrados, permite remover la mayor parte de estos en forma de  $H_2S$ , pero conforme se agotan los mercaptanos sencillos de tipo alifático, se vuelve cada vez más difícil reducir el azufre asociado a compuestos aromáticos como el DBT. Para lo cual se requiere de reactores que deben estar sometidos a más de 50 atm, dando por resultado un proceso caro, difícil de controlar y operar.

La ruta alternativa es la oxidativa, ya sea por la acción de los peroxiácidos formados al reaccionar el peróxido de hidrógeno con algunos compuestos como el ácido fosfotúngstico, o la formación de radicales libres estables tipo ABTS oxidado, promovidos por la acción catalítica de enzimas oxidasas como la lacasa. De esa forma, el DBT o sus isómeros alquilados pueden oxidarse, transformándose en sulfonas de los respectivos compuestos azufrados, las cuales son más polares y pueden extraerse por lixiviación del diesel, mediante algún solvente polar como el metanol o el etanol.

En esta tesis se investigaron las condiciones necesarias para que la cinética de oxidación del DBT promovida por la enzima lacasa tuviera lugar. Se demostró la necesidad de tener una elevada proporción de oxígeno por mol de ABTS ( $R=[O_2]/[ABTS]$ ,  $R>50$ ) para obtener resultados reproducibles que llegaran a la oxidación prácticamente total de 25  $\mu\text{M}$  de DBT con una constante cinética de pseudo primer orden  $k = -6.26 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ .

También se aportaron datos preliminares que han sido confirmados por el trabajo de M. Solís (tesis doctoral, 2004) en los que se indica que el ABTS actúa como oxidante directo del sustrato en ausencia de la enzima, pero que en el caso del DBT, esa reacción es muy lenta para ser detectada sin el apoyo de la lacasa.

Finalmente se demostró que el ácido fosfotúngstico puede ser un catalizador adecuado para remover el azufre orgánico, la reacción en hexano utilizando 25 mM de peróxido de hidrógeno, ocurre a presión atmosférica y temperatura de 40 °C con una velocidad  $k = -6.14 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ . Además, se pudieron remover los compuestos azufrados del diesel comercial a concentraciones por debajo de los límites de detección del aparato de fluorescencia de rayos X al realizar la reacción en presencia de etanol y después de un lavado con este solvente.

Esta tesis tiene dos conclusiones principales:

- a) La catálisis homogénea con el ácido fosfotúngstico, promovido por peróxido de hidrógeno, ofrece un proceso alternativo a la reducción catalítica para la desulfurización del diesel.
- b) El paso limitante de la oxidación del DBT promovido por la enzima lacasa, es la acción del intermediario, y por ello, es la etapa que debe mejorarse para obtener un proceso alternativo para la desulfuración del diesel.

# **CAPITULO I**

## **INTRODUCCIÓN**

### INTRODUCCIÓN

Actualmente las nuevas regulaciones ambientales exigen para el contenido de azufre en diesel menos de 40 ppm en Europa para el 2005, y menos de 15 ppm en Estados Unidos para el 2006. La actual tecnología para reducir el contenido de azufre es la hidrodesulfuración (HDS), proceso que requiere altas presiones y temperaturas, en reactores catalíticos de gran volumen. Sin embargo, esta tecnología es costosa para las refinerías (Te et al., 2001).

La búsqueda de nuevas tecnologías para reducir el contenido de azufre del diesel, esta dirigida a procesos en los cuales las condiciones de operación sean suaves, tales como presión atmosférica y temperaturas no por arriba de 60°C, con catalizadores de preferencia biológicos o, en el caso de los de origen químico, que no sean tóxicos. En condiciones tales que la reacción catalítica ocurra en un medio prácticamente libre de agua. Además, que los productos de la oxidación del azufre puedan ser separados por operaciones unitarias sencillas, tales como una extracción líquido-líquido o destilación.

Una de las nuevas tecnologías promisorias, es la desulfuración oxidativa del diesel. Para ello, se ha investigado la posible utilización de algunos catalizadores biológicos para oxidar los compuestos azufrados como el dibenzotiofeno. Entre estos catalizadores se encuentran la peroxidasa, cloroperoxidasa, lignina peroxidasa, hemoglobina, citocromo P-450 y lacasa (Doerge, 1986; Kobayashi et al., 1986; Colonna et al., 1992; Ayala et al., 1998; Torres y Vazquez-Duhalt, 2000; Fukushima et al., 1978; Bressler et al., 2000).

De los catalizadores anteriores, las peroxidasas son las más efectivas, pero con la desventaja que no son estables, ya que pierden rápidamente su actividad por la presencia del peróxido de hidrógeno utilizado como agente oxidante.

Entre los catalizadores químicos utilizados para la desulfuración oxidativa en presencia del peróxido de hidrógeno tenemos el ácido fosfotúngstico, ejemplo de compuestos polioxometálicos con una estructura tal como  $H_3PM_{12}O_{40}$  donde M= Mo(VI) ó W(VI) (Yazu et al., 2001; Te et al., 2001; Mei et al., 2003). Así como compuestos de hierro (III) llamados

TAML [tetra amido macrocyclic ligand] (Hangun et al., 2002). Además de diferentes catalizadores a base de Mo, Mg, Ti y Va (Wang et al., 2003; Palomeque et al., 2002; Hulea et al., 2001; Anisimov et al., 2003). Entre estos catalizadores, los más promisorios, tanto por su actividad y estabilidad son los TAML (Hangun et al., 2002). También se han utilizado peroxiácidos orgánicos como los formados por los ácidos fórmico, acético y propiónico en presencia del peróxido de hidrógeno (Te et al., 2001).

Los compuestos azufrados que resultan menos reactivos para el proceso de hidrodesulfuración son el dibenzotiofeno y sus derivados, disminuyendo la reactividad en el siguiente orden  $BT > DBT > 4\text{-metil DBT} > 4,6\text{-dimetil DBT}$ . En el caso de la desulfuración oxidativa las reactividades de estos compuestos azufrados son a la inversa, disminuyendo su reactividad en el siguiente orden:  $4,6\text{- dimetil DBT} > 4\text{- metil DBT} > DBT > BT$  (Te et al., 2001; Hangun et al., 2002).

Durante el proceso de la desulfuración oxidativa, los compuestos azufrados se oxidan a sus respectivos sulfóxidos y sulfonas, lo que aumenta su polaridad y modifica algunas de sus propiedades tales como su punto de ebullición, permitiendo ser separados por operaciones unitarias sencillas tales como la extracción con solventes o la destilación fraccionada (Mei et al., 2003).

Actualmente, el problema de la desulfuración del diesel parece estar llegando a su fin, sin embargo, es necesaria la búsqueda de catalizadores aún más económicos, estables, con alta actividad, que puedan inmovilizarse sobre un soporte para su reutilización y que no sean tóxicos o peligrosos para la salud humana al ser depositados en el medio ambiente.

# **CAPITULO II**

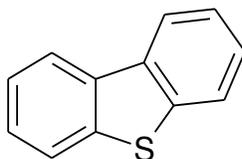
## **ANTECEDENTES**

## ANTECEDENTES

La remoción de azufre del petróleo es necesaria tanto por razones industriales como ambientales. El azufre presente en los productos del petróleo envenena los convertidores catalíticos, corroe partes de la maquinaria de combustión interna por la formación de oxiácidos del azufre y contamina el aire. El método convencional de reducir el contenido de azufre es la hidrodesulfuración (HDS) catalítica. Por este método, el hidrógeno y los compuestos orgánicos azufrados reaccionan a alta temperatura,  $T = 320-420\text{ }^{\circ}\text{C}$  y alta presión parcial de hidrógeno,  $P = 49-148\text{ atm}$ , produciendo  $\text{H}_2\text{S}$  que se separa del líquido y se puede oxidar a sulfato (Hangun et al., 2002). La completa remoción de azufre presente en el petróleo como sulfuros, disulfuros y mercaptanos es un proceso relativamente fácil y económico. Sin embargo, los benzotiofenos y dibenzotiofenos (DBTs) son difíciles de remover por este proceso, particularmente el 4-metil dibenzotiofeno y el 4,6-dimetil dibenzotiofeno.

### 2.1 Dibenzotiofeno

El dibenzotiofeno es un compuesto recalcitrante con un peso molecular de 184.26, tiene un coeficiente de partición  $\text{Log}(P) = 4.49$  (Van Mouwerik, et al., 1997). Es soluble en disolventes no polares como hexano, y poco polares como acetonitrilo, acetona y en alcoholes calientes. Su punto de ebullición está entre  $332-333^{\circ}\text{C}$  y su punto de fusión entre  $97-100^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 2.1.-** Estructura molecular del dibenzotiofeno

Se encuentra presente en gasolinas y diesel, contaminando con aproximadamente 500 mg S/L. Son muy pocos los microorganismos que lo pueden degradar, entre ellos tenemos: *Pseudomonas* (Luo et al., 2003), *Rhodococcus* (Maghsoudi et al., 2001), *Acinetobacter* (Marzona et al., 1997), *Desulfovibrio* (Bahrami et al., 2001).

## 2.2 Enzima lacasa

Esta enzima pertenece al grupo de las oxidasas de polifenoles (Thurston, 1994) y se encuentra presente en plantas superiores tales como *Rhus vernicifera*, *Rhus succedanea*, *Lactarius piperatus* y *Prunus persica*. También está presente en hongos tales como *Polyporus versicolor* A, B, *Pleorotus*, *Pholiata*, *Podospora anserina*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, hongos de la pudrición blanca y *Pyricularia oryzae*. (Gardiol *et al.*, 1998). La enzima lacasa no es específica a un solo sustrato, y la gama de sustratos que puede oxidar varía de una lacasa a otra (Thurston; 1994). Los sustratos pueden ser por ejemplo fenol, *orto* y *para* difenoles, hidroquinona, catecol, guayacol, 2,6-dimetoxifenol, diaminas, aminofenoles como *p*-fenilendiamina y ácido ascórbico, entre otros (Gardiol *et al.*, 1998., Thurston; 1994). El sustrato siringaldazina [N, N'-bis(3,5-dimetoxi-4 hidroxibenzilideno hidrazina)] se considera que puede ser oxidado únicamente por la enzima lacasa (Thurston; 1994). Así, varios compuestos orgánicos los cuales contienen grupos hidroxilo, ácido, o grupos amino pueden funcionar como sustratos (Gardiol *et al.*, 1998).

La función biológica de esta enzima aún no es clara. Ha sido implicada en diferentes procesos tales como esporulación, producción de pigmentos y degradación de lignina (Coll *et al.*, 1993). En el caso de los hongos, todas las enzimas involucradas en la degradación de lignina tales como lignino peroxidasa, manganeso peroxidasa, peroxidasa independientes de manganeso y oxidasas que generan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Heinzkill *et al.*, 1998), producen moléculas altamente reactivas (y por lo tanto tóxicas) de las cuales el micelio del hongo debe ser protegido. Esta puede ser una de las funciones de lacasa promoviendo la polimerización de estos compuestos antes de que entren a la hifa (Thurston; 1994).

La enzima lacasa contiene cuatro iones cobre: un Cu tipo 1 (T1), un Cu tipo 2 (T2) y dos iones Cu tipo 3 (T3). En sus estados oxidados los cobres T1 y T2 exhiben señales específicas en espectros de resonancia paramagnética de electrones (EPR). Por el contrario, los dos iones cobre T3 no son paramagnéticos. El cobre T1 en su estado oxidado absorbe fuertemente la luz a 610 nm (Andreasson y Reinhammar; 1976) mientras que los iones cobre T3 lo hacen a 340 nm (Andreasson *et al.*, 1976).

El cobre T1 está unido a un azufre de un residuo de cisteína, a dos grupos imidazol de residuos de histidina y un azufre de residuo de metionina. El cobre T2 está unido a al menos dos grupos imidazol de dos residuos del aminoácido histidina (Lu *et al.*, 1992). Los cobres T3 están unidos a tres nitrógenos de los cuales al menos uno es de un grupo imidazol de residuo del aminoácido histidina y a un cuarto ligando que puede ser H<sub>2</sub>O u OH<sup>-</sup> (Cline *et al.*, 1983).

### 2.3 Mecanismo de reacción

La enzima lacasa oxida los sustratos al remover un electrón por vez y genera radicales libres los cuales pueden polimerizarse (Bourbonnais y Paice; 1990). La enzima almacena electrones de reacciones de oxidación individuales y en su estado totalmente reducido contiene un total de cuatro electrones, así, la enzima puede transferir estos electrones al oxígeno molecular para formar agua (Andreasson *et al.*, 1976).

El Cu T1 es el aceptor primario de electrones y al menos uno de los dos electrones requeridos para reducir el sitio T3, aceptor de un par de electrones, procede de este sitio (Andreasson y Reinhammar; 1976). La velocidad de reacción del Cu T1 es limitante de la velocidad de reacción total (Andreasson y Reinhammar; 1979). La fuerza motriz de la reacción de oxidación de la lacasa está dada por un alto potencial redox en el sitio T1 y un bajo potencial redox del sustrato (Xu, 1996). El cobre T2 es necesario para la oxidación aeróbica del sitio T3 reducido, además permite al sitio T3 funcionar como un aceptor de dos electrones. (Penner *et al.*, 1984). El papel del Cu T2 no ha sido especificado en detalle, se cree que puede participar en la transferencia de uno de los electrones requeridos para reducir el sitio T3 (Andreasson y Reinhammar, 1976; Andreasson y Reinhammar, 1979).

En el mecanismo catalítico de la enzima lacasa se ha propuesto que el Cu T2 estabiliza un intermediario en la reducción de O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O; esto indica que el Cu T2 es parte del sitio de reducción del oxígeno en la enzima (Branden y Deinum, 1977). Se ha sugerido que la inhibición de la enzima a un valor de pH elevado, se debe a la formación de un complejo del cobre T2-OH<sup>-</sup>. Este ion Cu no puede permitir la reducción del sitio T3 hasta que el OH<sup>-</sup> se ha disociado o convertido a una molécula de agua. A valores de pH bajos, una de las moléculas

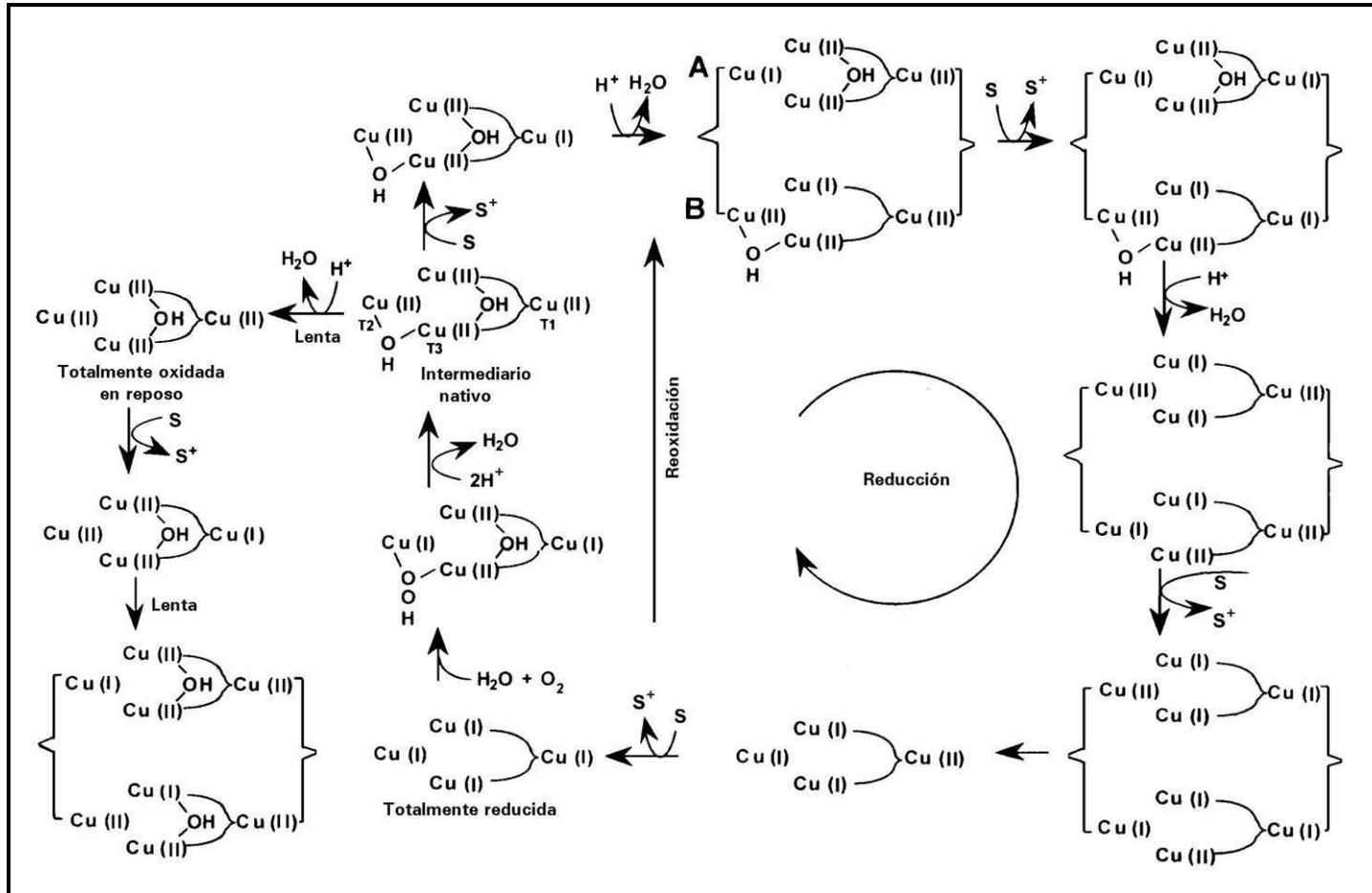
de agua formadas en la re-oxidación de la enzima reducida parece estar unida al sitio Cu T2 (Andreasson y Reinhammar, 1979; Branden y Deinum, 1977). De estudios con lacasa fúngica se sabe que el agua es un ligando intercambiable para el Cu T2 (Branden y Deinum, 1977).

La lacasa puede ser inhibida por halógenos, ya que la presencia de éstos limitan la accesibilidad de los átomos de cobre T2/T3, el orden de inhibición es  $F^- > Cl^- > Br^-$ . La inhibición por halógenos no incluye el  $I^-$ , porque éste reacciona con el sitio T1 y sirve como sustrato para la lacasa (Xu, 1996). El inhibidor  $F^-$  se une al Cu T2 e inhibe la transferencia de electrones entre el Cu T1 y el aceptor de dos electrones T3 (Andreasson y Reinhammar, 1976). Existen evidencias de que el Cu T2 está involucrado en la interacción de  $O_2$  con el sitio T3 como lo han sugerido Winkler *et al.* (1982), quienes en sus estudios de la unión de ligandos exógenos a los sitios T2 y T3 en lacasa, demostraron que el peróxido se une a un solo Cu en el sitio T3 en la enzima nativa, y además que el hidropéroxido no se une fuertemente en esta geometría sin la presencia del Cu T2, el cual aparentemente estabiliza el complejo T3-hidropéroxido para su posterior reducción a agua. En la enzima lacasa, en la cual se ha eliminado selectivamente el Cu T2 (T2D) se ha encontrado que une peróxido y azida de manera mucho menos fuerte que la lacasa nativa; esto sugiere que el Cu T2 tiene un rol en unir ligandos en el sitio T3 (Woolery *et al.*, 1984). El sitio T3 está constituido por un par de iones Cu no paramagnéticos que constituyen el sitio aceptor de dos electrones. La reducción de este sitio se inhibe de una manera característica cuando se incrementa el pH (Andreasson y Reinhammar, 1979). Algunos estudios han indicado que durante la función catalítica de la lacasa, es este sitio en la enzima nativa el que se une inicialmente al  $O_2$  para su posterior reducción con  $4 e^-$  a  $H_2O$  vía una reducción del peróxido intermediario con  $2e^-$  (Penner *et al.*, 1984).

Andreasson *et al.* (1976) sugieren que en el mecanismo de re-oxidación de la lacasa, el oxígeno recibe tres electrones de la enzima reducida en una reacción rápida y se forma un intermediario del oxígeno, por ejemplo un radical  $OH^\bullet$ . El Cu T2 es oxidado más lentamente que los otros dos donadores (Andreasson *et al.*, 1976). La descomposición del intermediario parece estar acoplada a la re-oxidación del cobre tipo 2, indicando la transferencia de electrón

entre las dos especies con la formación de agua (Branden y Deinum, 1977).

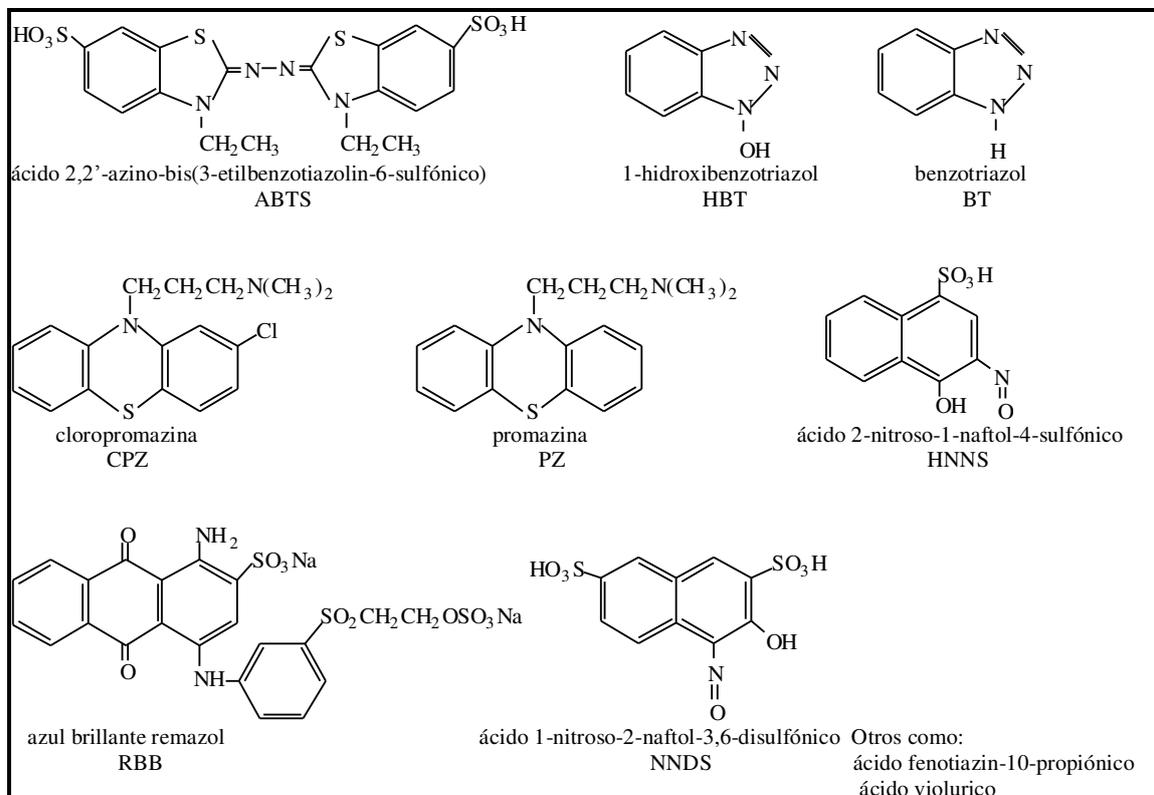
Solomon *et al.* (1996) realizaron una revisión sobre el mecanismo catalítico de la enzima lacasa y proponen que la velocidad de oxidación del sustrato depende del potencial reductor. Esto implica que la transferencia de electrones del sustrato al sitio T1 es la etapa que determina la velocidad en el número de recambio. Como se puede apreciar en la figura 2.2, existen dos posibles mecanismos: A) El cobre T1 transfiere su electrón al cobre T2 y el Cu T1 se reduce nuevamente; el Cu T1 y Cu T2 transfieren sus electrones a los Cu T3; el Cu T1 se vuelve a reducir y transfiere su electrón al Cu T2, el Cu T1 se reduce nuevamente, dando finalmente como resultando la enzima en la forma totalmente reducida. B) El grupo trinuclear es reducido secuencialmente por etapas de la transferencia de electrones del sitio T1 (el orden en que los tres cobres del sitio trinuclear son reducidos no se conoce aún).



**Figura 2.2.-** Ciclo catalítico de la lacasa mostrando el mecanismo para la reducción y reoxidación de los sitios del cobre. Dos posibles mecanismos: A) T1 y T2 juntos reducen el par T3. B) Cada cobre en el centro tinuclear es reducido secuencialmente por los electrones transferidos por el sitio T1. Solomom et al (1996)

## 2.4 Medidores de oxido reducción

Un mediador de oxido reducción es un compuesto al cual la enzima le puede sustraer electrones convirtiéndolo en un radical libre, el cual puede a su vez oxidar otros compuestos dependiendo de su potencial de oxido reducción, sin la participación de la enzima en esta última reacción. Mediante el uso de mediadores de oxido-reducción mostrados en la figura 2.3, tales como: el ácido 2,2'-azinobis-(3-etil benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), 1-hidroxibenzotriazol (HBT), benzotriazol (BT), azul brillante remazol (RBB), clorpromazina (CPZ), promazina (PZ), ácido 1-nitroso-2-naftol-3,6-disulfónico (NNDS) y ácido 2-nitroso-1-naftol-4-sulfónico (HNNS) la enzima lacasa es capaz de realizar la oxidación de compuestos aromáticos que normalmente no puede realizar por si sola (Bourbonnais *et al.*, 1997). Mediante los mediadores ABTS y HBT Bourbonnais *et al.*, (1997) realizaron la oxidación de compuestos de lignina no fenólicos tales como el alcohol veratrílico, 1-(3, 4-dimetoxifenil)-2-(2-metoxifenoxi)propan-1, 3-diol y 1-(3, 4-dimetoxifenil)-2-feniletanediol.



**Figura 2.3.**-Mediadores de oxido-reducción de la enzima lacasa (Bourbonnais *et al.*, 1997; Soares, *et al.*, 2001).

Asimismo, Li *et al.* (1998) utilizaron 1-hidroxibenzotriazol como mediador para la oxidación del dímero de lignina 1-(3, 4-dimetoxifenil)-2-(2-metoxifenoxi) propan-1, 3-diol. El radical libre de 1-HBT fue transformado a BT, el cual no puede mediar la oxidación del dímero de lignina.

Bourbonnais *et al.* (1998) estudiaron las propiedades electroquímicas y reactividades de los mediadores ABTS y 1-HBT y sus intermediarios responsables de la oxidación de lignina. El ABTS fue oxidado primero al catión radical ( $\text{ABTS}^{+\bullet}$ ) y luego al dicatión ( $\text{ABTS}^{++}$ ). Las dos especies oxidadas son relativamente estables y electroquímicamente reversibles. El  $\text{ABTS}^{++}$  fue el responsable de la oxidación del alcohol veratrílico como modelo de lignina no fenólico, mientras que  $\text{ABTS}^{+\bullet}$  reaccionó sólo con estructuras fenólicas de la lignina. El intermediario de HBT no fue estable; sin embargo, catalizó la oxidación del alcohol veratrílico al aldehído correspondiente.

Fritz y Kunath (1998) prepararon aldehídos aromáticos en medio acuoso por la oxidación de los correspondientes compuestos aromáticos metilados en la presencia de oxígeno, enzima lacasa y varios compuestos N-hidroxi. Los alcoholes alílicos también dan lugar a los correspondientes aldehídos, con buen rendimiento.

### **2.5 Oxidación de compuestos policíclicos aromáticos por lacasa**

Recientemente Majcherczyk *et al.*, (1998) lograron la oxidación de algunos hidrocarburos policíclicos aromáticos mediante la enzima lacasa de *Trametes versicolor*. Sin mediador, la enzima fue capaz de oxidar en cierta proporción los siguientes compuestos cuya concentración inicial fue de 25  $\mu\text{M}$ : acenaftileno 37%, antraceno 18%, benzo [a] pireno 19%, acenafteno 10%, fluoranteno 10%, pireno 8%, benzo [a] antraceno 6%, criseno 10%, benzo [a] fluoranteno 10%, benzo [k] fluoranteno 10% y perileno 10%. Los compuestos que la enzima sola no logró oxidar fueron naftaleno, fluoreno y fenantreno. Sin embargo, en presencia del mediador 1-HBT, la enzima fue capaz de oxidar el 100% de acenaftileno, antraceno, benzo [a] pireno, acenafteno, perileno y fluoreno, e incrementar la proporción de oxidación de pireno de 8 a 48%, benzo [a] antraceno de 6 a 53%.

Collins *et al.* (1996) realizaron la oxidación de los compuestos antraceno y benzo [a] pireno a una concentración inicial de 20 mg/L mediante la enzima lacasa. El 30% del antraceno fue oxidado por la enzima sin mediador; cuando el mediador ABTS estuvo presente, se logró oxidar el 80%. En contraste, el benzo[a]pireno no fue oxidado por la lacasa sin mediador, y en la presencia de éste se logró oxidar el 100%.

Pickard *et al.* (1999) estudiaron el efecto de los mediadores ABTS y HBT sobre la oxidación del antraceno, cuando 1 mM de HBT estuvo presente, el 80% del antraceno original (20  $\mu$ M) fue oxidado en 9 h. Cuando se utilizó 1 mM de ABTS todo el antraceno fue oxidado en el mismo tiempo. Sin embargo, con 1 mM de ABTS en combinación de 1 mM de HBT, el antraceno fue totalmente oxidado en un tiempo de 10 minutos, lo que sugiere que existe un efecto sinérgico de los mediadores.

### **2.6 Oxidación de dibenzotiofeno por lacasa**

Bressler *et al.* (2000) lograron oxidar 20  $\mu$ M de dibenzotiofeno mediante la enzima lacasa de *Coriopsis gallica* UAMH8260 en la presencia de 1 mM de 1-hidroxibenzotriazol y 1 mM de ABTS en 0.1 M de amortiguador de acetatos pH 4.5 conteniendo 15% (v/v) de acetonitrilo con 0.5 unidades de enzima. Después de 18 h de reacción las muestras fueron acidificadas y extraídas tres veces con iguales volúmenes de cloruro de metileno. Los extractos fueron combinados y secados con sulfato de sodio anhidro y concentrados bajo nitrógeno previo al análisis de cromatografía de gases. Después del análisis de gases masas todos los extractos fueron derivatizados con diazometano y analizados por GS-MS. El producto de oxidación del dibenzotiofeno fue el sulfóxido de dibenzotiofeno. La susceptibilidad para la oxidación de los sustratos por la lacasa parece que está relacionada al potencial de ionización (PI) de los sustratos, compuestos con un PI por arriba de 8.52 no fueron oxidados. El dibenzotiofeno tiene un PI de 8.44.

### **2.7 Otras proteínas que oxidan compuestos azufrados.**

Algunas enzimas tienen la capacidad de oxidar tiofenos y compuestos organosulfurados *in vitro*. Por ejemplo, Torres y Vazquez-Duhalt (2000) realizaron modificaciones a la

hemoglobina humana. Las modificaciones incluyeron uniones covalentes a polietilenglicol (peso molecular 5000) sobre grupos amino libres y metil esterificaciones de grupos carboxílicos libres. La hemoglobina se ensayó sobre 11 hidrocarburos aromáticos policíclicos y dos compuestos aromáticos organosulfurados: dibenzotiofeno y tiantreno. Ocho de los hidrocarburos aromáticos policíclicos fueron transformados a sus respectivas cetonas, y los azufrados formaron sulfóxidos. Además la hemoglobina modificada mostró 10 veces más actividad que la proteína no modificada. Ortiz-León et al. (1995) utilizaron la hemoglobina y el peróxido de hidrógeno para oxidar compuestos policíclicos aromáticos, entre ellos el dibenzotiofeno. Fukushima et al. (1978) realizaron la oxidación de compuestos azufrados mediante el citocromo P-450. El sistema requirió oxígeno y NADPH y no fue afectado por la catalasa, la cual descompone el peróxido de hidrógeno. Así mismo, otros investigadores utilizaron el citocromo P-450 para la oxidación de compuestos azufrados. (Watanabe et al., 1980; Watanabe et al., 1982). Otra proteína utilizada para la oxidación de sulfuros es la microperoxidasa (Mashino et al., 1990; Colonna et al., 1994).

Vazquez-Duhalt et al. (1994) utilizaron la lignino peroxidasa para oxidar compuestos aromáticos en sistemas formados por mezclas de agua y solventes orgánicos tales como metanol, isopropanol, N, N-dimetilformamida, acetonitrilo y tetrahidrofurano. De los 20 compuestos aromáticos analizados, 9 fueron oxidados por la lignino peroxidasa en la presencia de peróxido de hidrógeno, entre ellos el dibenzotiofeno. La lignino peroxidasa fue capaz de oxidar aquellos compuestos con un potencial de oxidación  $< 8$  eV (medido por impacto de electrón). Baciocchi et al. (2000) utilizaron la lignino peroxidasa de *Phanerochaete chrysosporium* para oxidar compuestos aromáticos azufrados en presencia de peróxido de hidrógeno.

Doerge (1986) realizó la oxidación de compuestos organosulfurados mediante el uso de peroxidases, tales como cloroperoxidasa, lactoperoxidasa y peroxidasa del rabano blanco. El mecanismo de transferencia de oxígeno para la lactoperoxidasa fue investigado por Doerge et al. (1991).

El uso de peroxidases tales como la del rábano blanco y la cloroperoxidasa para la oxidación de sulfuros mediante el uso de peróxido de hidrógeno fue realizada por

Kobayashi et al. (1986). Así mismo, el sistema cloroperoxidasa - peróxido de hidrógeno se utilizó para reacciones de sulfoxidación por Colonna et al. (1992).

### 2.8 Oxidación de dibenzotiofeno con catalizadores químicos

Yazu et al. (2001) lograron oxidar los dibenzotiofenos, mediante el peróxido de hidrógeno, utilizando el ácido fosfotúngstico como catalizador a 60°C en un sistema bifásico constituido por n-octano/acetonitrilo, obtuvieron las respectivas sulfonas como productos principales. La oxidación se llevó a cabo en la fase de acetonitrilo y las sulfonas no migraron hacia la fase de n-octano. Además, lograron reducir el contenido de azufre de un diesel ligero utilizando este sistema de oxidación bifásico.

La composición de mezcla fue: 24.87  $\mu$ M de ácido fosfotúngstico, 48.7 mM de peróxido de hidrógeno, 4.97 mM de DBT, acetonitrilo 49.75 % (v/v). El dibenzotiofeno desapareció completamente a los 30 minutos.

En la desulfuración del diesel ligero (330 ppm), se logró una remoción de 14.8% sin el ácido fosfotúngstico y sin peróxido de hidrógeno. La oxidación con el ácido fosfotúngstico y peróxido de hidrógeno logró remover un 86.7 % del contenido de azufre y cuando se incrementó el volumen de acetonitrilo 4 veces, se logró remover un 96.3 %.

### 2.9 Desulfuración oxidativa del diesel

Los compuestos azufrados son ligeramente más polares que los hidrocarburos no azufrados. Sin embargo, los compuestos azufrados oxidados tales como las sulfonas o sulfóxidos son sustancialmente más polares que los compuestos azufrados reducidos. Esto permite la remoción selectiva de los compuestos azufrados de los hidrocarburos por una combinación de procesos de oxidación selectiva y extracción con solventes o adsorción sólida (Mei et al., 2003).

La desulfuración oxidativa tiene la ventaja sobre la hidrosulfuración que los compuestos azufrados que son más difíciles de reducir por hidrosulfuración, son los más reactivos para la desulfuración oxidativa. En efecto, la desulfuración oxidativa

tiene el orden de reactividad inverso cuando se compara al proceso de hidrodesulfuración (Wang et al., 2003; Hangun et al., 2002).

Algunos peroxi-ácidos orgánicos (obtenidos a partir de los ácidos: fórmico, acético, propiónico etc.) han sido utilizados para la oxidación selectiva de compuestos azufrados orgánicos (Te et al., 2001).

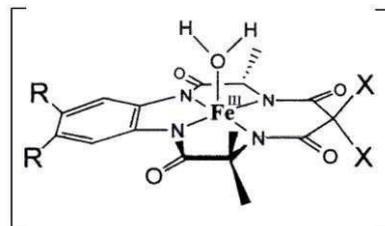
El procedimiento más común para producir sulfonas a partir de la oxidación de compuestos azufrados, es haciéndolos reaccionar con un peroxi-ácido carboxílico generado in situ por el peróxido de hidrógeno y un apropiado ácido carboxílico. Recientemente, la activación del peróxido de hidrógeno con polioxometales con una estructura tal como  $H_3PM_{12}O_{40}$  donde (M= Mo(VI), W(VI)) es de interés para producir oxidantes más efectivos y selectivos, tales como polioxoperoxo-complejos, del tipo  $PO_4[MO(\mu-O_2)(O_2)_2]^{3-}_4$ , para la oxidación de nucleófilos como los compuestos azufrados. Aún los compuestos azufrados con menos nucleofilicidad, por ejemplo el dibenzotiofeno, pueden ser oxidados bajo condiciones suaves, a sulfóxidos o sulfonas con altos rendimientos. Sin embargo, el tiempo de reacción y la descomposición del peróxido de hidrógeno hacen el proceso impráctico a escala industrial (Mei et al., 2003).

Te et al. (2001) estudiaron un grupo de diferentes catalizadores precursores de polioxometalatos para la desulfuración oxidativa de dibenzotiofenos. Encontraron que el sistema fosfotúngstico/ $H_2O_2$  fue significativamente más activo que su contraparte el sistema fosfomolibdico/ $H_2O_2$ . Los sistemas silicotúngstico y silicomolibdico/ $H_2O_2$  no fueron muy activos para esta reacción. La reactividad de DBT, 4-metildibenzotiofeno y 4,6-dimetildibenzotiofeno fue estudiada para el sistema fosfotúngstico/ $H_2O_2$  la cual disminuyó al incrementarse los sustituyentes metilo. Para el sistema ácido fórmico/ $H_2O_2$  mostró una reactividad inversa. Esto se debe quizá a que la molécula  $PO_4[WO(\mu-O_2)(O_2)]_4^{3-}$  es una molécula grande de estructura rígida y puede presentar impedimento esteárico al reaccionar con las moléculas de los DBTs sustituidos. Por el contrario, el peroxiácido formado con el ácido fórmico es una molécula pequeña y no tiene el impedimento esteárico, por lo que la reactividad con los DBTs con grupos metilos refleja las reactividades de oxidación intrínsecas de cada molécula.

Se ha llevado a cabo la catálisis a base de compuestos metálicos en conjunto con hidroperóxidos como oxidantes. Los catalizadores reportados incluyen mezclas de

óxidos de molibdeno/tungsteno, ácido fosfotúngstico (AFT) y metil trioxorenio. Sin embargo, la selectividad de reacción, seguridad y costo son importantes aspectos para la selección del oxidante, catalizador y condiciones de operación para el proceso de desulfuración oxidativa. Los peroxiácidos son generados in situ a condiciones de operación de 90-120°C próximo a la presión atmosférica. Los sistemas catalíticos son tóxicos y caros. Por lo tanto, son necesarias nuevas tecnologías que puedan realizar la oxidación bajo condiciones suaves y que puedan selectivamente oxidar los compuestos azufrados (Te et al., 2001).

Hangun et al. (2002) desarrollaron una serie de compuestos del hierro (III) llamados TAML (tetra amido macrocyclic ligand), activadores que aumentan la capacidad de oxidación del peróxido de hidrógeno a bajas concentraciones de catalizador y condiciones de reacción suaves. Estos activadores de peróxido han encontrado usos en muchas áreas diferentes incluyendo la industria de la pulpa y del papel, industria textil e industrias de lavandería, mineralización de órgano halógenos, y otras. Estos compuestos son capaces de oxidar rápidamente los dibenzotiofenos sustituidos.



**Figura 2.4.-** Estructura del activador TAML. R = H, X = F

Los grupos R y X son utilizados para controlar la reactividad del activador, la selectividad y tiempo de vida. Estos activadores del peróxido de hidrógeno pueden utilizarse a diferentes condiciones de reacción incluyendo pH variable, temperatura y composición de solventes. No son tóxicos y son los más efectivos a bajas concentraciones (1-5  $\mu$ M; 0.5 – 2 ppm) (>7000:1 la relación de sustrato/catalizador)

Una amplia gama de benzotiofenos y dibenzotiofenos tales como: DBT, 4-metil DBT, 4,6-dimetil DBT y 2-metil DBT son rápidamente oxidados por el peróxido de hidrógeno a presión atmosférica en la presencia del activador Fe-TAML, en agua/terbutanol para dar las correspondientes sulfonas. Estas conversiones, que normalmente requieren

menos de 1 h, son realizadas con relaciones molares de sustrato a catalizador de aproximadamente 7000:1 y la temperatura de reacción de 60°C, ya que las sulfonas son muy insolubles en mezclas ricas en agua, precipitan de la solución por enfriamiento próximo a temperatura ambiente.

Los tiempos de reacción en segundos para que la oxidación de 80 µM de los compuestos de DBT sea >95% a 40°C utilizando 0.25 mM de activador son: Dibenzotiofeno 200, 4-metil dibenzotiofeno 1500, 2-metildibenzotiofeno 800, 4,6-dimetildibenzotiofeno 150 (Hangan et al., 2002). Estos datos muestran que este tipo de catalizadores permite obtener velocidades del orden de  $k=0.12 \text{ min}^{-1}$  para la oxidación de los derivados recalcitrantes del DBT.

Collins et al. (1997) realizaron la oxidación del dibenzotiofeno con peróxido de hidrógeno utilizando el ácido fosfotúngstico como catalizador y el bromuro de tetraoctilamonio como agente de transferencia de fase en una mezcla de agua y tolueno. Los resultados mostraron la presencia de dos reacciones competitivas, la oxidación del dibenzotiofeno y la descomposición no productiva del peróxido de hidrógeno. Esto se confirmó al realizar la reacción en la ausencia del dibenzotiofeno como sustrato. En las reacciones de oxidación del diesel, todos los compuestos azufrados presentes fueron oxidados. La separación de los compuestos azufrados oxidados se realizó mediante adsorción sobre sílice gel, el contenido inicial fue de 0.25 % peso de S y después de la adsorción fue de 0.005% peso de S.

Hangan et al. (2002) desarrollaron catalizadores para la oxidación con tiempos de vida media útiles vía un proceso de diseño iterativo en el cual los grupos ligandos sensibles a oxidación son identificados y reemplazados. El proceso ha permitido un catalizador con gran aumento y estabilidad hacia la degradación hidrolítica y oxidativa. El catalizador de Fe puede estar constituido exclusivamente de elementos bioquímicamente comunes. Son eficientes y selectivos activadores de peróxido para muchas áreas de la tecnología, solubles en agua y efectivos en cantidades pequeñas (nanomolar o por debajo de micromolar) sobre un amplio intervalo de pH.

Los radicales hidroxilo son un potente sustractor de átomos de hidrógeno. La energía del enlace O-H del agua tiene un valor de 119.6 Kcal/mol, que es mucho mayor que el

de la mayoría de los enlaces C-H. Consecuentemente, la mayoría de las sustracciones de H<sup>•</sup> del carbón por OH<sup>•</sup> son exotérmicas.

Uno de los posibles intermediarios es un complejo terminal metal-oxo y otros son peroxo y uniones de complejos oxo de varios tipos. El complejo oxo terminal puede originarse cuando un solo ion metálico catalítico sustrae un átomo de oxígeno del peróxido de hidrógeno y libera agua. Esta reactividad se encuentra en el citocromo P-450 a base de hierro. También se encuentra cuando el manganeso (III) unido a tetraamido-N macrocíclico y complejos relacionados son tratados con peróxido; el primer complejo Mn(V)-monooxo fue producido y caracterizado.

El hierro es el más importante elemento catalítico para los activadores TAML. Al cambiar los sustituyentes sobre los anillos quelados de seis miembros, no sólo se puede cambiar la efectividad de catálisis y vida media del catalizador, sino también la velocidad de hidrólisis puede alterarse significativamente.

Activadores Fe-TAML son capaces de tener un número de recambio por h de más de 10000, en ciertas aplicaciones, no consumen el peróxido rápidamente a través de la dismutación, por que generalmente muestran sólo una débil actividad de catalasa. Son solubles en agua, fáciles de utilizar, y se activan bajo condiciones neutras y básicas. Los procesos se efectúan a temperaturas moderadas, presión atmosférica y son efectivos a concentraciones nanomolares o micromolares.

Mei et al., (2003) realizaron la oxidación del DBT mediante el ácido fosfotúngstico y peróxido de hidrógeno con y sin ultrasonido. La oxidación del DBT a sulfona de DBT se alcanzó en un 85 y 95% en 1 y 3 min de ultrasonificación, respectivamente, en 7 min el DBT pudo ser oxidado completamente a sulfona. En comparación, la conversión de DBT a sulfona de DBT en la ausencia de ultrasonido fue solamente del 21% en un min y alcanzo 80% en 7 min, la cual es menor que la conversión con un minuto de sonicación. En la reacción de desulfuración oxidativa del diesel, la mejor corrida sin sonicación para un diesel con 0.253 % peso de S, seguido por extracción con metanol produjo la desulfuración del diesel con un contenido de azufre de 0.085%, el cual corresponde a la remoción de 66.4% de azufre después de 2.5 h de reacción. Mediante

10 min de sonicación, de un diesel con 0.3011 % (peso) de S, se logró remover el 98.7 % de éste.

Wang et al. (2003) realizaron la oxidación de compuestos azufrados presentes en queroseno, mediante ter-butil hidroperóxido, utilizando varios catalizadores de Mo. La actividad de oxidación del DBT aumentó cuando el contenido de Mo se incrementó hasta 16% peso y disminuyó cuando el contenido de Mo estuvo por arriba de ese valor. La oxidación de compuestos azufrados modelo como benzotiofeno, dibenzotiofeno, 4-metil dibenzotiofeno y 4,6-dimetil benzotiofeno se realizó también con el catalizador con 16% de Mo/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y con ter-butil hidroperóxido; la actividad de oxidación de estos compuestos fue en el siguiente orden decreciente DBT > 4-metil DBT > 4,6-dimetil DBT >> BT. Se puede inferir que las reactividades de oxidación de los diferentes DBTs llevadas a cabo mediante el catalizador de Mo varían dependiendo de dos factores: La densidad de electrones del átomo de azufre en los DBTs y el impedimento esteárico de los sustituyentes metilo.

Palomeque et al. (2002) realizaron la oxidación del DBT mediante peróxido de hidrógeno a 60°C, utilizando una mezcla de hidrotalcita y mezcla de óxido de MgLa como catalizador y nitrilos o metanol como disolventes. Se obtuvo alta actividad después de la calcinación e hidratación de la hidrotalcita. El acetonitrilo fue el mejor solvente, mientras que con el metanol las reacciones fueron mucho más lentas. La descomposición del peróxido de hidrógeno también se observa para hidrotalcitas y es la principal reacción para temperaturas por arriba de 80°C. Esta reacción no ocurre en la ausencia de nitrilos y es más rápida por encima de la mezcla de óxidos de MgLa de alta fuerza básica, de acuerdo con la descomposición de un intermediario iminoperácido formado por la adición del peróxido de hidrógeno al nitrilo, catalizada por la base. La actividad se incrementó cuando se aumentó la relación Mg/Al debido a la baja velocidad de descomposición del peróxido atribuida a la baja basicidad del sólido. Cuando los nitrilos son utilizados como solventes, el peróxido de hidrógeno forma un ácido peroxicarboximídico en la presencia de una base sólida tal como la hidrotalcita. A su vez, éste actúa como catalizador para formar un perhidroxil anión, el cual luego ataca nucleofílicamente el nitrilo para generar el ácido peroxicarboximídico, el cual es un intermediario activo oxidante.

Hulea et al. (2001) utilizaron Ti conteniendo mallas moleculares como catalizadores para la oxidación de compuestos azufrados con peróxido de hidrógeno bajo condiciones suaves. La actividad catalítica de TS-1 (silicato de titanio), Ti-beta y Ti-HMS (hexagonal mesoporous silica) en la oxidación de derivados de tiofeno con peróxido de hidrógeno. TS-1 demostró baja actividad debido al acceso restringido de los compuestos azufrados hacia la porosidad. Ti-beta y Ti-HMS mostró ser efectivo bajo varias condiciones de reacción, en dos fases tanto sólido-líquido y sistemas de tres fases sólido-líquido-líquido. Los resultados mostraron que la reacción de sulfo-oxidación puede ser utilizada para disminuir el contenido de azufre del queroseno sin consumo de hidrógeno y sin el uso de equipo de alta presión. En este nuevo método los compuestos poliaromáticos azufrados (derivados de benzo y dibenzotiofeno) son oxidados a sus correspondientes sulfóxidos y sulfonas las cuales son removidas por simple separación líquido-líquido.

Anisimov et al. (2003) sintetizaron catalizadores de oxidiperoxocomplejos de vanadio y los utilizaron para la desulfuración del diesel, en un sistema de dos fases. Los complejos manifestaron alta actividad catalítica y selectividad en la oxidación de sulfuros. La oxidación de los compuestos azufrados presentes en el diesel con peróxido de hidrógeno y estos catalizadores, seguido de una extracción, redujo la cantidad total de azufre en el diesel de 0.86% a 0.2%.

En la tabla 2.1 se comparan varios de los catalizadores que oxidan el dibenzotiofeno que se mencionaron en esta sección.

Tabla 2.1.- Comparación de diversos catalizadores que oxidan el dibenzotiofeno y su constante de velocidad de pseudo primer orden.

Catalizador	% avance (So-S)/So	Tiempo (min)	Constante de velocidad k (min <sup>-1</sup> )
Ácido fosfotúngstico y sonicación <sup>a</sup>	98.7	10	0.43
TAML (tetra amido macrocyclic ligand) <sup>b</sup>	95	2.5 - 25	10 <sup>-2</sup> < k < 10 <sup>-1</sup>
Ácido fórmico/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>c</sup>	66.6	57	1.9 x 10 <sup>-2</sup>
Óxidos de Mg/Al con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>d</sup>	93	45	5.9 x 10 <sup>-2</sup>

<sup>a</sup>Mei et al., (2003); <sup>b</sup>Hangun et al., (2002); <sup>c</sup>Te et al. (2001); <sup>d</sup>Palomeque et al. (2002).

Ayala et al. (1998) desarrollaron un método biotecnológico para la desulfuración del diesel. El método incluye la etapa de oxidación catalítica de los compuestos organosulfurados y tiofenos contenidos en el diesel, con hemoproteínas para formar sulfóxidos y sulfonas, seguido por una etapa de destilación en la cual estos compuestos oxidados son removidos del diesel. Este material, con un contenido de 1.6% de azufre fue biocatalíticamente oxidado con cloroperoxidasa de *Caldaryomices fumago* en la presencia de 0.25 mM de peróxido de hidrógeno. La reacción fue llevada a cabo a temperatura ambiente y los compuestos organosulfurados fueron transformados a sus respectivas sulfóxidos y sulfonas los cuales fueron removidos por destilación. La fracción resultante después de destilación contuvo solamente 0.27% de azufre.

El proceso para la desulfuración oxidativa del diesel, que actualmente ha logrado reducir el contenido de azufre de 500 ppm a menos de 8 ppm, es el que han diseñado Rappas et al. (2002) y se muestra en la figura 2.5 en el cual se utiliza el peroxiácido obtenido a partir del peróxido de hidrogeno y el ácido fórmico para oxidar los compuestos azufrados del diesel. El metanol es el solvente utilizado para extraer las sulfonas formadas; el metanol se puede reutilizar después de una destilación para eliminar las sulfonas presentes.

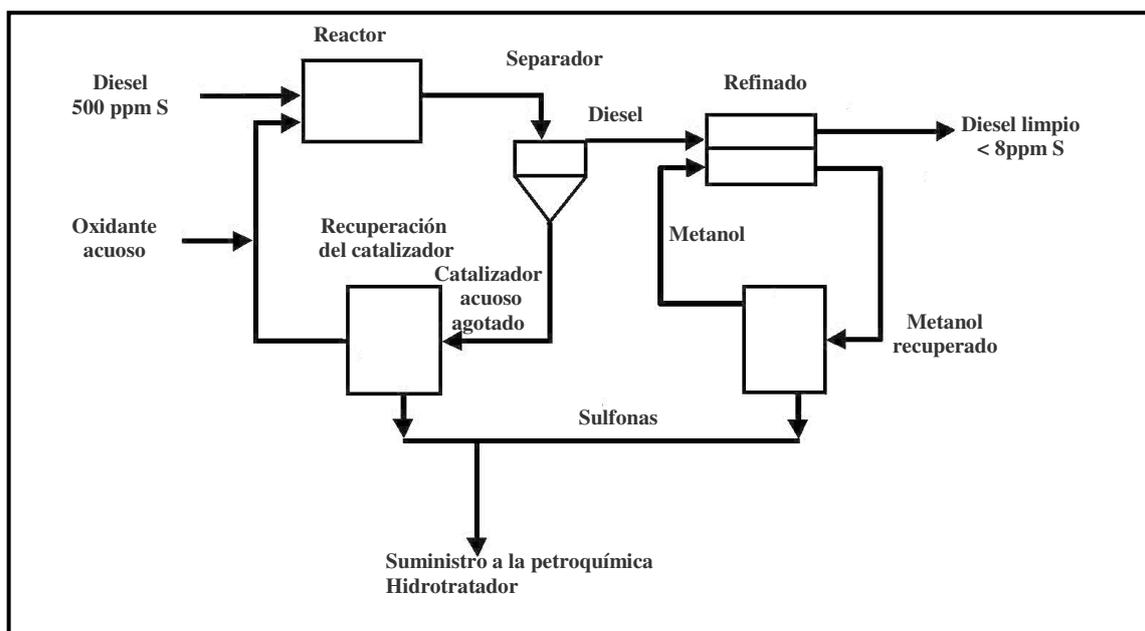


Figura 2.5.- Diagrama de proceso para la desulfuración oxidativa del diesel (Rappas et al., 2002)

## **CAPITULO III**

### **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### Hipótesis:

Se podrá oxidar el dibenzotiofeno presente en la fase orgánica con un catalizador ya sea biológico ó químico, lo que facilitará la separación de la sulfona formada a partir del dibenzotiofeno, mediante un proceso de extracción con etanol. Se seleccionará el catalizador más eficiente, el cual podrá oxidar los compuestos azufrados presentes en el diesel, en un sistema de reacción de dos fases y se podrán remover las sulfonas formadas mediante un proceso de extracción con etanol.

### Objetivo general:

**Comparar distintos sistemas modelo en fase orgánica para la oxidación del dibenzotiofeno utilizando lacasa o ácido fosfotúngstico-peróxido de hidrógeno, y su aplicación en la desulfuración oxidativa profunda del diesel.**

### Objetivos específicos:

- 1.- Caracterizar la oxidación del dibenzotiofeno mediante la enzima lacasa de *Myceliophthora termophila*, clonada en *Aspergillus oryzae* (EC 1.10.3.2) en un sistema agua-acetonitrilo y determinar si la oxidación procede utilizando la enzima inmovilizada.
- 2.- Caracterizar la oxidación del dibenzotiofeno mediante el peróxido de hidrógeno, catalizada por el ácido fosfotúngstico en un sistema constituido por hexano-acetonitrilo.
- 3.- Caracterizar la oxidación del dibenzotiofeno mediante el peróxido de hidrógeno, catalizada por el ácido fosfotúngstico en un sistema constituido por hexano-etanol.
- 4.- Estudiar la oxidación de los compuestos azufrados presentes en el diesel mediante el peróxido de hidrógeno, catalizada por el ácido fosfotúngstico en un sistema de dos fases diesel-acetonitrilo.
- 5.- Estudiar la oxidación de los compuestos azufrados presentes en el diesel mediante el peróxido de hidrógeno, catalizada por el ácido fosfotúngstico en un sistema de dos fases diesel-etanol.
- 6.- Establecer un sistema de remoción de los compuestos azufrados oxidados, por medio de una extracción líquido-líquido del diesel utilizando etanol como solvente.
- 7.- Determinación de la eficiencia de remoción del azufre en el diesel y comparar ésta con el proceso de extracción sin reacción.

**CAPITULO IV**  
**MATERIALES Y MÉTODOS**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Enzima lacasa**

La enzima utilizada fue obtenida de Novo Nordisk , la cual fue separada por precipitación con acetona fría a partir de la preparación comercial llamada DeniLite II S que contiene la enzima lacasa de *Myceliophthora termophila*, clonada en *Aspergillus oryzae* (EC 1.10.3.2) realizado por Berka et al., 1997.

### **4.2 Separación de la enzima lacasa de DeniLite II S mediante precipitación con acetona fría**

Se disolvió la preparación comercial DeniLite II S (1g/10 mL) en agua destilada, posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm a temperatura ambiente durante 30 min. Se decantó y el sobrenadante se pasó por membrana de 0.45 µm. El filtrado se colocó en un baño de hielo con cloruro de sodio. Posteriormente se agregó, poco a poco y con agitación constante, la acetona previamente enfriada a -80°C en el ultracongelador, hasta alcanzar, un 85% en volumen de acetona, concentración a la cual precipita casi la totalidad de la proteína de la enzima lacasa. Se centrifugó a 10,000 rpm a una temperatura de -10°C por 20 min. El precipitado se lavó con acetona fría. Se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm a -10°C por 20 min. Se recuperó el precipitado y se evaporó el excedente de acetona.

### **4.3 Determinación de proteína**

A 800 µL de extracto enzimático en solución de amortiguador de acetatos 0.1 M pH 5, se le añadieron 200 µL de reactivo de Bradford (Bio-RAD). Se agitó vigorosamente con un aparato vortex. Se dejó proceder la reacción por 5 minutos y posteriormente se leyó la absorbancia a 595 nm en una celdilla de acrílico mediante un espectrofotómetro (DU 640 Beckman). La cantidad de proteína se calculó con base en una curva patrón utilizando seroalbúmina bovina en solución de 0.15 M de NaCl a concentraciones de 2, 4, 6, 8 y 12 µg/mL. (Bradford, 1976).

#### **4.4 Determinación de actividad**

La actividad se determinó con ABTS (Sigma) midiendo el incremento de absorbancia a 420 nm ( $\epsilon_{420} = 36,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) en una mezcla de reacción conteniendo 0.5 mM de ABTS y aproximadamente 0.01 U enzima en 0.1 M de amortiguador de acetatos pH 5 (Bourbonnais *et al.*, 1997). Una unidad de enzima se define como la cantidad de enzima para oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de ABTS en un minuto.

#### **4.5 Parámetros cinéticos de Michaelis-Menten**

La cinética de la enzima lacasa fue seguida espectrofotométricamente utilizando 0 a 6 mM de ABTS como sustrato a 40 °C en 0.1 M de amortiguador de acetatos pH 5. Las constantes cinéticas fueron calculadas a partir de ajustar los datos experimentales al modelo cinético de Michaelis-Menten por la técnica no-lineal de Newton Raphson (Solver) disponible en la hoja de cálculo de Excel (Microsoft).

#### **4.6 Oxidación del DBT con la enzima lacasa y ABTS**

La mezcla de reacción contenía 25  $\mu\text{M}$  DBT y 1.5 mM de ABTS en 0.1M de amortiguador de acetatos (pH 5) con 15% de acetonitrilo y 2.4 U/mL de enzima lacasa (269.23  $\mu\text{g}$  proteína/mL  $\approx$  3.4  $\mu\text{M}$ ). El volumen final fue ajustado a 6 mL. Las reacciones se llevaron a cabo en botellas serológicas herméticamente selladas, a 40°C con agitación constante a 200 rpm. El espacio de cabeza en las botellas fue evacuado con nitrógeno para desplazar el aire, y se adicionaron volúmenes conocidos de oxígeno puro, a la presión atmosférica local ( $p = 582 \text{ mm Hg}$ ). Las reacciones empezaron al adicionar la enzima, inyectada mediante una jeringa de vidrio a través del tapón de caucho previamente cubierto con teflón y fueron detenidas al adicionar un volumen igual de acetonitrilo al volumen de la mezcla de reacción. Los controles con enzima inactivada por calor (20 min a 121°C y 15 lb/in<sup>2</sup>) no exhibieron actividad. Se permitió que el acetonitrilo extrajera los productos durante 12 h y después se separó esta fase, se centrifugó (14,000 rpm, 15 min) y se analizaron 20  $\mu\text{L}$  de muestra por HPLC (SPTermo separation con dos bombas, una de 3200 y otra de 3500 y una unidad SpectroMonitor 4100, con un flujo de 1.5 mL/min de acetonitrilo-agua, 60:40

(v/v),  $\lambda = 254$  nm,  $T = 40^\circ\text{C}$ ) usando una columna  $\text{C}_{18}$  de fase reversa (BONDCLONE 00H-2117-CO) comprada de Phenomenex, México.

#### **4.7 Inmovilización de la enzima lacasa sobre perlas de alginato**

##### **4.7.1 Alginato-sílice gel**

El soporte de perlas de alginato se preparó disolviendo 1g de ácido algínico (Sigma) en forma de sal sódica en 50 mL de agua destilada a  $50^\circ\text{C}$ . La adición del ácido algínico se realizó poco a poco para evitar la formación de grumos. Por separado se preparó una solución de sílice gel (2g/50 mL). Se mezclaron ambas soluciones. Se dejó reposar la mezcla para eliminar las burbujas de aire; la gelificación se llevó a cabo al dejar gotear, mediante una bomba peristáltica, la solución de ácido algínico sobre una solución de  $\text{CaCl}_2$  (100 mL), manteniendo una agitación suave. Después de 1 h, se lavaron con agua destilada, se secaron a  $50^\circ\text{C}$  durante 12 h. Posteriormente, el soporte se trató con una solución de glutaraldehído 3.5% (2 g de soporte/50 mL) durante una hora a temperatura ambiente. Se lavó con agua destilada para eliminar el exceso de glutaraldehído, el soporte se secó a  $50^\circ\text{C}$  durante 12 h. A 10 mL de extracto enzimático (1mg proteína/mL) se le adicionó 0.5 g de polivinilpirrolidona. Esta mezcla se hizo reaccionar con 2 g de soporte activado. Se dejó reaccionar durante 1 h, se separó el soporte y se lavó con agua destilada, se secó a  $25^\circ\text{C}$  (S. V. Ramakrishna comunicación personal, 2002).

##### **4.7.2 Alginato-bentonita**

Se realizó de manera similar a la inmovilización sobre alginato-sílice gel con la variante de disolver 1g de alginato en 75 mL de agua y 4g bentonita en 75 mL (S. V. Ramakrishna comunicación personal, 2002).

##### **4.7.3 Alginato-carbón activado**

Se realizó de manera similar a la inmovilización sobre alginato-sílice gel con la variante de disolver 2g de carbón activado en 100 mL de agua destilada en lugar de la sílice-gel (S. V. Ramakrishna comunicación personal, 2002).

#### **4.8 Inmovilización sobre sílice gel**

El soporte de sílice gel fue preparado como sigue: se preparó una mezcla con volúmenes iguales (70 mL) de etanol (J. T. Baker), agua destilada y tetraetil ortosilicato (Aldrich Chemical Co.) con agitación suave mediante un agitador magnético. Para homogenizar el sistema de reacción, se agregó ácido clorhídrico concentrado Fluka (11.97 M) gota a gota hasta que la solución fue completamente homogénea y transparente. Una vez obtenida una sola fase, se dejó secar a temperatura ambiente durante 5 días hasta que gelificó. Obteniéndose, aproximadamente, 1 g de sílice gel por cada 7.3 mL de tetraetil ortosilicato. Posteriormente se realizó la reducción de tamaño de la sílice gel a partículas de aproximadamente 3 mm (o del tamaño de partícula deseado) para aumentar el área superficial. La sílice gel obtenida fue tratada con NaOH (10g de sílice gel/50 mL de 1M de NaOH) durante 1 h a 25°C, se decantó y lavó con agua destilada. Posteriormente se trató con HNO<sub>3</sub> (10g de sílice gel/50 mL de 1M de HNO<sub>3</sub>). Este tratamiento alcalino hizo posible producir al menos 5 veces más grupos hidroxilo en la forma SiONa y al reaccionar con HNO<sub>3</sub> se desplaza el metal Na, restaurando el grupo hidroxilo (Ho y Liao 1983). La activación del soporte se logró al hacer reaccionar 10 g de sílice gel (después del tratamiento con álcali y ácido) con 10 mL de una solución al 50% (v/v) de 3-aminopropiltrióxido de silano (Aldrich Chemical Co.) en etanol durante un periodo de tres horas. Posteriormente se separó la sílice gel por decantación y se lavó con agua destilada. Mediante este tratamiento se incorporan grupos amino a la superficie del soporte de sílice gel. El soporte se hizo reaccionar con una solución de glutaraldehído (Electron Microscopy Science, vacuum distillation grade) al 10% (10 g de soporte/20 mL) durante 3 h. Se enjuagó con agua destilada para eliminar el glutaraldehído excedente. La sílice gel adquirió un color naranja debido a la formación de base de Schiff entre los grupos amino del soporte y los grupos aldehído del glutaraldehído. Se hacen reaccionar 10 g del soporte con 25 mL de una disolución de enzima lacasa (0.5 mg de proteína/mL) en 0.1 M de amortiguador de acetatos pH 5 durante 3h. La unión covalente ocurrió entre los grupos amino de la superficie de la enzima con los grupos aldehído del soporte activado formando una base de Schiff. Se separó el soporte con la enzima inmovilizada y se lavó con agua destilada varias veces, hasta que el agua de lavado no presentó actividad enzimática en presencia de ABTS.

#### **4.9 Oxidación del ABTS por la enzima lacasa inmovilizada.**

La enzima inmovilizada sobre sílice gel fue suspendida en 5 mM de ABTS (1g/100 mL). La producción de ABTS<sup>+</sup> fue medida espectrofotométricamente ( $\lambda=420$  nm).

#### **4.10 Oxidación de siringaldazina por el ABTS oxidado en sistema abierto**

La extensión final de esta reacción fue medida espectrofotométricamente (en el rango de  $200 < \lambda < 10,000$  nm) utilizando ABTS oxidado a diferentes concentraciones entre el intervalo de 3.35 a 6.5  $\mu$ M. Similarmente, la concentración de siringaldazina se varió entre 2 y 12.5  $\mu$ M.

#### ***4.11 Oxidación de siringaldazina por ABTS oxidado en condiciones anóxicas***

Los reactivos fueron colocados en botellas serológicas separadas. El aire fue desplazado por burbujeo de N<sub>2</sub> durante 10 min a 10 psi. La reacción se efectuó al mezclar 30 mL de 45  $\mu$ M de ABTS oxidado con 2.7 mL de 0.5 mM de siringaldazina adicionada con una jeringa de una botella a otra. En los controles negativos uno de los reactivos fue sustituido por agua destilada.

#### ***4.12 Determinación del coeficiente de distribución del DBT en los sistemas hexano-fase polar***

La determinación del coeficiente de distribución del DBT en los sistemas hexano-fase polar, se realizó en frascos serológicos sellados herméticamente con tapones recubiertos con teflón, se colocaron 4 mL de hexano con una concentración de 10.91 mM de DBT y 4 mL de la fase polar formada por agua y disolvente, donde el disolvente fue etanol o acetonitrilo, en un intervalo de concentraciones de 0-40% (v/v) respecto a la fase polar, se tapó y se mantuvo por 1 h a la temperatura a la cual se determinaron los valores del coeficiente de distribución (40 y 50°C), sin agitar, permitiendo alcanzar el equilibrio. El coeficiente de distribución se pudo determinar cuantificando la concentración del DBT en la fase polar mediante HPLC.

#### **4.13 Distribución del DBT en un sistema de dos fases: hexano-etanol o hexano-acetonitrilo**

Se determinó la distribución del DBT en un sistema de dos fases (hexano/acetonitrilo o hexano/etanol). El acetonitrilo no se mezcla con el hexano, mientras que el etanol absoluto es completamente miscible con el hexano. Sin embargo, se pueden formar dos fases en el sistema hexano-etanol si un pequeño volumen de agua es adicionado. La distribución de 10 mM de DBT entre las fases de hexano y acetonitrilo-agua o etanol-agua fue estimada por medio de la medición de la concentración del DBT en las dos fases. La concentración del DBT fue medida por HPLC usando una curva de calibración estándar. El sistema de dos fases consistió de DBT (10mM) en 10 mL de hexano, 2.4 mL de disolvente polar (etanol o acetonitrilo) y 0.5 mL de agua.

#### **4.14 Determinaciones analíticas de azufre**

El dibenzotiofeno y su correspondiente sulfona fueron obtenidos de Aldrich Chemical Co. Las muestras fueron analizadas por HPLC, usando la columna descrita arriba, bajo condiciones isocráticas de elución con mezclas de acetonitrilo-agua, 60:40 (v/v), el flujo fue 1.5 mL, 40°C y el compuesto fue monitoreado por absorbancia,  $\lambda = 254$  nm (Pickard *et al.*, 1999).

El contenido de azufre en el diesel fue medido por dos métodos: Fluorescencia de rayos X en fase líquida utilizando un analizador de azufre Horiba SLFA – 1100H, y por cromatografía de gases (CG) con un detector fotométrico de flama específico a azufre (FPD) teniendo una columna SPB-20 de 30 m x 0.25 cm (Supelco). El programa de cromatografía de gases empezó a 100°C por 2 min y la temperatura se incrementó a 290°C a 8°C/min, y se mantuvo por 10 min (Dr. Vázquez-Duhalt comunicación personal, 2002).

#### **4.15 Oxidación del DBT con peróxido de hidrógeno y ácido fosfotúngstico en una mezcla hexano/disolvente polar**

La mezcla de reacción consistió de 10 mM de DBT disuelto en 50 mL de hexano y 12 mL de etanol en botellas serológicas de 120 mL. En estos experimentos se utilizaron 39  $\mu$ M de ácido fosfotúngstico como catalizador (Yazu *et al.*, 2001) y con diferentes cantidades de

solución de peróxido de hidrógeno al 30% (Baker). Las reacciones fueron terminadas al adicionar 2 mL de agua y separar la mezcla de reacción en dos fases, ya que, tanto el ácido fosfotúngstico como el peróxido de hidrógeno no son solubles en hexano. Cuando se utilizó acetonitrilo en lugar de etanol, 50 mL de acetonitrilo fueron adicionados a 50 mL de hexano para formar un sistema de dos fases. El DBT contenido en ambas fases fue estimado por HPLC bajo las condiciones descritas arriba.

#### ***4.16 Desulfuración del diesel por oxidación con peróxido de hidrógeno***

Las condiciones de reacción fueron 60°C por 3 h con agitación vigorosa y constante. Antes de analizar el contenido de azufre, la mezcla de reacción fue centrifugada (5,000 rpm, 5 min) para separar la fase de diesel antes de ser deshidratada con cloruro de calcio anhidro (1g/10 mL). Una centrifugación final (5,000 rpm, 5 min) produjo una muestra de diesel anhidra y entonces el contenido de azufre fue analizado como se indica en las determinaciones analíticas.

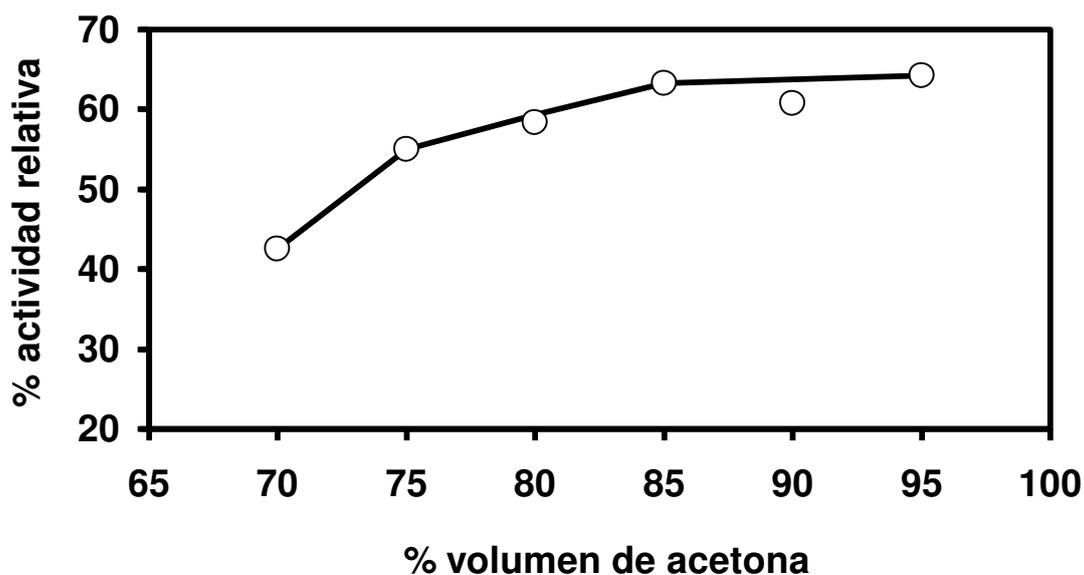
# **CAPITULO V**

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 5.1 Separación y concentración de la enzima lacasa

Se separó y concentró la enzima lacasa de *Myceliophthora termophila*, clonada en *Aspergillus oryzae* (EC 1.10.3.2) a partir del polvo comercial llamado DeniLite II S proporcionado por Novo Nordisk, mediante el método indicado en la sección anterior. La enzima mostró las siguientes propiedades:  $PM = 80$  kDa (determinado por electroforesis en poliacrilamida),  $k_{cat} = 713 \text{ min}^{-1}$  (con ABTS),  $K_M = 0.2 \text{ mM}$ , (a  $40^\circ\text{C}$ , usando ABTS como sustrato) y una temperatura óptima cercana a  $75^\circ\text{C}$  (dato no publicado de J. I. López., 2002 estudiante de doctorado del laboratorio del Dr. Viniegra). Estas propiedades están en el orden de magnitud a las reportadas por Li *et al.*, (1999) para la enzima de *Myceliophthora termophila*. En la figura 5.1 se muestra el efecto de la concentración en % volumen de acetona utilizada para la precipitación de la enzima, sobre la actividad relativa remanente medida a  $25^\circ\text{C}$  del precipitado de proteína recuperado y disuelto en amortiguador de acetatos  $0.1 \text{ M}$  pH 5 para dar un volumen igual al del extracto crudo original. Se puede observar, que por arriba de  $85 \%$  (v/v) de acetona, la actividad relativa sigue un comportamiento asintótico. Lo cual indica que a esta concentración de acetona o mayor se recupera la mayoría de la proteína del extracto crudo.



**Figura 5.1.-** Efecto de la concentración % (v/v) de acetona utilizada para precipitar la proteína sobre la actividad relativa remanente de la enzima lacasa recuperada y disuelta en un volumen igual al del extracto crudo.

La actividad relativa máxima recuperada fue 63%, sin embargo la recuperación de proteína a concentraciones de acetona por arriba de 85% (v/v) fue de 95.15%. Se disolvió el sólido libre de acetona en 0.1 M de amortiguador de acetatos pH 5. Mediante esta metodología se recuperó el 95.15% de la proteína sin notable pérdida de la actividad.

La diferencia del 37 % de pérdida de la actividad puede atribuirse al hecho de que en el extracto crudo está el mediador ácido fenotiazin 10 propiónico presente en el DeniLite II S (Soares et al., 2001). El cual puede aumentar la velocidad de oxidación del ABTS durante la determinación de la actividad, teniendo un efecto sinérgico sobre la oxidación del ABTS. Este mediador no está presente en la enzima separada por precipitación con acetona fría, por lo tanto, la actividad relativa resulta menor. Esta diferencia en actividad relativa se debe entonces a la presencia del mediador en el extracto crudo y no a la pérdida de actividad por desnaturalización.

### **5.2 Determinación de los parámetros cinéticos de la enzima lacasa**

#### **5.2.1 Parámetros cinéticos con ABTS como sustrato**

Para determinar los parámetros cinéticos de la enzima lacasa parcialmente purificada, se utilizó el ABTS como sustrato a 40°C en mezclas de reacción constituidas por diferentes concentraciones de ABTS (0 - 6 mM) en 0.1 M de amortiguador de acetatos pH 5, determinando el incremento de absorbancia a 420 nm. ( $\epsilon=36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para el ABTS oxidado). Los datos se ajustaron al modelo cinético tipo Michaelis-Menten, como se muestra en la figura 5.2. Los círculos vacíos corresponden a los datos experimentales y la línea continua corresponde al ajuste de los datos al modelo, las barras verticales muestran la desviación estándar de las determinaciones por triplicado.

El peso molecular de la enzima lacasa fue de 80 kDa (determinado por electroforesis en poliacrilamida). En la Tabla 5.1 se muestra que el valor del  $K_M$  fue de 200  $\mu\text{M}$  y la  $k_{cat}$  de 713  $\text{min}^{-1}$ , ambos resultados obtenidos utilizando el ABTS como sustrato. Estos parámetros cinéticos son ligeramente diferentes a los reportados por Li et al. (1999) para la enzima lacasa de *Myceliophthora thermophila* a 20°C.

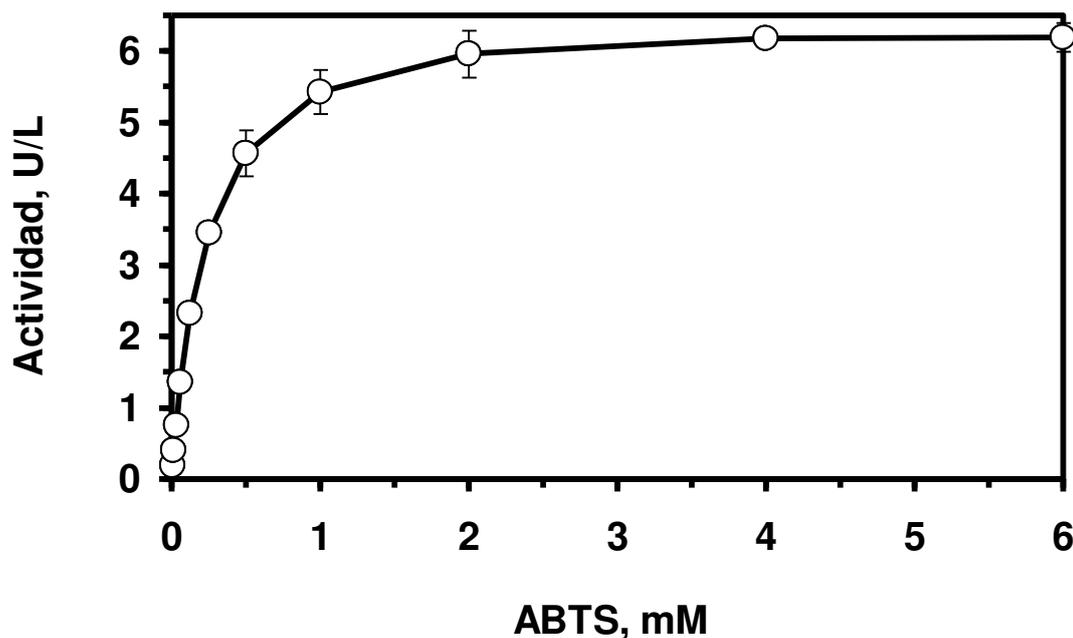


Figura 5.2.- Cinética tipo Michaelis-Menten de la enzima lacasa con el ABTS como sustrato a 40°C.

Tabla 5.1- Comparación de las constantes cinéticas de la lacasa recuperada por precipitación con acetona y las reportadas por Li et al., (1999). (a) Constantes de la enzima recuperada por precipitación por acetona; (b) constantes reportadas por Li et al., (1999).

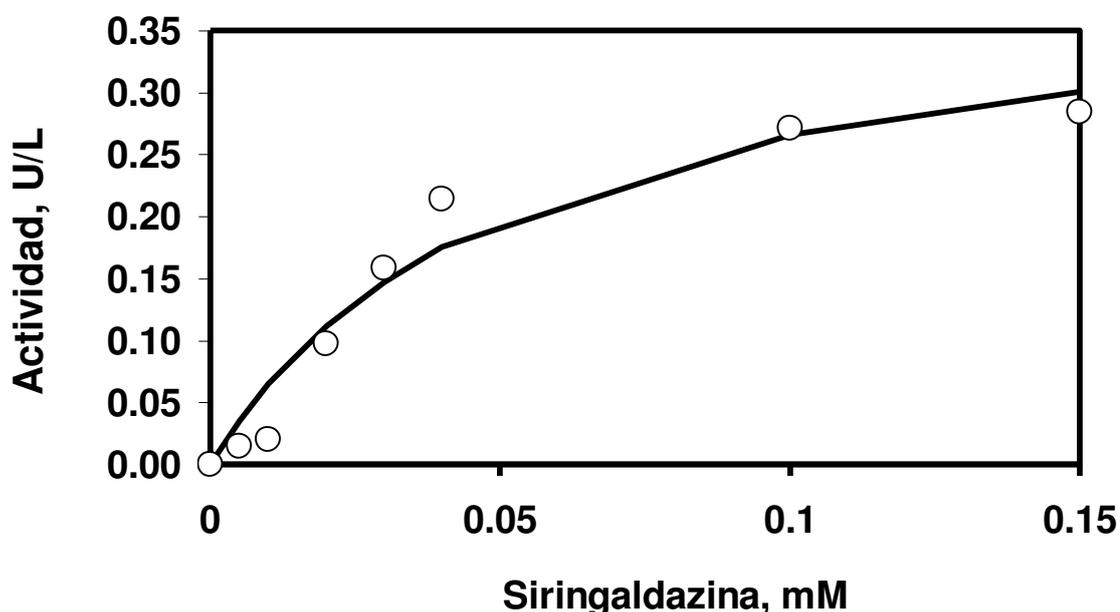
Parámetro	Sustrato			
	ABTS		Siringaldazina	
	(a)	(b)	(a)	(b)
$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	200	$96 \pm 5$	52	$2.9 \pm 0.4$
$k_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	713	$440 \pm 300$	1213	$1100 \pm 250$
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	40	20	30	20

### 5.2.2 Parámetros cinéticos con siringaldazina como sustrato

Se determinaron los parámetros cinéticos de la enzima lacasa, utilizando la siringaldazina como sustrato a 30°C en mezclas de reacción con diferentes concentraciones de siringaldazina (0 - 0.15 mM) en 0.1 M de amortiguador de acetatos pH 5. Para ello, se midió el incremento de absorbancia a 530 nm ( $\epsilon = 65000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para la siringaldazina

oxidada) y se determinaron las velocidades iniciales para cada una de las concentraciones de siringaldazina utilizando la misma concentración de enzima. Los datos se ajustaron al modelo cinético tipo Michaelis-Menten, mediante Solver, como se muestra en la figura 5.3, los círculos vacíos corresponden a los datos experimentales y la línea continua corresponde al ajuste de los datos al modelo.

Los valores de los parámetros cinéticos para la enzima lacasa, utilizando siringaldazina como sustrato a una temperatura de 30°C y pH 5, ajustando los datos experimentales al modelo cinético tipo Michaelis-Menten, se muestran en la Tabla 5.1.



**Figura 5.3.-** Cinética tipo Michaelis-Menten de la enzima lacasa con siringaldazina como sustrato a 30°C.

### ***5.3 Efecto de la concentración de alcoholes y acetonitrilo sobre la actividad de la enzima lacasa***

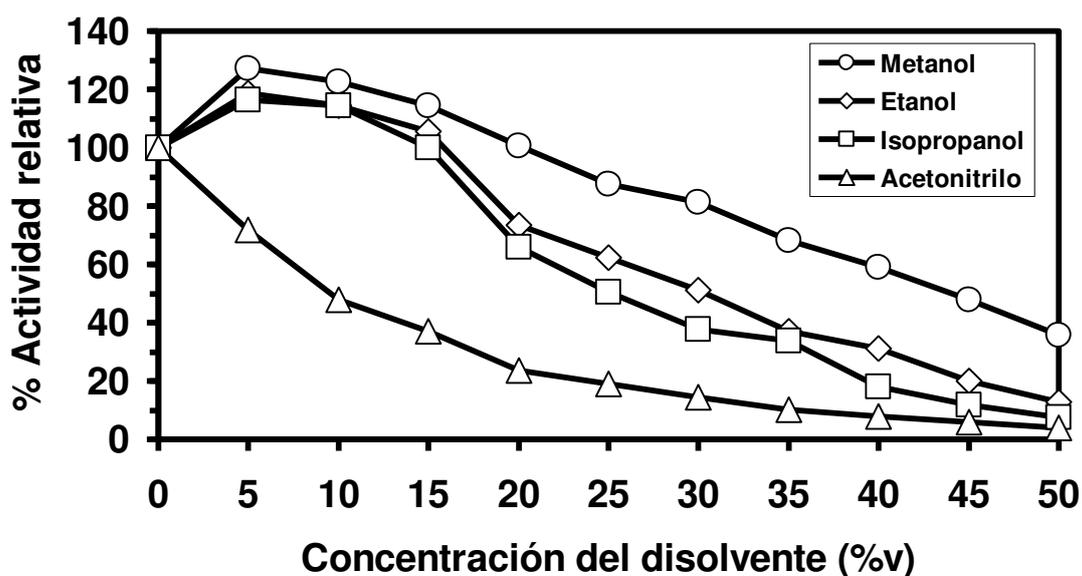
Se evaluó el efecto de la concentración de diferentes alcoholes % (v/v) sobre la actividad de la enzima lacasa y se comparó esta actividad relativa con el efecto de la concentración del acetonitrilo utilizando el ABTS como sustrato. Esto fue con la finalidad de encontrar un disolvente que fuera adecuado para el dibenzotiofeno (DBT), y establecer un sistema de reacción, ya sea de una o dos fases, donde

estuvieran presentes, tanto este compuesto azufrado que es poco soluble en agua, así como la enzima lacasa y el mediador ABTS.

Los alcoholes utilizados fueron metanol, etanol, e isopropanol. Estos alcoholes pueden modificar la distribución del DBT en el sistema de dos fases hexano/fase polar, donde la fase polar está constituida por agua-disolvente, pudiendo ser el disolvente alguno de los alcoholes o el acetonitrilo.

En la figura 5.4 se puede observar que la actividad relativa aumenta cuando la concentración de metanol, etanol e isopropanol está entre 5 y 15% (v/v), dando la máxima actividad relativa para los tres alcoholes a 5%, con un incremento de 27, 18.6, 16.4 % para el metanol, etanol e isopropanol respectivamente respecto a la actividad sin disolvente. A 20 % (v/v) la actividad relativa es prácticamente igual a la actividad sin la presencia de disolvente para el metanol y un 73 y 66 % para el etanol e isopropanol.

Al aumentar la concentración del acetonitrilo la actividad relativa disminuye drásticamente, con tan solo 15 % (v/v) de acetonitrilo la actividad relativa disminuye de 100 a un 37%.



**Figura 5.4.-** Efecto de la concentración de los alcoholes metanol, etanol, isopropanol y del acetonitrilo sobre la actividad enzimática de la lacasa.

Es importante mencionar que este efecto depende del tipo de lacasa, ya que para el caso de la lacasa de *Corioloopsis gallica* utilizada por Pickard *et al.* (1999) presenta menor inhibición para el acetonitrilo que la lacasa de Novo Nordisk, pues con una concentración de 15 % (v/v) de este disolvente, su actividad relativa es de aproximadamente 90 %.

#### **5.4 Distribución del DBT en hexano/fase polar**

El Coeficiente de partición **P** se define como la relación de equilibrio de la concentración de una sustancia disuelta en un sistema de dos fases formada por los disolventes inmiscibles n-octanol y agua.

$$\mathbf{P} = [\text{solute}]_{\text{n-octanol}} / [\text{solute}]_{\text{agua}} \quad (1)$$

Donde:

**P** = Coeficiente de partición.

$[\text{solute}]_{\text{n-octanol}}$  = Concentración molar del soluto en la fase de n-octanol.

$[\text{solute}]_{\text{agua}}$  = Concentración molar del soluto en la fase de agua.

El coeficiente de partición es el cociente de dos concentraciones, por lo tanto es adimensional y generalmente se expresa en la forma de logaritmo base 10 (**Log P**).

Para el hexano, el valor de **Log P** es de 3.5, para el acetonitrilo es de -0.33, para el etanol -0.24 (Laane et al., 1987) y para el dibenzotiofeno es de 4.49 (Van Mouwerik, *et al.* 1997).

Llamamos coeficiente de distribución **D** para el sistema hexano-fase polar, para diferenciarlo del coeficiente de partición **P**, ya que este último, se utiliza generalmente para el sistema n-octanol/agua. **D** se define como el coeficiente de distribución del DBT en el sistema hexano/fase polar, en el cual la fase polar está constituida por agua y otro disolvente miscible con agua como el acetonitrilo o alcoholes. Por lo tanto, el coeficiente de distribución **D**, es la relación de cómo se distribuye la concentración del DBT en un sistema de dos fases formado por tres disolventes de los cuales dos son totalmente miscibles (por ejemplo agua-acetonitrilo) y un tercero poco miscible respecto a los otros dos (hexano).

$$\mathbf{D} = [\text{DBT}]_{\text{hexano}} / [\text{DBT}]_{\text{fase polar}} \quad (2)$$

Donde:

**D** = Coeficiente de distribución.

$[DBT]_{\text{hexano}}$  = Concentración molar de DBT en la fase hexano.

$[DBT]_{\text{fase polar}}$  = Concentración molar de DBT en la fase polar.

El coeficiente de distribución **D** se determinó cuantificando la concentración del DBT en la fase polar mediante HPLC. Para establecer el equilibrio entre las dos fases, como es descrito en Materiales y Métodos, se colocaron 4 mL de hexano con una concentración de 10.91 mM de DBT y 4 mL de fase polar formada por agua disolvente, donde el disolvente fue etanol o acetonitrilo, en un intervalo de concentraciones de 0-40 % (v/v) respecto a la fase polar, se tapó y se mantuvo a la temperatura a la cual se determinó el valor **D**. Las temperaturas a las que se determinó **D** fueron 40 y 50°C tanto para el acetonitrilo como para el etanol.

En la figura 5.5 se puede observar que el valor de **Log D** para el DBT en hexano/agua a 40°C es de 4.285 y en la figura 5.6 se puede observar que el valor de **Log D** para el DBT en hexano/agua a 50°C es de 4.06 respectivamente indicando que al aumentar la temperatura, el DBT, que es más soluble en hexano que en agua, modifica su distribución incrementando en un 67 % más la solubilidad del DBT en la fase acuosa.

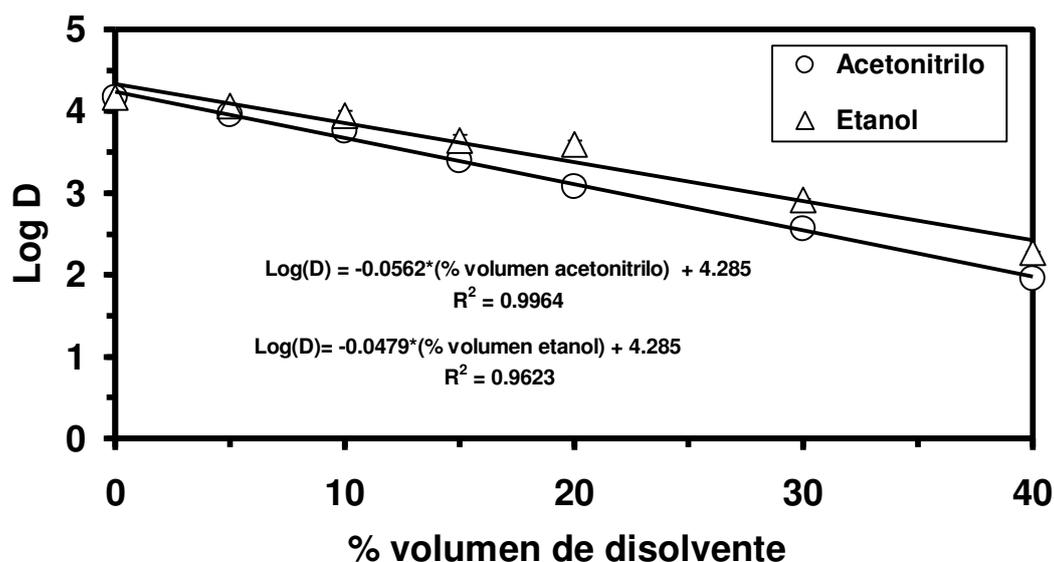


Figura 5.5.- Efecto de la concentración del disolvente acetonitrilo o etanol %(v/v) sobre el valor de Log D a 40°C

Esto se puede ver más claramente al determinar la concentración de DBT en la fase polar al hacer simultáneas la ecuación (2) donde la fase polar es únicamente agua con la ecuación de balance de moles de DBT en el sistema de dos fases.

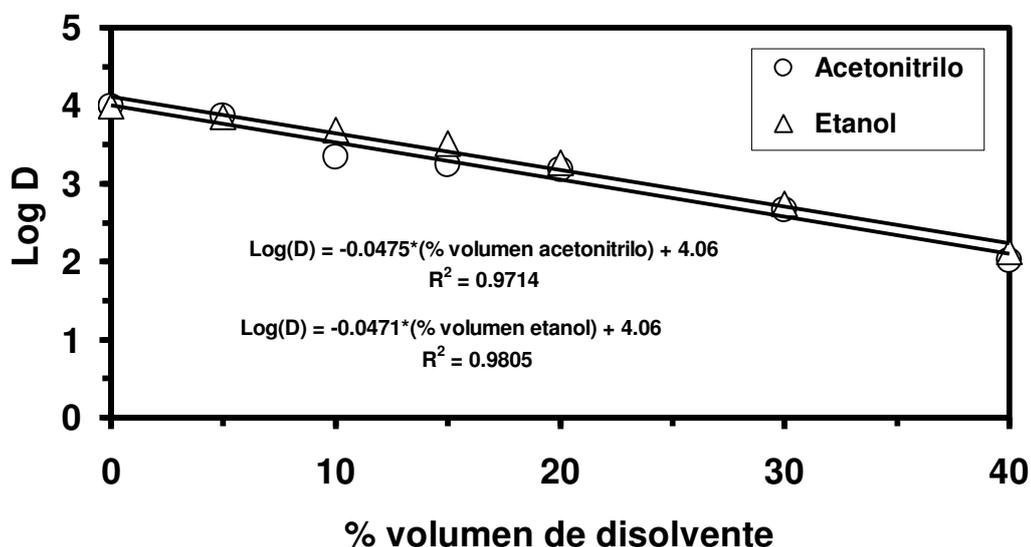
$$Q_{T(DBT)} = [DBT]_T V_T \quad (3)$$

Donde:

$Q_{T(DBT)}$  = Moles totales de DBT.

$[DBT]_T$  = Concentración molar total de DBT en las dos fases.

$V_T$  = Volumen total de las dos fases en L.



**Figura 5.6.-** Efecto de la concentración del disolvente acetónitrilo o etanol %*(v/v)* sobre el valor de Log D a 50°C

Además,  $Q_{T(DBT)}$  se puede expresar como:

$$Q_{T(DBT)} = [DBT]_{\text{hexano}} * V_{\text{hexano}} + [DBT]_{\text{fase polar}} * V_{\text{fase polar}} \quad (4)$$

Donde:

$[DBT]_{\text{hexano}}$  = Concentración molar de DBT en la fase de hexano.

$V_{\text{hexano}}$  = Volumen de la fase de hexano en L.

$[DBT]_{\text{fase polar}}$  = Concentración molar de DBT en la fase polar.

$V_{\text{fase polar}}$  = Volumen de la fase polar en L.

Despejando la  $[\text{DBT}]_{\text{hexano}}$  de la ecuación (2) y el valor de  $Q_{\text{T(DBT)}}$  de la ecuación (3), sustituyendo ambas equivalencias en la ecuación (4) y finalmente despejando el término  $[\text{DBT}]_{\text{fase polar}}$  tenemos:

$$[\text{DBT}]_{\text{fase polar}} = [\text{DBT}]_{\text{T}} V_{\text{T}} / (DV_{\text{hexano}} + V_{\text{fase polar}}) \quad (5)$$

Donde:

$[\text{DBT}]_{\text{T}}$  = Concentración molar total de DBT en las dos fases.

Definiendo:

$$V_{\text{fase polar}} / V_{\text{T}} = x \quad (6)$$

Donde:

$x$  = Fracción en volumen de la fase polar.

Por lo tanto:

$$V_{\text{hexano}} / V_{\text{T}} = (1-x) \quad (7)$$

Despejando  $V_{\text{fase polar}}$  de la ecuación (6) y  $V_{\text{hexano}}$  de la ecuación (7) y sustituyendo en la ecuación (5) obtenemos:

$$[\text{DBT}]_{\text{fase polar}} = [\text{DBT}]_{\text{T}} / (D(1-x) + x) \quad (8)$$

Utilizando la ecuación (8) podemos calcular cual es la concentración de DBT en la fase polar (para el caso particular donde esta fase es exclusivamente agua) a 40 y 50 °C, las concentraciones de DBT en esta fase es de 0.57 y 0.95  $\mu\text{M}$  respectivamente, al incrementar la temperatura 10°C el aumento en la concentración del DBT en la fase polar en 67%.

La ecuación (8) además se puede aplicar para el caso en el cual la fase polar no sea exclusivamente agua, tal como mezclas agua-acetonitrilo o agua-etanol. Por ejemplo a

40°C, cuando la concentración de disolvente fue de 15 % (v/v) para el acetonitrilo o etanol, el Log **D** es de 3.40 y 3.64 respectivamente y la concentración de DBT en la fase polar agua-acetonitrilo es de 4.3 µM y la de agua-etanol es de 2.5 µM, dando un incremento de 72% más DBT el acetonitrilo respecto al etanol en la mezcla con el agua. Cuando la temperatura es de 50°C, para la misma concentración de 15% de disolvente, el Log **D** para el acetonitrilo y el etanol es de 3.24 y 3.51 respectivamente y la concentración de DBT en la fase polar agua-acetonitrilo es de 6.27 µM y la de agua-etanol es de 3.37 µM, dando un incremento de 86% más DBT el acetonitrilo respecto al etanol en la mezcla con el agua. Sin embargo, aunque podemos concluir que en el sistema hexano/(agua-acetonitrilo) la distribución del DBT hacia la fase polar es más favorable que para el sistema hexano/(agua-etanol), es importante observar que al aumentar la temperatura de 40 a 50°C la distribución del DBT en la fase polar del sistema hexano/(agua-etanol) se incrementa 35%.

Conociendo los coeficientes de distribución a una temperatura dada y cuando el volumen de la fase orgánica (hexano) sea igual o mayor a la fase polar,  $V_{\text{hexano}} \geq V_{\text{fase polar}}$ , se puede utilizar la ecuación (8), obteniéndose valores de distribución aproximados, dada la menor solubilidad del DBT en la fase polar respecto al hexano. Por ejemplo, para un volumen de 10 mL de hexano, con una concentración de 10 mM de DBT, al ponerse en contacto con 2 mL de una fase polar agua-etanol con el 15% de etanol (v/v) a 40°C, aplicando la ecuación (8), la concentración de DBT en la fase polar es de 2.29 µM.

De igual manera, como se puede observar en la figura 5.6, la pendiente al graficar Log **D** vs % en volumen de disolvente, acetonitrilo o etanol, es de -0.0562 y -0.0479 respectivamente. Una pendiente mayor en valor absoluto indica que Log **D** es menor y por lo tanto la distribución de DBT en la fase polar se incrementa.

### ***5.5 Reacción de oxidación del DBT con la enzima lacasa en un sistema de dos fases hexano/fase polar***

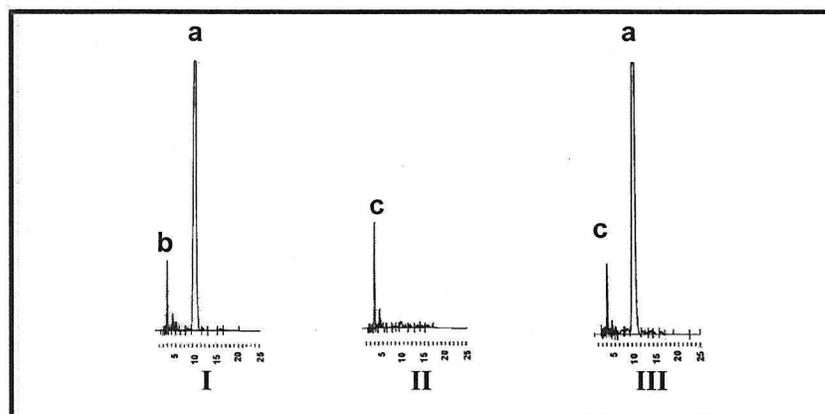
Se realizó la oxidación del DBT a 40 °C en un sistema de reacción de dos fases, la fase orgánica estuvo constituida por 10 mM de DBT disuelto en 10 mL de hexano, la fase polar

estuvo constituida por 0.1 M de amortiguador de acetatos pH 5, 1.5 mM de ABTS, con o sin 15 % v/v de acetonitrilo en un volumen final de 2 mL.

La finalidad de utilizar el acetonitrilo fue para mejorar la distribución del DBT hacia la fase polar. Sin embargo, la actividad de la enzima libre por la presencia de este disolvente disminuye a un 37 %. En una serie de experimentos se utilizó enzima lacasa inmovilizada en perlas de alginato (0.15 g) con una actividad de 1.16 U/g de soporte. En otra serie se utilizó enzima libre (en una concentración de 4U/mL en base al volumen de la fase polar).

### **5.5.1 Reacción en un sistema de dos fases hexano/fase polar con enzima libre**

En la figura 5.7 se muestran los perfiles de cromatografía líquida HPLC de la fase orgánica de los experimentos de oxidación del DBT con la enzima lacasa y el mediador ABTS en un sistema de dos fases hexano-agua utilizando enzima libre. El perfil I corresponde al control negativo con enzima inactiva, el perfil II al control negativo sin DBT y el perfil III corresponde a la reacción.

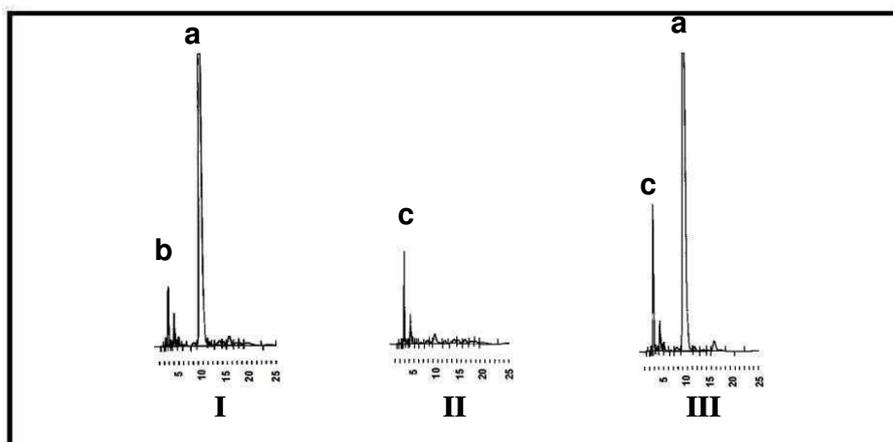


**Figura 5.7.-** Perfiles de HPLC de la fase hexano de la reacción de oxidación del DBT con la enzima lacasa en un sistema de dos fases hexano-agua utilizando enzima libre. I: control negativo con enzima inactiva, II: Control negativo sin DBT, III: Reacción. Los picos identificados corresponden a: DBT (a), ABTS (b) y ABTS oxidado/ABTS (c).

El área del pico de DBT (a) en el control con enzima inactiva fue 1556884 y en la mezcla de reacción después de 72 h fue 1534617, la diferencia de 22267 es menor al valor de la desviación estándar de las replicas ( $\pm 51468$ ), lo que indica que no existe una diferencia significativa en la concentración del DBT después de la reacción, ni se generó ningún pico

nuevo que indique la presencia de productos de oxidación del DBT, esto quizá se debió a que el DBT no se distribuyó adecuadamente en la fase polar para que pudiera reaccionar ( $0.518 \mu\text{M}$ ) y que la concentración de oxígeno en estos experimentos no fue lo suficientemente alta (7.1 moles de oxígeno/mol de DBT ó 236.7 moles de oxígeno/mol de ABTS).

En la figura 5.8 se muestran los perfiles de cromatografía líquida HPLC de la fase orgánica de los experimentos de oxidación del DBT con la enzima lacasa y el mediador ABTS en un sistema de dos fases (hexano-agua/acetonitrilo) utilizando enzima libre. El perfil I corresponde al control negativo con enzima inactiva, el perfil II al control negativo sin DBT y el perfil III corresponde a la reacción.

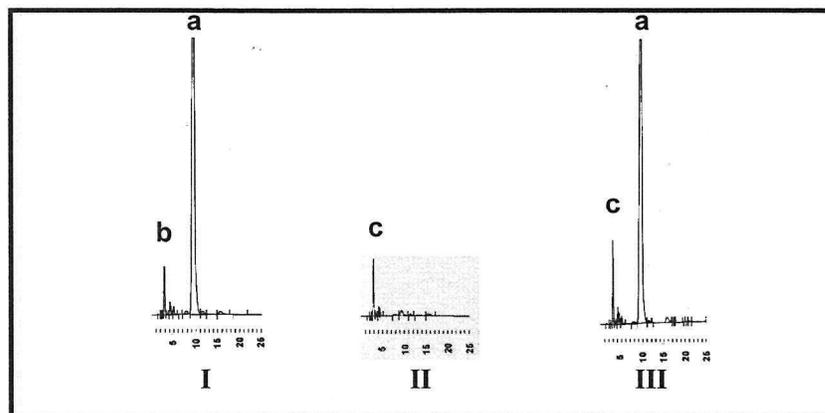


**Figura 5.8.-** Perfiles de HPLC de la fase hexano de la reacción de oxidación del DBT con la enzima lacasa en un sistema de dos fases hexano-agua/acetonitrilo con 15% de este solvente en base al volumen de la fase polar utilizando enzima libre. I: control negativo con enzima inactiva, II: Control negativo sin DBT, III: Reacción. Los picos identificados corresponden a: DBT (a), ABTS (b) y ABTS oxidado/ABTS (c).

El área del pico de DBT (a) en el control con enzima inactiva fue 1535091 y en la mezcla de reacción después de 72 h fue 1496787, la diferencia de 38304 es menor que la desviación estándar de las replicas ( $\pm 51468$ ), lo que indica que no existe una diferencia significativa en la concentración del DBT después de la reacción, ni se generaron picos nuevos. La presencia del acetonitrilo mejoró la distribución del DBT hacia la fase polar ( $3.61 \mu\text{M}$ ), pero disminuyó la actividad de la enzima lacasa sobre el ABTS.

### 5.5.2 Reacción en un sistema de dos fases hexano/fase polar con enzima inmovilizada

En la figura 5.9 se muestran los perfiles de cromatografía líquida HPLC de la fase orgánica de los experimentos de oxidación del DBT con la enzima lacasa y el mediador ABTS en un sistema de dos fases hexano-agua utilizando enzima inmovilizada sobre perlas de alginato. El perfil I corresponde al control negativo con enzima inactiva, el perfil II al control negativo sin DBT y el perfil III corresponde a la reacción. El área del pico de DBT (a) en el control con enzima inactiva fue 1544268 y en la mezcla de reacción después de 72 h fue 1498142, nuevamente, la diferencia 46126 es menor que la desviación estándar de las replicas ( $\pm 51468$ ), lo que indica que no existe una diferencia significativa en la concentración del DBT después de la reacción, ni se generó ningún pico nuevo.

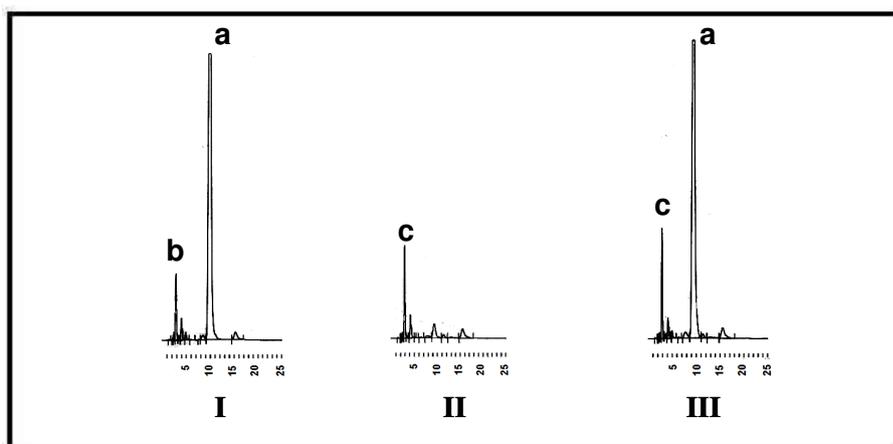


**Figura 5.9.-** Perfiles de HPLC de la fase hexano de la reacción de oxidación del DBT con la enzima lacasa en un sistema de dos fases hexano-agua utilizando enzima inmovilizada sobre perlas de alginato. I: control negativo con enzima inactiva, II: Control negativo sin DBT, III: Reacción. Los picos identificados corresponden a: DBT (a), ABTS (b) y ABTS oxidado/ABTS (c).

En estos experimentos con enzima inmovilizada, la actividad de la enzima sobre el ABTS fue menor respecto a los experimentos con enzima libre, en conjunto con la baja concentración de oxígeno (7.1 moles de oxígeno/mol de DBT) y la poca difusión del DBT hacia la fase polar, pudieron ser las causas de que el DBT no se oxidara.

En la figura 5.10 se muestran los perfiles de cromatografía líquida HPLC de la fase orgánica de los experimentos de oxidación del DBT con la enzima lacasa y el mediador ABTS en un sistema de dos fases (hexano-agua/acetonitrilo) utilizando enzima

inmovilizada sobre perlas de alginato. El perfil I corresponde al control negativo con enzima inactiva, el perfil II al control negativo sin DBT y el perfil III corresponde a la reacción. El área del pico de DBT (**a**) en el control con enzima inactiva fue 1443413 y en la mezcla de reacción después de 72 h fue 1464462, la diferencia 21049 es menor que la desviación estándar de las replicas ( $\pm 51468$ ), lo que indica que no existe una diferencia significativa en la concentración del DBT después de la reacción, ni se generó ningún pico nuevo. La presencia del acetonitrilo mejoró la distribución del DBT hacia la fase polar, pero disminuyó la actividad de la enzima lacasa sobre el ABTS.



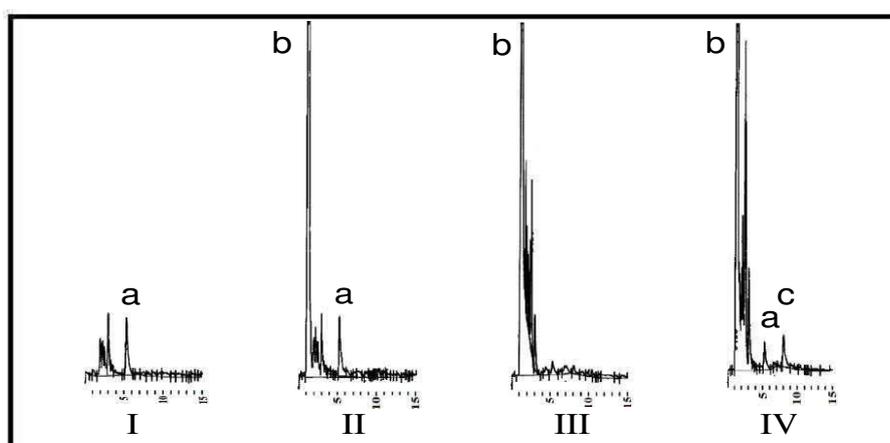
**Figura 5.10.-** Perfiles de HPLC de la fase hexano de la reacción de oxidación del DBT con la enzima lacasa en un sistema de dos fases hexano-agua/acetonitrilo con 15% de este solvente en base al volumen de la fase polar utilizando enzima inmovilizada sobre perlas de alginato. I: control negativo con enzima inactiva, II: Control negativo sin DBT, III: Reacción. Los picos identificados corresponden a: DBT (a), ABTS (b) y ABTS oxidado/ABTS (c).

### **5.6 Oxidación del DBT por el sistema lacasa-ABTS en acetonitrilo-agua**

Debido a los problemas difusionales para que se distribuya el DBT hacia la fase polar en los sistemas de dos fases, además de que el mediador activado y el DBT deben estar en contacto para que la reacción proceda y estos compuestos tienen diferente polaridad, se procedió a realizar sistemas de reacción homogéneos de una sola fase, tomando en consideración las condiciones de reacción utilizadas por Pickard et al. (1999), tales como el uso de 15% de acetonitrilo para lograr disolver 25  $\mu\text{M}$  del DBT y utilizar 1.5 mM del mediador ABTS.

La oxidación del DBT por la enzima lacasa se realizó de acuerdo a la metodología descrita en Materiales y Métodos y fue monitoreado por HPLC. En la figura 5.11 se muestra el perfil de HPLC de la reacción de oxidación del DBT a 40°C con el sistema lacasa-ABTS después de 72 h de reacción (IV) así como de los controles negativos (I; II, y III) en los cuales alguno de los reactivos no estuvo presente.

Estos experimentos se realizaron en frascos serológicos de 120 mL, colocando un volumen de 6 mL de mezcla de reacción y el espacio de cabeza (114 mL) lleno de aire, el cual corresponde a  $7.49 \times 10^{-4}$  moles de oxígeno (4993 mol de  $O_2$ /mol de DBT ó 83 moles de  $O_2$ /mol de ABTS).

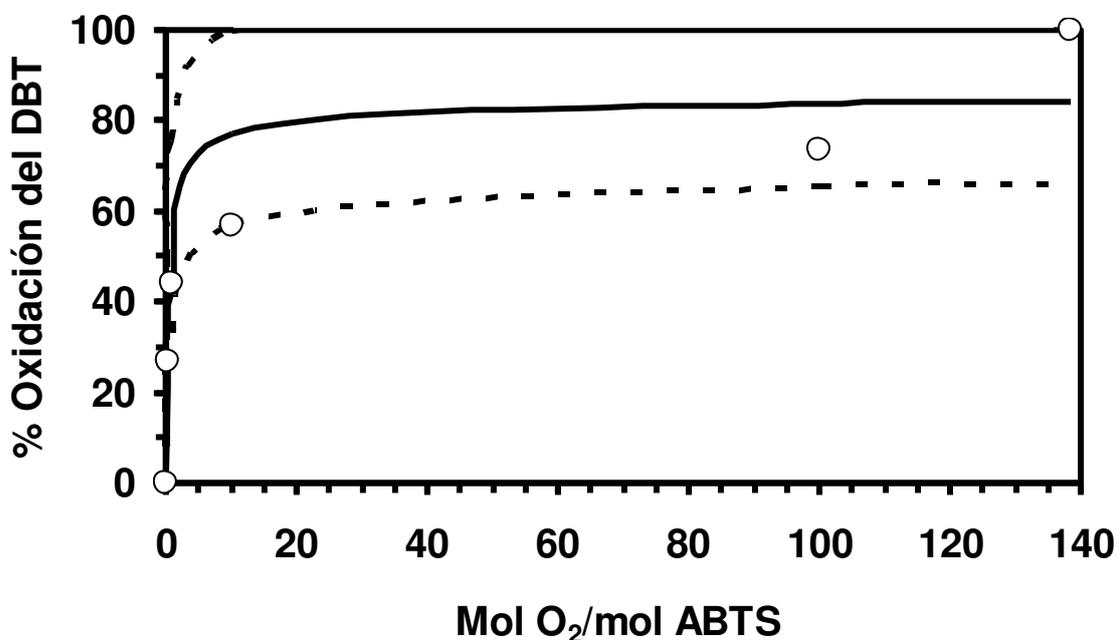


**Figure 5.11** – Perfiles de cromatografía líquida (HPLC) de la reacción de oxidación del DBT con la enzima lacasa y ABTS en presencia de aire, después de 72 h a 40° C. I: control negativo sin ABTS; II: control negativo con enzima inactiva; III: control negativo, mezcla de reacción sin DBT y IV: Reacción con DBT. Los picos identificados corresponden a: DBT (a), ABTS (b) y producto (c).

El control negativo I fue sin ABTS, en el control negativo II fue con enzima inactiva (desnaturalizada por calor, 20 min a 121°C y 15 lb/in<sup>2</sup>), el control negativo III fue sin DBT. Se puede observar que el pico del DBT disminuyó sólo cuando la mezcla de reacción contenía todos los reactantes: DBT, ABTS y enzima lacasa activa. Los controles negativos I y II no mostraron reducción de la concentración del DBT, y el control negativo III, el cual carecía de DBT, no generó ningún pico a tiempos de retención por arriba del tiempo de retención del DBT. Sin embargo, con la mezcla de reacción que contenía todos los reactivos: DBT, enzima activa y ABTS (perfil de HPLC IV), la concentración de 25 µM de DBT disminuyó 45.18% comparado con los controles negativos y un nuevo pico con un tiempo de retención mayor al del DBT fue detectado ( $t_R = 7.98$  min). El producto de la

reacción de oxidación del DBT con la enzima lacasa y el mediador ABTS presentó un tiempo de retención mayor al de DBT, esto puede explicarse debido a que el ABTS al ser oxidado por la lacasa forma radicales libres, los cuales pueden reaccionar con el DBT y favorecer la formación de un polímero, en el cual pueden estar incluidos tanto los productos de oxidación del ABTS como del DBT.

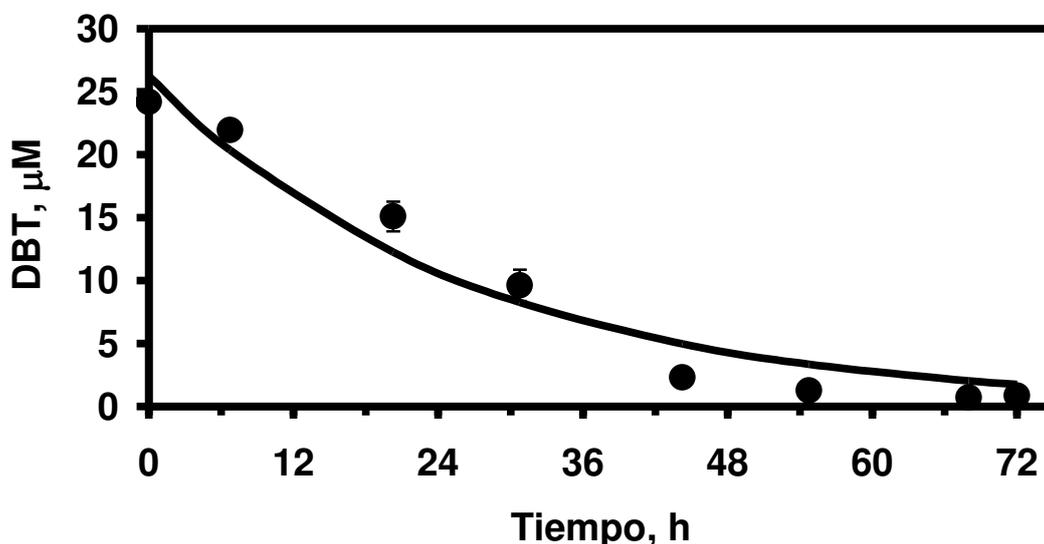
Debido a la diferencia entre los coeficientes de extinción molar la disminución del área del pico de DBT (5954) no correspondió al área del producto formado (8242). Además, la aparición de un precipitado azul en la interfase acetonitrilo-agua sugiere que parte de los productos de oxidación del DBT, pueden encontrarse en este precipitado. Sin embargo no se realizaron intentos posteriores para caracterizar estos productos. Con la finalidad de investigar si la oxidación del DBT mediante el sistema lacasa-ABTS podía aumentar el grado de conversión del DBT en función de la concentración de oxígeno, se realizó la reacción en presencia de diferentes relaciones molares de  $[O_2]/[ABTS]$  a 40°C durante un tiempo de 48 horas. La figura 5.12 muestra el efecto de la concentración de oxígeno sobre la transformación del DBT. Los datos ajustados a una curva hiperbólica, muestran una tendencia asintótica cuando la relación molar  $[O_2]/[ABTS] > 50$ , y una oxidación de DBT casi completa cuando esta relación molar fue de 140.



**Figura 5.12** – Dependencia de la concentración de oxígeno sobre la oxidación del DBT con la enzima lacasa y el mediador ABTS. Datos experimentales (O), ajuste de los datos experimentales (—), rango de confianza al 95% (---).

Este experimento mostró que el oxígeno fue necesario en un gran exceso para que la reacción de oxidación de 25  $\mu\text{M}$  de DBT con la enzima lacasa y el mediador ABTS se efectuara por completo.

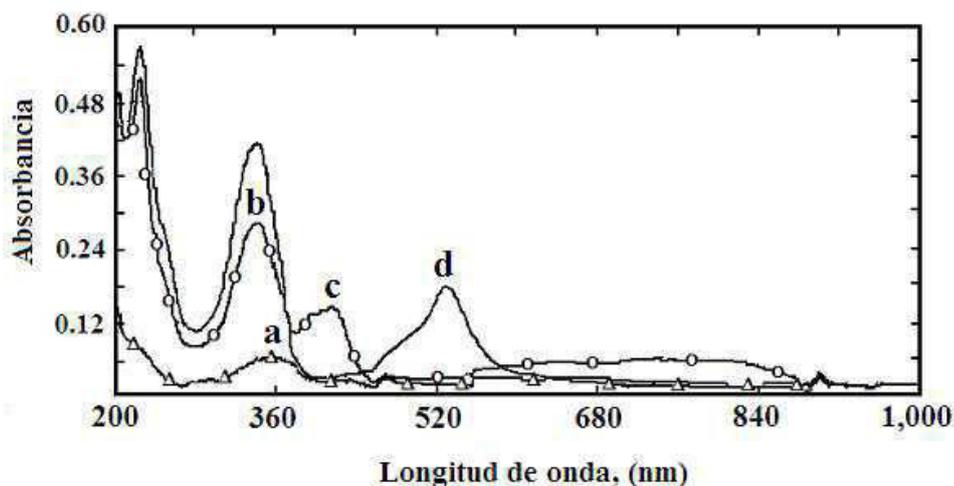
La figura 5.13 muestra la cinética de oxidación de 25  $\mu\text{M}$  de DBT por el sistema lacasa-ABTS con una relación molar de  $[\text{O}_2]/[\text{ABTS}] = 396$ . La reacción se realizó en un medio de acetonitrilo-agua. La constante de primer orden fue  $k_1 = -6.26 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ . Este resultado muestra dos características importantes del sistema lacasa-ABTS. Es un proceso muy lento y requiere un gran exceso de oxígeno y mediador. No se tuvo éxito de incrementar la velocidad de oxidación del DBT al aumentar la temperatura, porque el ABTS oxidado es un compuesto lábil a temperaturas por arriba de 50 °C. Por otro lado, la oxidación del ABTS por medio de la enzima lacasa es muy rápida. Esto sugiere que la etapa limitante es la oxidación no enzimática del DBT por el ABTS oxidado, la cual es una reacción muy lenta comparada con las de otros catalizadores orgánicos, tales como los compuestos tetra-amido macrocíclicos llamados TAML (Hangun et al., 2002; Collins, 1994).



**Figura 5.13.**– Cinética de oxidación del DBT en un medio constituido con agua-acetonitrilo mediante el sistema enzima lacasa-mediador ABTS a 40° C y una relación molar inicial de  $[\text{O}_2]/[\text{ABTS}] = 396$ .

### 5.7 Oxidación de la siringaldazina por el ABTS oxidado en ausencia de la enzima lacasa

Majcherczyk y Johannes (2000) reportaron que el ABTS oxidado (en forma de radical libre) puede oxidar algunos sustratos en la ausencia de la enzima. Por ejemplo, en la figura 5.14 podemos observar el comportamiento de los espectros de absorbancia para diferentes especies químicas, el barrido para la mezcla de ABTS oxidado /ABTS, obtenida mediante la enzima lacasa inmovilizada sobre sílice gel (0.29 mg proteína/g sílice gel) a una concentración de 4  $\mu\text{M}$  de ABTS oxidado, el barrido de una solución de 2  $\mu\text{M}$  siringaldazina y el barrido de la mezcla de los reactivos anteriores a la misma concentración final. La oxidación de la siringaldazina por el ABTS oxidado ocurre en menos de un segundo, el pico **c** correspondiente al ABTS oxidado, disminuye y se genera el pico **d**, correspondiente a la siringaldazina oxidada, en la cual están presentes quinonas (ver Figura 5.15), especies químicas que tienden a formar polímeros (Bourbonnais y Paice, 1990), produciendo un precipitado de color rosa.

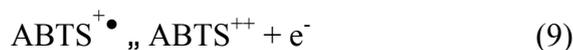


**Figura 5.14.-** Espectros de absorbancia de diferentes especies químicas: mezcla ABTS oxidado/ABTS ( - o-o - ), siringaldazina (  $\Delta$  ), mezcla de los reactivos anteriores a la misma concentración final (  $\Delta$  ). El pico **a** corresponde a siringaldazina ( $\lambda=359$  nm), **b** corresponde a ABTS ( $\lambda=343$  nm), **c** corresponde al ABTS oxidado ( $\lambda=420$  nm) y **d** corresponde a la siringaldazina oxidada ( $\lambda=530$  nm).

Bourbonnais *et al.* (1998) estudiaron las propiedades electroquímicas y reactividades del mediador ABTS y sus intermediarios responsables de la oxidación de lignina. El ABTS se oxida primero al catión radical ( $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ) y luego al dicatión ( $\text{ABTS}^{++}$ ). Las dos especies oxidadas son relativamente estables y electroquímicamente reversibles. El  $\text{ABTS}^{++}$  fue el

responsable de la oxidación del alcohol veratrílico como modelo de lignina no fenólico, mientras que  $ABTS^{+\bullet}$  reaccionó sólo con estructuras fenólicas de la lignina.

Myrna Solís (estudiante de doctorado del grupo del Dr. Viniegra) mediante estudios de electroquímica del mediador ABTS y sus intermediarios, demostró que hay un equilibrio:

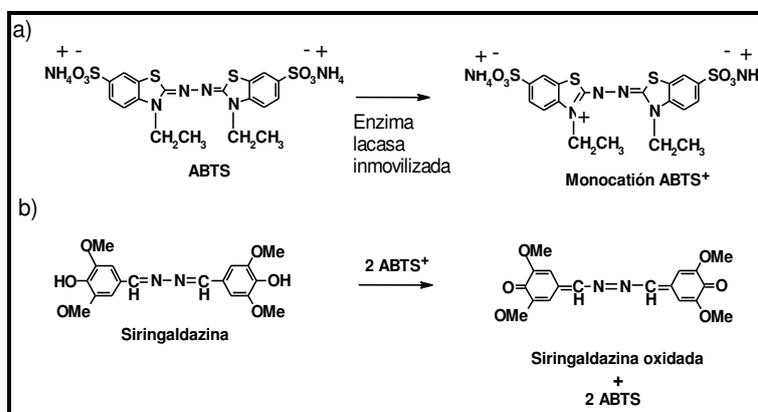


Esta reacción está desplazada a la izquierda, por que el  $ABTS^{++}$  reacciona con el ABTS de la siguiente manera:



Por lo tanto el  $ABTS^{+\bullet}$  es la especie intermediaria más estable, y es la que se genera durante la oxidación del ABTS por la enzima lacasa, tiene su  $\lambda_{max}$  a 420 nm.

En base a estos resultados, en la figura 5.15 se muestra el posible mecanismo de oxidación de la siringaldazina mediante el ABTS oxidado en forma de  $ABTS^{+\bullet}$ .



**Figura 5.15.-** a) Oxidación del ABTS por la enzima lacasa inmovilizada. b) Oxidación de la siringaldazina por el  $ABTS^{+\bullet}$ . Me, metil.

Se determinó la relación estequiométrica de la reacción de oxidación de la siringaldazina por el ABTS oxidado. La Tabla 5.2 muestra la relación entre el consumo del ABTS oxidado y la formación de siringaldazina oxidada, con 3.35  $\mu$ M a 6.5  $\mu$ M de ABTS oxidado y 2  $\mu$ M a 12.5  $\mu$ M de siringaldazina.

**Tabla 5.2** – Determinación del coeficiente estequiométrico de reacción con cambios de absorbancia en mezclas de ABTS oxidado y siringaldazina a diferentes proporciones.

Mezcla de reacción	Relación $\mu\text{M}$ inicial ABTS oxidado/ siringaldazina	$\Delta$ Absorbancia		Coeficiente estequiométrico calculado  ABTS oxidado/ siringaldazina
		ABTS oxidado 420 nm $\epsilon=36,000$	Siringaldazina oxidada 530 nm $\epsilon=65,000$	
1	6.5 /2.17	-0.134	0.121	2.00
2	4.0/2.0	-0.149	0.140	1.92
3	3.35/1.25	-0.121	0.109	2.00

El valor promedio del coeficiente estequiométrico fue de  $1.97 \pm 0.046$ . Este es consistente con un mecanismo de oxidación de dos etapas de remoción de electrones del sustrato por una molécula de ABTS oxidado (ver Figura 5.15).

### **5.8 Oxidación de la siringaldazina por el ABTS oxidado en condiciones anóxicas**

Se realizó la oxidación de la siringaldazina por el ABTS oxidado en condiciones anóxicas para saber si era necesaria la presencia del oxígeno. Los reactivos ABTS oxidado y siringaldazina se colocaron por separado en frascos serológicos sellados herméticamente, a los cuales previamente se les desplazó el aire con un flujo  $\text{N}_2$  por 10 min a 10 psi. La reacción se realizó con 30 mL de 45  $\mu\text{M}$  de ABTS oxidado con 2.7 mL de 0.5 mM de siringaldazina adicionada con una jeringa de un frasco a otro. En los controles negativos se inyectó a los frascos reactivos con agua destilada. La reacción ocurrió muy rápido, en menos de un segundo, mostrando un cambio de color, de azul verde a violeta, que después de 45 min dio lugar a un precipitado rosa.

La diferencia de la reacción de oxidación de siringaldazina por el ABTS oxidado en condiciones anóxicas y en la presencia de aire, fue la turbidez y coloración después de 45 min, con más abundante precipitado de color rosa en el sistema abierto. Esto indica que la reacción de oxidación de la siringaldazina por el ABTS oxidado no requiere oxígeno como aceptor final de electrones, a diferencia de la oxidación del ABTS por la enzima lacasa. Pues, los frascos serológicos con lacasa y ABTS en ausencia de  $\text{O}_2$  no tuvieron ningún cambio de color (estos experimentos correspondieron a un control negativo de la reacción

descrita en la figura 5.11, del cual no se reportó el perfil de cromatografía, pues al tomar la muestra para inyectarla en el HPLC, ésta se puso en contacto con el oxígeno del aire y provocó la reacción de oxidación del ABTS por la enzima, aún en presencia del acetonitrilo. Por esta razón, se utilizó el control negativo con enzima inactivada térmicamente).

Por otro lado, los intentos realizados para oxidar el DBT por contacto directo con ABTS oxidado en un medio con etanol, separado de la enzima lacasa, no tuvieron éxito. Esto apoya un posible rol no estequiométrico para el oxígeno en esta reacción compleja, involucrando la oxidación y posible reciclaje del ABTS entre la enzima y DBT, usando oxígeno como un aceptor final de electrones y quizá una fuerza motriz por exceso de oxígeno, para la estabilización de intermediarios desconocidos. Esta reacción de oxidación del DBT en presencia de la enzima y un exceso de oxígeno, estuvo acompañada de un precipitado azul insoluble tanto en acetonitrilo como en agua. A mayor cantidad de precipitado, menor área del pico de producto de oxidación del DBT ( $t_R = 7.98$  min). La formación de polímeros derivados de la oxidación del DBT puede ser una manera interesante para remover compuestos azufrados.

### **5.9 Distribución del DBT entre hexano y una fase polar**

Yazu *et al.* (2001) reportaron el uso del acetonitrilo para extraer el DBT de un diesel ligero y oxidarlo en esta fase. No obstante, se ha reportado que el acetonitrilo es un compuesto tóxico (Saillenfait y Sabate., 2000). Por ello, se realizó la comparación del uso de mezclas acetonitrilo-agua con las de etanol-agua para extraer el DBT de una fase de hidrocarburo. La tabla 5.3 muestra la distribución del DBT (10 mM) en 10 mL de hexano; después de adicionar 2.4 mL de un solvente polar (etanol o acetonitrilo) y 0.5 mL de agua (estas proporciones de hexano, solvente y agua fueron las mismas para las mezclas descritas posteriormente relacionadas a la oxidación del DBT por el peróxido de hidrógeno catalizadas por el ácido fosfotúngstico utilizando etanol como solvente).

El DBT fue mucho más soluble en hexano que en acetonitrilo o etanol como se muestra en la tabla 5.3. Sin embargo, ambos disolventes pueden ser utilizados para extraer el DBT de una fase de hidrocarburo como es sugerido por Gore (2001). Además, ambos sistemas de disolvente son capaces de realizar la extracción de compuestos azufrados oxidados. El

etanol tiene la ventaja de baja toxicidad comparado con el acetonitrilo. Sin embargo, cuando se usa acetonitrilo no es necesario adicionar agua para tener la separación de dos fases.

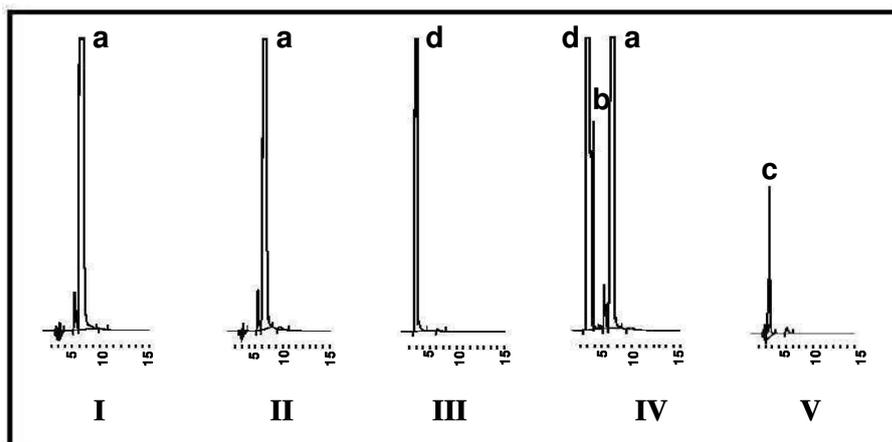
**Tabla 5.3.-** Distribución del DBT (10 mM) en 10 mL de hexano en un sistema de dos fases constituido por 2.4 mL de solvente (etanol o acetonitrilo) y 0.5 mL de agua.

Sistema de dos fases	Concentración de DBT, (mM)		% DBT total	
	Hexano	Solvente/ agua	Hexano	Solvente/ agua
Hexano/ acetonitrilo agua	9.174	4.37	87.86	12.14
Hexano/ etanol agua	9.43	3.1	91.3	8.7

**5.10 Reacción de oxidación del DBT con el peróxido de hidrógeno sin catalizador**

Para investigar si era factible que el peróxido de hidrógeno podía oxidar al DBT, se realizó la siguiente reacción en un medio formado por 6.25 mM de DBT, 2.45 M de peróxido de hidrógeno y 75% v/v de etanol a 25°C durante 24 h. Como se puede apreciar en los perfiles de cromatografía de HPLC de la figura 5.16, en los controles negativos I (sustituyendo la solución de peróxido de hidrógeno al 30% por etanol) y II (sustituyendo la solución de peróxido de hidrógeno al 30% por agua) no disminuyó la concentración del DBT, pico **a** ( $t_R = 5.6$  min), ni aparecieron picos nuevos.

En el control negativo III (sin DBT), se observa que el peróxido de hidrógeno se registra a la  $\lambda$  de 254 nm como un pico **d** ( $t_R = 2.18$  min). Cuando todos los reactivos estuvieron presentes (perfil de HPLC IV) hay un nuevo pico **b** ( $t_R = 2.42$  min) con una área de 131,353 y la concentración del DBT disminuyó 3.7 %. Para investigar si este nuevo pico correspondía a sulfona de DBT, se inyectó un estándar de este compuesto, perfil de HPLC V pico **c** ( $t_R = 2.57$  min). Dado que el nuevo pico **b** tiene un tiempo de retención diferente al de la sulfona de DBT, podemos pensar que se trata del sulfóxido de DBT.



**Figura 5.16.-** Perfiles de HPLC de la reacción de oxidación del DBT con peróxido de hidrógeno sin catalizador: I control negativo (sustituyendo la solución de peróxido de hidrógeno al 30% por etanol), control negativo II (sustituyendo la solución de peróxido de hidrógeno al 30% por agua), III control negativo (sin DBT), IV reacción y V estándar de sulfona de DBT.

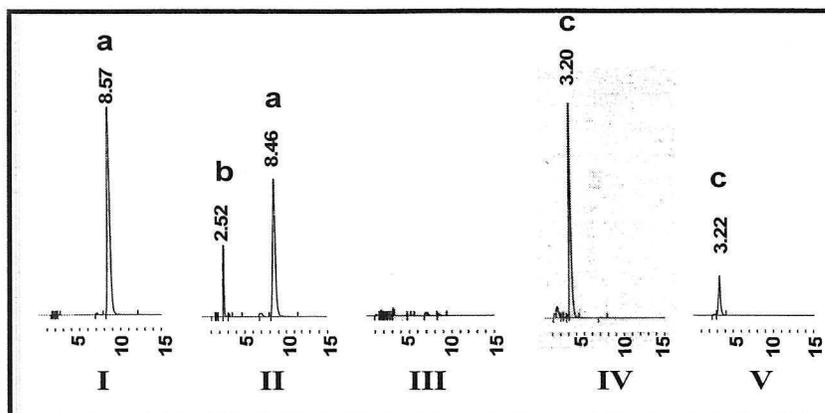
### ***5.11 Oxidación del DBT por peróxido de hidrógeno con ácido fosfotúngstico como catalizador***

La oxidación química del DBT fue realizada en una mezcla de reacción conteniendo 10 mM de DBT disuelto en hexano (50 mL) y etanol (12 mL), peróxido de hidrógeno (76 mM) y 39  $\mu$ M de ácido fosfotúngstico. En este sistema casi todo el DBT fue oxidado después de 1 h. La figura 5.17 muestra los perfiles de cromatografía líquida (HPLC) de la oxidación del DBT con peróxido de hidrógeno y ácido fosfotúngstico en el sistema hexano-etanol a diferentes tiempos. El pico del DBT disminuye simultáneamente con la aparición de dos nuevos picos, uno correspondiente al sulfóxido de dibenzotiofeno en la fase de hexano y el otro correspondiente a sulfona de dibenzotiofeno en la fase de etanol.

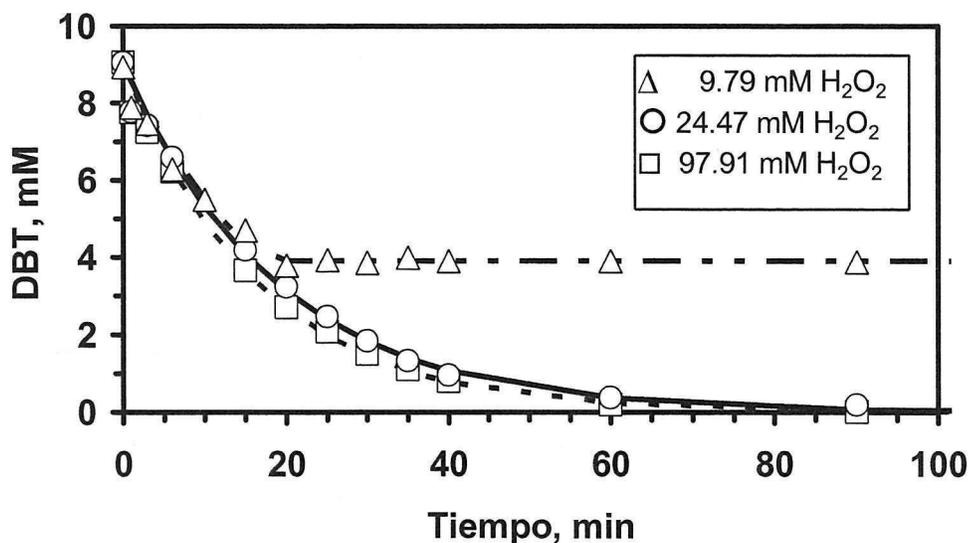
Cuando la reacción se dejó continuar por más tiempo, la oxidación del DBT formó un precipitado sólido en la fase de etanol. Este material sólido fue separado por centrifugación, disuelto en acetonitrilo y analizado por HPLC, dando el mismo tiempo de retención que el estándar de sulfona de DBT ( $t_R = 3.22$  min) mostrado en la figura 5.17.

La figura 5.18 muestra la cinética de oxidación de 10 mM de DBT en hexano-etanol a 60°C, como una función de la concentración de peróxido de hidrógeno, utilizando 39  $\mu$ M

de ácido fosfotúngstico como catalizador. La concentración de peróxido de hidrógeno tuvo sólo un pequeño efecto sobre la velocidad inicial de reacción. No obstante, se requirió una relación molar de  $[H_2O_2]/[DBT] = 2$  para que la reacción fuera completa.



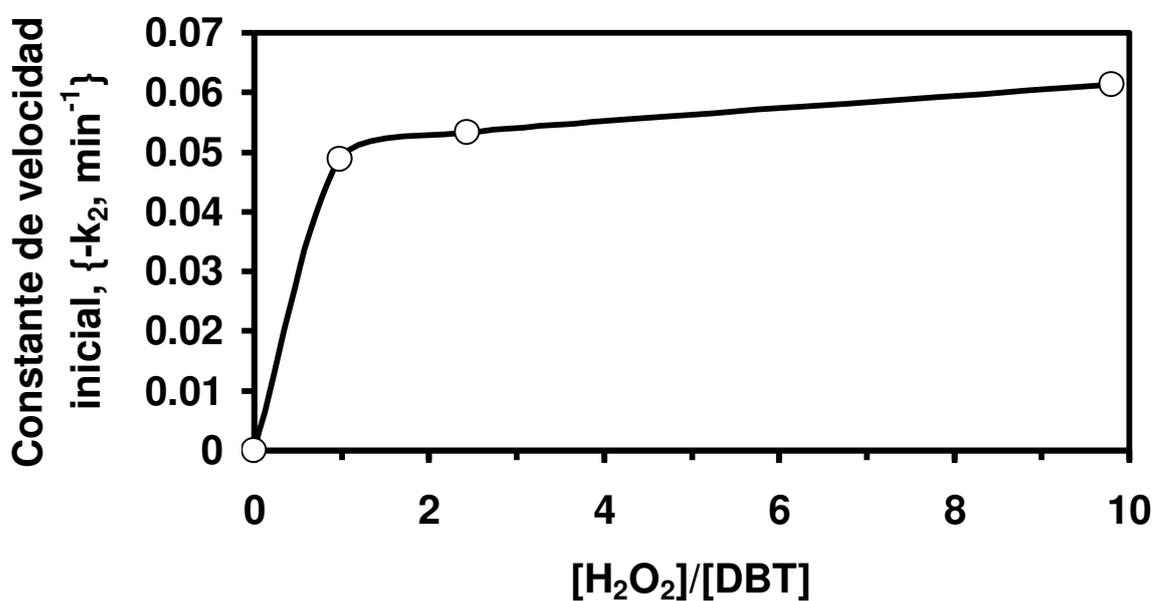
**Figura 5.17** – Perfiles de cromatografía líquida (HPLC) de la oxidación del DBT con peróxido de hidrógeno y ácido fosfotúngstico en hexano-etanol. I: tiempo 0 min, DBT (4.52 mM) en la fase hexano después de una dilución 1:1 con hexano puro; II: tiempo 25 min, DBT (2 mM) en la fase hexano; III: tiempo 120 min, DBT (0.003 mM) en la fase hexano; IV: tiempo 120 min, sulfona de DBT (14 mM) en la fase de etanol; V: estandar de sulfona de DBT (2.5 mM). Los picos identificados corresponden a DBT (a), sulfóxido de DBT (b) y sulfona de DBT (c). Los números arriba de los picos representan los tiempos de retención (min).



**Figura 5.18** – Cinéticas de oxidación de 10 mM DBT en el sistema hexano-etanol, utilizando diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno.

Esta relación estequiométrica es compatible con un mecanismo de reacción en dos etapas, en el cual la formación de sulfóxido de DBT es la primer etapa y la formación de sulfona de DBT es la segunda. Así, un mol de peróxido de hidrógeno se requiere en cada etapa.

El efecto de la relación molar  $[H_2O_2]/[DBT]$  sobre la pseudo constante de velocidad de oxidación de primer orden ( $k_2$ ) fue determinada. Esta fue  $k_2 = -4.88 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  para  $[H_2O_2]/[DBT] = 0.98$ ;  $k_2 = -5.33 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  para  $[H_2O_2]/[DBT] = 2.44$ ; y  $k_2 = -6.14 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  para  $[H_2O_2]/[DBT] = 9.8$ . Como se puede apreciar en la figura 5.19, al graficar  $-k_2$  vs  $[H_2O_2]/[DBT]$ , se obtiene un comportamiento asintótico para el valor de  $-k_2$  con un valor máximo de  $6.15 \times 10^{-2}$  cuando la relación  $[H_2O_2]/[DBT]$  es mayor de 2. Estos resultados indican que para valores de la relación  $[H_2O_2]/[DBT] < 1$ , la concentración de peróxido de hidrógeno tiene un efecto significativo para la constante de pseudoprimer orden  $k_2$ , y para valores de la relación  $[H_2O_2]/[DBT] > 1$ , por arriba de la relación estequiométrica, tiene poco efecto sobre la constante de pseudoprimer orden  $k_2$ , en la reacción de oxidación del DBT en hexano-etanol utilizando el ácido fosfotúngstico como catalizador.



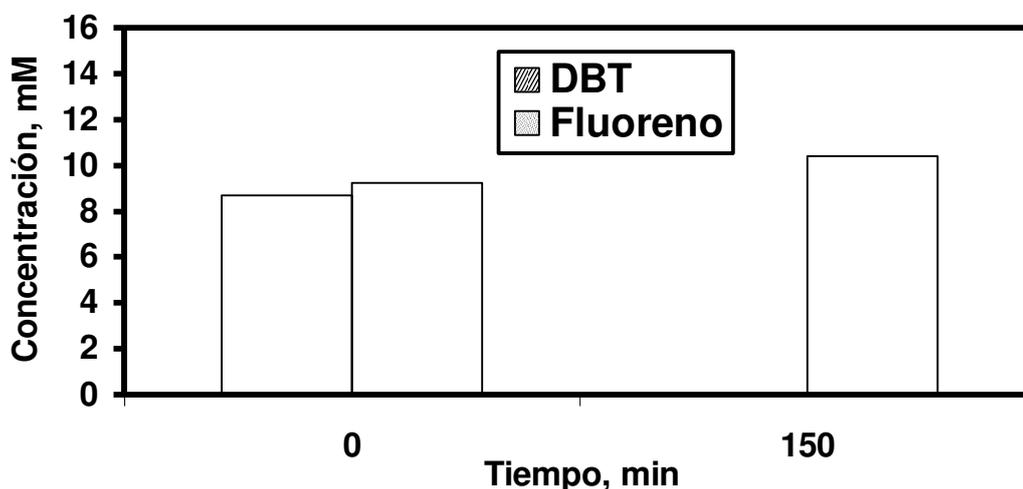
**Figura 5.19.-** Efecto de la concentración de peróxido de hidrógeno sobre la constante de velocidad  $k_2$ .

Se analizó la selectividad de esta reacción entre el DBT y el fluoreno, estas dos moléculas son muy similares entre sí, la única diferencia entre ellas es que la molécula de DBT contiene un átomo de azufre en lugar de un carbono. La reacción se llevó a cabo bajo las

mismas condiciones descritas arriba. El DBT fue oxidado totalmente después de 60 minutos, mientras que el fluoreno no fue modificado.

Como se muestra en la figura 5.20, la reacción se dejó continuar hasta 150 minutos y la totalidad del DBT presente desapareció tanto de la fase de hexano como de etanol. El producto de oxidación del DBT, la sulfona del DBT, en su mayoría se recuperó como un sólido y parte de ella estuvo presente en la fase de etanol en una concentración de 6.56 mM, que corresponde a 8.7% de la cantidad de sulfona total, el 91.3 % de sulfona restante formó el precipitado.

Estos resultados demuestran la selectividad de esta reacción sobre los compuestos azufrados como fue discutido por Collins (1997).



**Figura 5.20.-** En esta gráfica se muestran las concentraciones de DBT y fluoreno a tiempo 0 y después de 150 min de reacción con peróxido de hidrógeno utilizando el ácido fosfotúngstico como catalizador en un medio de hexano-etanol. La concentración de DBT desapareció por completo de la fase hexano después de 150 minutos de reacción a 60°C.

### **5.12 Desulfuración oxidativa del diesel**

La oxidación química de los compuestos azufrados de un diesel comercial, se llevó a cabo con 0.24 M de peróxido de hidrógeno y 118.6  $\mu$ M de ácido fosfotúngstico como catalizador, a 60°C y bajo presión atmosférica durante un tiempo de reacción de 3 h. Se

utilizó el etanol o el acetonitrilo como disolventes, como se describe en Materiales y Métodos.

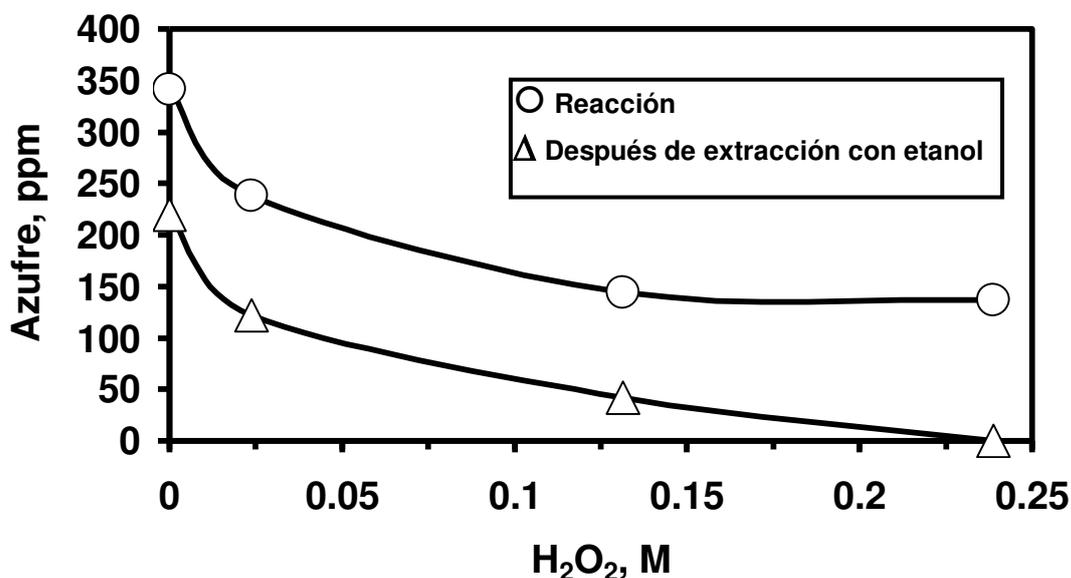
Cuando no estuvo presente el peróxido de hidrógeno, el acetonitrilo removió 5.7 % más azufre que el etanol como se muestra en la tabla 5.4, mientras que para los controles negativos, donde no estuvo presente el ácido fosfotúngstico, el etanol logró remover 7.5 % más azufre que el acetonitrilo. Para las muestras tratadas donde estuvieron presentes, tanto el peróxido de hidrógeno como el ácido fosfotúngstico, el acetonitrilo logró remover 9.3% más diesel que el etanol. La tabla 5.4 muestra que la mezcla completa de reacción logró remover cerca del 70% del azufre presente en el diesel comercial. Estos resultados demuestran que el etanol puede ser considerado como una buena opción para ser utilizado como disolvente en la reacción de oxidación y remoción de los compuestos azufrados en diesel, ya que la capacidad del etanol para remover los compuestos oxidados del diesel es similar a la obtenida con acetonitrilo con la ventaja adicional que el etanol no es tóxico.

**Tabla 5.4.-** Comparación del etanol con el acetonitrilo para la reacción de oxidación con peróxido de hidrogeno y ácido fosfotúngstico y remoción de los compuestos azufrados del diesel.

Componentes en mezcla de reacción	Acetonitrilo		Etanol	
	Azufre remanente en diesel (ppm)	% de remoción de azufre en diesel	Azufre remanente en diesel (ppm)	% de remoción de azufre en diesel
Agua Ácido fosfotúngstico	346.06 ± 3.8	0.00	367.03 ± 0.9	0.00
Peróxido de hidrógeno	326.73 ± 4.3	5.58	319.03 ± 4.2	13.08
Peróxido de hidrógeno Ác. fosfotúngstico	79.33 ± 2.7	77.07	118.30 ± 0.8	67.77

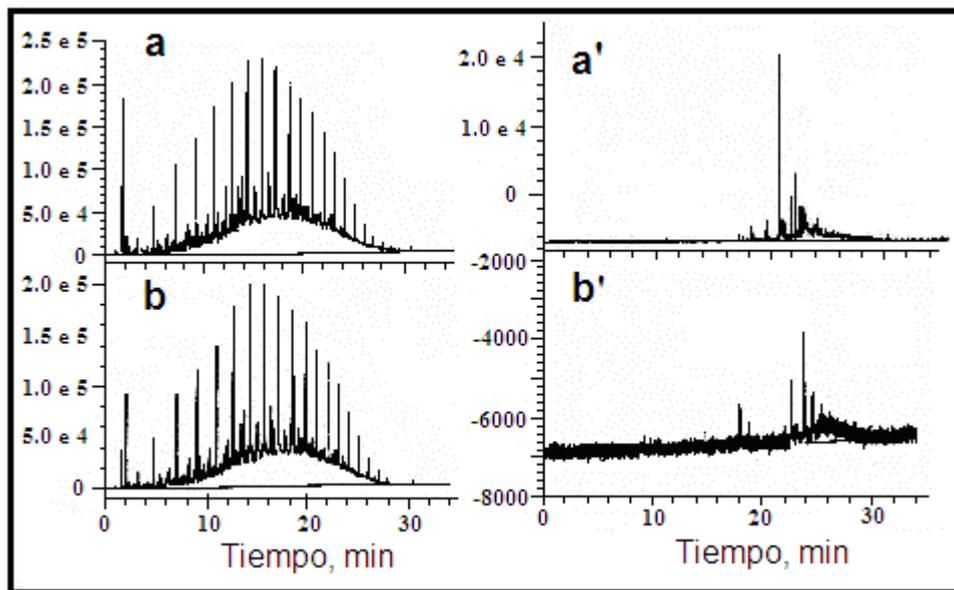
Una vez comparados el acetonitrilo y el etanol en sus capacidades para ser utilizados como disolventes en la reacción de oxidación y remoción de los compuestos azufrados del diesel con peroxido de hidrógeno y ácido fosfotúngstico, se decidió evaluar el efecto de la concentración de peróxido de hidrógeno sobre la remoción de azufre del diesel utilizando 118.6 µM de ácido fosfotúngstico como catalizador y diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno en el sistemas de reacción utilizando el etanol como disolvente. En

la figura 5.21 podemos observar que sigue un patrón de saturación inversa y a concentraciones por arriba de 0.13 M de peróxido de hidrógeno, existe un comportamiento asintótico, donde no es posible remover mayor cantidad de azufre, esto quizá se deba a que la fase de etanol esté saturada de compuestos azufrados. No obstante, cuando se realizó una extracción con igual volumen de etanol de las muestras, pudimos observar que en el control negativo (el peróxido de hidrógeno fue remplazado por un volumen igual de agua), la simple extracción con etanol logró remover 122 ppm de azufre del diesel, mientras que en la muestra tratada con la concentración más alta de peróxido de hidrógeno, 0.24 M, después de la extracción con etanol, produjo un diesel con un contenido de azufre menor de 5 ppm, por debajo de los límites de detección del aparato de fluorescencia de rayos X. Es importante mencionar que la relación molar de  $[H_2O_2]/[S]$  fue mayor de 10, ya que la concentración molar de los compuestos azufrados es próxima a 10 mM. Este resultado mostró que el peróxido de hidrógeno, en la presencia de un catalizador adecuado no tiene limitaciones importantes para oxidar los compuestos orgánicos azufrados presentes en el diesel, y que es posible remover todos los compuestos azufrados de este combustible.



**Figura 5.21** – Efecto de la concentración de peróxido de hidrógeno sobre la remoción de azufre en diesel, utilizando el etanol como disolvente. (O) después de reacción, (Δ) después de reacción y una extracción con un volumen igual de etanol.

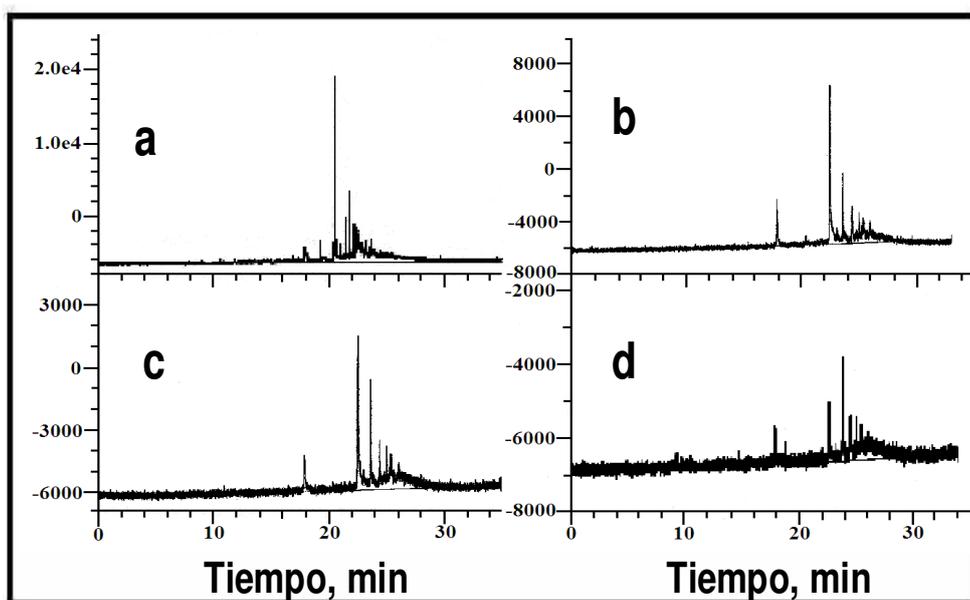
Con la finalidad de estudiar la selectividad que pueda tener este sistema de oxidación y remoción de compuestos azufrados, se obtuvieron los perfiles de hidrocarburos totales y los perfiles de hidrocarburos azufrados tanto del control negativo (sin peróxido de hidrógeno) como de las muestras tratadas con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno. La figura 5.22 muestra la comparación de los perfiles de hidrocarburos totales y azufrados del control negativo (sin peróxido de hidrógeno) y la muestra tratada con 0.24 M de peróxido de hidrógeno después de tres horas de reacción a 60°C, obtenidos por cromatografía de gases (CG) con un detector fotométrico de flama específico a azufre (FPD). El panel (a) muestra el perfil de hidrocarburos totales y el panel (a') el perfil de hidrocarburos azufrados para el control negativo (sin peróxido de hidrógeno), el panel (b) muestra el perfil de hidrocarburos totales y el panel (b') el perfil de hidrocarburos azufrados para la muestra tratada con 0.24 M de peróxido de hidrógeno. El perfil de hidrocarburos totales del control negativo (Fig. 5.22 a) fue prácticamente el mismo que el de la muestra tratada (Fig. 5.22 b) mostrando que el proceso de oxidación con peróxido de hidrógeno no modifica significativamente el perfil de hidrocarburos totales del diesel. Sin embargo, el perfil de hidrocarburos azufrados de la muestra tratada (Fig.5.21 b') dio una señal más débil que la muestra del control negativo (Fig 5.22 a').



**Figura 5.22** – Perfil de hidrocarburos en diesel obtenidos en un analizador fotométrico de flama (FPD). a) Perfil de hidrocarburos totales en el control, a') perfil de hidrocarburos azufrados en el control, b) perfil de hidrocarburos totales después de la reacción con peróxido de hidrógeno y ácido fosfotúngstico utilizando el etanol como disolvente, b') perfil de hidrocarburos azufrados después de la reacción con peróxido de hidrógeno y ácido fosfotúngstico utilizando el etanol como disolvente.

Además, los tiempos de retención de los compuestos azufrados en la muestra de diesel tratada fueron mayores que la muestra control, mostrando un incremento en el punto de ebullición de la mayoría de los compuestos azufrados debido al proceso de oxidación. Estos resultados son consistentes con la oxidación y remoción selectiva de los compuestos azufrados en el diesel.

En la figura 5.23 se muestran los perfiles de hidrocarburos azufrados presentes en el diesel, obtenidos mediante un analizador fotométrico de flama (FPD). El panel **a** de la figura 5.23 corresponde al perfil de hidrocarburos azufrados del control negativo (sin peróxido de hidrógeno), podemos observar que existe un pico que presenta un valor en la escala de las ordenadas de aproximadamente 20,000 y los tiempos de retención de la mayoría de los picos se encontraron entre 18 y 26 minutos.



**Figura 5.23** – Perfil de hidrocarburos azufrados presentes en el diesel, obtenidos en un analizador fotométrico de flama (FPD). a) Perfil de hidrocarburos azufrados en el control negativo (sin peróxido de hidrógeno), b) perfil de hidrocarburos azufrados de la muestra tratada con 0.024 M de peróxido de hidrógeno, c) perfil de hidrocarburos azufrados de la muestra tratada con 0.13 M de peróxido de hidrógeno, d) perfil de hidrocarburos azufrados de la muestra tratada con 0.24 M de peróxido de hidrógeno.

El panel **b** de la figura 5.23 corresponde al perfil de hidrocarburos azufrados de la muestra de diesel tratada con 0.024 M de peróxido de hidrógeno; podemos observar que existe un pico con un máximo valor en la escala de las ordenadas de aproximadamente 7,000 y los tiempos de retención de los picos se modifican, encontrándose la mayoría entre 22 y 28 minutos. El panel **c** corresponde al perfil de hidrocarburos azufrados de la muestra tratada con 0.13 M de peróxido de hidrógeno, este perfil es muy similar al de la muestra del panel **b**, con la diferencia que el máximo valor del pico de azufrados en la escala de las ordenadas es aún mucho menor en **c**, con un valor de 2,000 aproximadamente.

Finalmente, el panel **d** presenta el perfil de hidrocarburos azufrados de la muestra tratada con 0.24 M de peróxido de hidrógeno. Aunque no se observa un cambio en los tiempos de retención respecto a las muestras de los paneles **b** y **c**, existe un pico con un valor máximo en la escala de las ordenadas es de -4000, indicando que esta señal es 6 ordenes de magnitud menor que el control negativo (panel **a**).

Se puede observar que el perfil de hidrocarburos azufrados es muy similar entre las muestras tratadas con 0.024, 0.13 y 0.24 M de peróxido de hidrógeno, solo cambia la intensidad de la señal en el eje de las ordenadas proporcionada por el analizador fotométrico de flama con filtro para azufre. Lo cual, podría indicar que estos compuestos azufrados no han sido oxidados aún, y que al aumentar la cantidad de peróxido de hidrógeno, se oxidan cambiando su polaridad y se separan hacia la fase de etanol. No se aprecia un cambio considerable en los tiempos de retención de los hidrocarburos azufrados presentes en las muestras tratadas con respecto al control negativo (sin peróxido de hidrógeno) debido a que posiblemente los hidrocarburos azufrados oxidados que podrían presentar un perfil diferente, son removidos en su totalidad hacia la fase de etanol.

Estos resultados indican de manera concluyente que la catálisis homogénea es un camino práctico para oxidar y remover los compuestos orgánicos azufrados presentes en el diesel, pues no requiere condiciones extremas de presión o temperatura.

Sin embargo, al comparar las velocidades de oxidación del DBT cuando se utilizó el ácido fosfotúngstico como catalizador, con las reportadas por Hangun *et al.* (2002) utilizando el catalizador llamado TAML, se puede ver que es posible elevar la velocidad de reacción al doble (de  $6.14 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  en la sección 5.11 a  $1.2 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$  en la sección 2.9).

Los resultados obtenidos por Myrna Solís (tesis de doctorado en elaboración, estudiante del grupo del Dr. Viniegra) han mostrado que la enzima lacasa, al oxidar el mediador ABTS y éste al reaccionar a su vez con un sustrato (colorante indigo), el ABTS vuelve a su estado reducido y puede volver a ser oxidado por la enzima, y comprobó que el sustrato (colorante) puede ser oxidado con una velocidad diez veces más alta en presencia de la enzima, que si sólo se utiliza el ABTS oxidado.

Aquí se mostró que la enzima lacasa es requerida para lograr la oxidación del DBT en presencia del ABTS y que se requiere una elevada concentración de oxígeno ( $[O_2]/[ABTS] > 50$ ).

Cabe plantearse la posibilidad de nuevos sistemas utilizando lacasa y nuevos mediadores, pero los cuales sean solubles en el diesel y la enzima este inmovilizada de manera que actúe en la fase no polar. Javier López (estudiante de doctorado del grupo del Dr. Viniegra) ha demostrado que esto puede ser factible mediante la modificación de la enzima con polietilenglicol.

Por lo tanto, parte de los resultados de esta tesis, así como los trabajos que se realizan en el laboratorio del Doctor Viniegra, sugieren la necesidad de la apertura de una nueva línea de investigación hacia los procesos bio-miméticos, es decir, compuestos sintéticos diseñados en base a una molécula biológica.

Cerca del 30% de todas las proteínas trabajan en las membranas lipídicas, que son equivalentes a solventes no polares. En consecuencia, no es descabellado suponer que la búsqueda y el diseño de nuevos procesos bio-miméticos puedan modificar radicalmente algunas operaciones industriales como sería la desulfuración oxidativa del diesel.

En este caso concreto, se puede considerar que la enzima lacasa ofrece una velocidad aparente de primer orden para la oxidación del ABTS cercana a  $k = k_{cat} * [E] / K_M = (713 \text{ min}^{-1})(3.4 \times 10^{-6} \text{ M}) / (0.2 \times 10^{-3} \text{ M}) \approx 12 \text{ min}^{-1} (2 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1})$ . Es decir, que si el ABTS fuera un mediador adecuado para oxidar compuestos azufrados, sería capaz de soportar una velocidad de oxidación de estos compuestos 100 veces más rápida que los mejores catalizadores bioorgánicos encontrados por Hangun *et al.* (2002). A su vez, el re-uso rápido del mediador por su reciclaje entre la enzima y el sustrato final, permitiría utilizar

mediadores relativamente caros pero muy eficientes, que en última instancia su costo neto sería mucho más económico que los costos de catalizadores bioorgánicos mencionados en esta tesis.

# **CAPITULO VI**

## **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos y discutidos en esta tesis muestran que:

- a) Es factible oxidar y remover compuestos orgánicos azufrados por la acción combinada de la enzima lacasa, un mediador estable como el ABTS y una elevada presión parcial de oxígeno.
- b) El factor limitante del proceso parece ser la reacción abiótica (sin enzima) del mediador oxidado con el sustrato (DBT).
- c) La oxidación abiótica del DBT y de otros compuestos azufrados presentes en el diesel pueden acelerarse si se encuentran catalizadores adecuados como el ácido fosfotúngstico y oxidantes como el peróxido de hidrógeno.
- d) La diferencia en las velocidades de pseudo primer orden entre la oxidación enzimática del ABTS ( $k = 12 \text{ min}^{-1}$ ) y la oxidación abiótica del DBT por el peróxido de hidrógeno ( $10^{-2} \text{ min}^{-1} < k < 10^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) sugieren que es posible generar nuevos procesos, siempre y cuando se encuentren mediadores más rápidos y eficientes que el ABTS.

Por lo anterior, esta tesis sugiere la necesidad de una exploración hacia nuevos procesos utilizando catalizadores bio-miméticos en procesos petroquímicos para la desulfuración oxidativa.

# **BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFÍA

- Andreasson, L. E. and Reinhammar, B. (1976). Kinetic Studies of *Rhus vernicifera* laccase. Role of the metal centers in electron transfer. *Biochimica et Biophysica Acta*, **445**:579-597.
- Andreasson, L. E. and Reinhammar, B. (1979). The mechanism of electron transfer in laccase-catalysed reactions. *Biochimica et Biophysica Acta*, **568**:145-156.
- Andréasson, L. E., Brändén, R. and Reinhammar, B. (1976). Kinetic studies of *Rhus vernicifera* laccase. Evidence for multi-electron transfer and an oxygen intermediate in the reoxidation reaction. *Biochimica et Biophysica Acta*. **438**:370-379.
- Anisimov, A. V., Fedorova, E. V. and Lesnugin, A. Z. (2003). Vanadium peroxocomplexes as oxidation catalysts of sulfur organic compounds by hydrogen peroxide in bi-phase systems. *Catalysis Today*. **78**:319-325.
- Ayala, M., Tinoco, R., Hernández, V., Bremauntz, P. And Vazquez-Duhalt, R. (1998). Biocatalítica oxidation of fuel as an alternative to biodesulfurization. *Fuel Processing Technology*. **57**:101-111.
- Bacocchi, E., Gerini, M. F., Harvey, P. J., Lanzalunga, O. and Mancinelli, S. (2000). Oxidation of aromatic sulfides by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *European Journal of Biochemistry*. **267**(9): 2705-2710.
- Bahrami, A., Shojaosadati, S. A. and Mohebbi, G. (2001). Biodegradation of dibenzothiophene by thermophilic bacteria. *Biotechnology Letters*. **23**(11):899-901.
- Berka, R. M.; Schneider, P.; Golightly, E. J.; Brown, S. H.; Madden, M.; Brown, K. M.; Halkier, T.; Mondorf, K. and Xu, F. (1997). Characterization of the gene encoding an extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**(8): 3151-3157.
- Bourbonnais, R. and Paice, M.G. (1990). Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters* **267**(1):99-102.
- Bourbonnais, R., Leech, D. and Paice, M.G. (1998). Electrochemical analysis of the interaction of laccase mediators with lignin model compounds. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1379** (3): 381-390.
- Bourbonnais, R., Paice, M.G., Freiermuth, B., Bodie, E. and Borneman, S. (1997). Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**(12):4627-4632.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72**: 248-254.

- Branden, R. and Deinum, J. (1977). Type 2 copper(II) as a component of the dioxygen reducing site in laccase: evidence from EPR experiments with  $^{17}\text{O}$ . *FEBS Letters*. **73**(2):144-146.
- Bressler, D. C., Fedorak, P. M., Pickard, M. A. (2000) Oxidation of carbazole, N-ethylcarbazole, fluorene, and dibenzothiophene by the laccase of *Corioliopsis gallica*. *Biotechnology Letters*. **14**(22):1119-1125.
- Cline, J., Reinhammar, B., Jensen, P., Venters, R. and Hoffman B.M. (1983). Coordination environment for the type 3 copper center of tree laccase and CuB of cytochrome c oxidase as determined by electron nuclear double resonance. *The Journal of Biological Chemistry*. **258**(8):5124-5128.
- Coll, P.M., Fernández, A.J.M., Villanueva, J.R., Santamaría, R. and Pérez, P. (1993). Purification and characterization of a phenoloxidase (laccase) from the lignin-degrading Basidiomycete PM1 (CECT 2971). *Applied and Environmental Microbiology*. **59**(8):2607-2613.
- Collins, F. M., Lucy, A. R. and Sharp, C. (1997). Oxidative desulphurisation of oils via hydrogen peroxide and heteropolyanion catalysis. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. **117**:397-403.
- Collins, P.J., Kotterman, M.J.J., Field, J.A. and Dobson, A.D.W. (1996). Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**(12):4563-4567.
- Collins, T. J. (1994). Designing ligands for oxidizing complexes. *Accounts of Chemical Research*. **27**:279-285.
- Colonna, S., Gaggero, N., Carrea, G. and Pasta, P. (1994). The microperoxidase-11 catalyzed oxidation of sulfides is enantioselective. *Tetrahedron Letters*. **35**(48):9103-9104.
- Colonna, S., Gaggero, N., Casella, L., Carrea, G. and Pasta, P. (1992). Chloroperoxidase and hydrogen peroxide: An efficient system for enzymatic enantioselective sulfoxidations. *Tetrahedron: Asymmetry*. **3**(1):95-106.
- Doerge, D. R. (1986). Oxygenation of organosulfur compounds by peroxidases: evidence of an electron transfer mechanism for lactoperoxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **244**(2):678-685.
- Doerge, D. R., Cooray, D. R., Brewster, M. E. (1991). Peroxidase-catalyzed S-oxygenation: Mechanism of oxygen transfer for lactoperoxidase. *Biochemistry*. **30**:8960-8964.
- Fritz-Langhals, E. and Kunath, B. (1998). Synthesis of aromatic aldehydes by laccase mediator assisted oxidation. *Tetrahedron Letters*. **39**(33): 5955-5956.

- Fukushima, D., Kim, Y. H., Iyanagi, T. and Oae, S. (1978). Enzymatic oxidation of disulfides and thiol-sulfonates by both rabbit liver microsomes and a reconstituted system with purified cytochrome P-450. *Journal of Biochemistry*. **83**(4):1019-1027.
- Gardiol, A. E., Hernandez, R.J. and Harte., B.R. (1998). Device for detecting oxygen with oxidase. United States Patent 5,804,401.
- Gore, W. (2001). Method of desulfurization of hydrocarbons. United States Patent 6,274,785.
- Hangun, Y., Alexandrova, L., Khetan, S., Horwitz, C., Cugini, A., Link, D., Howard, B. y Collins, T. J. (2002). Oxidative desulfurization of fuels through TAML activators and hydrogen peroxide. *Petroleum Chemistry Division Preprints*. **47**(1) 42-44.
- Heinzkill, M., Bech, L., Halkier, T., Schneider, P. and Anke, T. (1998). Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (family coprinaceae). *Applied and Environmental Microbiology*. **64**(5):1601-1606.
- Ho, G. H., Liao, C. C. (1983). Activation of a siliceous carrier for enzyme immobilization. United States Patent 4,384,045.
- Hulea, V., Fajula, F. And Bousquet, J. (2001). Mild oxidation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> over Ti-containing molecular sieves. A very efficient method for removing aromatic sulfur compounds from fuels. *Journal of Catalysis*. **198**:179-186.
- Kobayashi, S. Nakano, M. Goto, T. Kimura, T. and Schaap, A. P. (1986). An evidence of the peroxidase-dependent oxygen transfer from hydrogen peroxide to sulfides. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **135**(1):166-171.
- Laane, C., Boeren, S., Vos, K. and Veeger, C. (1987). Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnology and Bioengineering*. **30**:81-87
- Li, K., Helm, R. F. and Eriksson, K. E. (1998). Mechanistic studies of the oxidation of a non phenolic lignin model compound by laccase/ 1-hydroxybenzotriazole redox system. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. **27**(pt.3): 239-243.
- Li, K., Xu, F. and Eriksson, K. E. (1999). Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**(6):2654-2660.
- Lu, J., Bender, C.J., McCracken J., Peisach, J. Severns, J.C. and McMillin, D.R. (1992). Pulsed EPR studies of the type 2 copper binding site in the mercury derivative of laccase. *Biochemistry*. **31**(27):6265-6272.
- Luo, M. F., Xing, J. M., Gou, Z. X., Li, S., Liu, H. Z. and Chen J. Y. (2003). Desulfurization of dibenzothiophene by lyophilized cells of *Pseudomonas delafieldii* R-8 in the presence of dodecane. *Biochemical Engineering Journal*. **13**:1-6.

- Maghsoudi, S., Vossoughi, M., Kheirilomoom, A., Tanaka, E. and Katoh, S. (2001). Biodesulfurization of hydrocarbons and diesel fuel by *Rhodococcus* sp. strain P32C1. *Biochemical Engineering Journal*. **8**:151-156.
- Majcherczyk, A., Johannes, C. (2000). Radical mediated indirect oxidation of a PEG-coupled polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) model compound by fungal laccase. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1474**:157-162.
- Majcherczyk, A., Johannes, C. and Hüttermann, A. (1998). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology*. **22**:335-341.
- Marzona, M., Pessione, E., Di Martino, S. and Giunta, C. (1997). Benzothiophene and dibenzothiophene as the sole sulfur source in *Acinetobacter*: growth kinetics and oxidation products. *Fuel Processing Technology*. **52**:199-205.
- Mashino, T., Nakamura, S. and Hirobe, M. (1990). Sulfide oxidation, amine N-demethylation, and olefin oxidation by heme-undecapeptide, microperoxidase-11, in the presence of hydrogen peroxide. *Tetrahedron Letters*. **31**(22):3163-3166.
- Mei, H., Mei, B. W. And Yen, T. F. (2003). A new method for obtaining ultra-low sulfur diesel fuel via ultrasound assisted oxidative desulfurization. *Fuel*. **82**:405-414.
- Ortiz-Leon, M., Velasco, L. and Vazquez-Duhalt, R. (1995). Biocatalytic oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by hemoglobin and hydrogen peroxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **215**(3):968-973.
- Palomeque, J., Clacens, J. M. and Figueras, F. (2002). Oxidation of dibenzothiophene by hydrogen peroxide catalyzed by solid bases. *Journal of Catalysis*. **211**:103-108.
- Penner-Hahn, J.E., Hedman, B., Hodgson, K.O., Spira, D.J. and Solomon, E.I. (1984). On the spectral features associated with peroxide reactivity of the coupled binuclear copper active site in type 2 depleted and native *Rhus* laccase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **119**(2):567-574.
- Pickard, M.A., Roman, M., Tinoco, R. and Vazquez, D.R. (1999 b). Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 laccase. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**(9):3805-3809.
- Rappas, A. S.; Nero, V. P; DeCanio, S. J. (2002). Process for removing low amounts of organic sulfur from hydrocarbon fuels United States Patent 6,406,616.
- Saillenfait, A. M. and Sabate, J. P. (2000). Comparative developmental toxicities of aliphatic nitriles: in vivo and in vitro observations. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **163**(2):149-163.
- Soares, M. B. Graça, Amorim, M. T. Pessoa, Hrdina, Radim and Costa-Ferreira Maria. (2001). Studies on the biotransformation of novel disazo dyes by laccase. *Process Biochemistry*. **37**(6):581-587.

- Solomon, E.I., Sundaram, U.M. and Machonkin, T.E. (1996). Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews*. **96**(7):2563-2605.
- Te, M., Fairbridge, C. and Ring, Z. (2001). Oxidation reactivities of dibenzothiophenes in polyoxometalate/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and formic acid/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> systems. *Applied Catalysis A:General*. **219**:267-280.
- Thurston, C.F., (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*. **140**:19-26.
- Torres, E., Vazquez-Duhalt, R. (2000). Chemical Modification of hemoglobin improves biocatalytic oxidation of PAHs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **273**:820-823.
- Van Mouwerik, M., Stevens, L., Dubler Seese, M. and Basham, W. (1997). Equilibrium partitioning estimates of water quality. In *Environmental Contaminants Encyclopedia Oil Spills Entry*. Irwin, R. J., National Park Service eds., <http://www.nature.nps.gov/toxic/oilspill.pdf> (15 enero del 2002).
- Vazquez-Duhalt, R., Westlake, D. W. S. and Fedorak. (1994). Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing organic solvents. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**(2): 459-466.
- Wang, D., Qian, E. W., Amano, H., Okata, K., Ishihara, A. And Kabe, T. (2003). Oxidative desulfurization of fuel oil part I. Oxidation of dibenzothiophenes using *tert*-butyl hydroperoxide. *Applied Catalysis A: General*. **253**:91-99.
- Watanabe, Y., Iyanagi, T. and Oae, S. (1982). One electron transfer mechanism in the enzymatic oxygenation of sulfoxide to sulfone promoted by a reconstituted system with purified cytochrome p-450. *Tetrahedron Letters*. **23**(5):533-536.
- Watanabe, Y., Iyanagi, T. and Oae, S.(1980). Kinetic study on enzymatic s-oxygenation promoted by a reconstituted system with purified cytochrome p-450. *Tetrahedron Letters*. **21**(38):3685-3688.
- Winkler, M.E., Spira, D.J., LuBien, C.D., Thamann T.J. and Solomon, E.I. (1982). Anion binding to oxidized type 2 depleted and native laccase: a spectroscopically effective model for exogenous ligand binding to the type 3-type 2 active site. *Biochemical and Biophysical Reseach Communications*. **107**(2):727-734.
- Woolery, G.L., Powers, L., Peisach, J. and Spiro, G. (1984). X-ray absorption study of *Rhus* laccase: evidence for a copper-copper interaction, which disappears on type 2 copper removal. *Biochemistry*. **23**:3428-3434.
- Xu, F. (1996) Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry*. **35**:7608-7614.

- Yazu, K., Yamamoto, Y., Furuya, T., Miki, K. and Ukegawa, K. (2001). Oxidation of Dibenzothiophenes in an Organic Biphasic System and Its Application to Oxidative Desulfurization of Light Oil. *Energy & Fuels*. **15**:1535-1536.

# **APENDICE**

**APÉNDICE**

**Anexo 1**

Según la ecuación de Michaelis-Menten

$$v_i = \frac{V_{\max} S_i}{K_M + S_i}$$

donde:

$v_i$  = Velocidad inicial

$V_{\max}$  = Velocidad máxima

$S$  = Concentración de sustrato

$K_M$  = Afinidad que tiene la enzima por el sustrato

$$v_i \approx \frac{\Delta P}{\Delta t}$$

donde:

$\Delta P$  = Incremento en la concentración del producto

$\Delta t$  = Incremento del tiempo

$$\Delta P = \frac{\Delta A}{\epsilon}$$

$\Delta A$  = Incremento de la absorbancia para el incremento  $\Delta t$  del tiempo

$\epsilon$  = Coeficiente de extinción molar

$$S = \Sigma \left[ v_i - \frac{V_{\max} S_i}{K_M + S_i} \right]^2$$

**Estimación no lineal de los parámetros de Michaelis-Menten**

$$S = \sum_{i=1}^n \left[ t_i - \frac{K_M \ln\left(\frac{1}{1-x_i}\right) + x_i S_0}{V_{\max}} \right]^2$$

$$x_i = \frac{S_0 - S_i}{S_0}$$

Donde:

S= Suma de cuadrados

t<sub>i</sub>= El tiempo observado

x<sub>i</sub>= Es el avance de la reacción para el tiempo observado

S<sub>0</sub>= Concentración inicial de sustrato

S<sub>i</sub> = Concentración de sustrato en el tiempo t<sub>i</sub>

K<sub>M</sub>= Valor estimado de la constante Michaelis-Menten

V<sub>max</sub> = Valor estimado de la velocidad máxima

El programa calcula los valores de K<sub>M</sub> y V<sub>max</sub> para los cuales:

$$\frac{\partial S}{\partial K_M} = \frac{\partial S}{\partial V_{\max}} = 0$$

(es un mínimo)

El valor:

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\max}}{E_0}$$

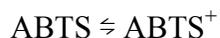
Donde:

$E_0$  = Es la concentración medida de la enzima

El valor

$$x_i = \frac{P_i}{S_0}$$

Proviene de la estequiometría de la reacción:



Y  $P_i$  se calcula de:

$$P_i = \frac{A_i}{\epsilon}$$

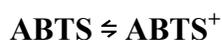
Siendo  $A_i$  la absorbancia a  $\lambda = 420$  nm y  $\epsilon$  el coeficiente de extinción molar.

Justificación:

Si la reacción obedece la ecuación de Michaelis-Menten.

$$\frac{dP}{dt} = \frac{V_{max} S}{K_M + S}$$

Pero  $\Delta P = -\Delta S$  si el coeficiente estequiométrico es la unidad



Y las concentraciones se miden en moles por litro

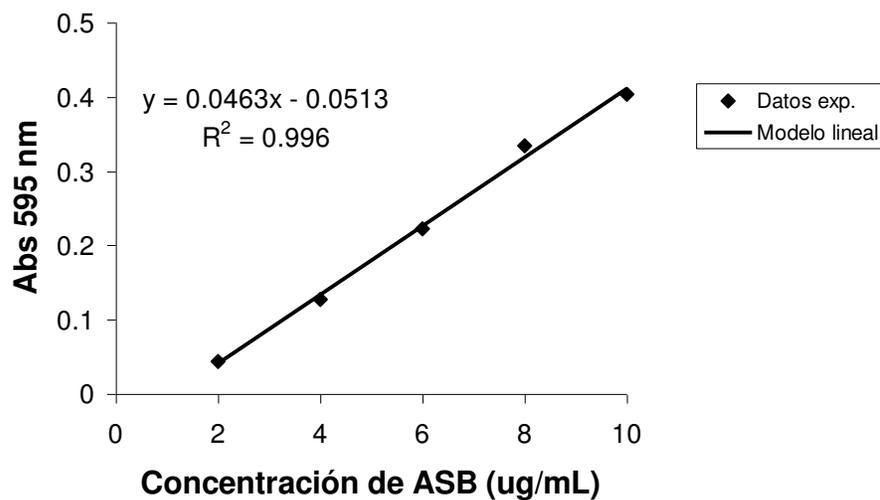
$$\frac{dP}{dt} = \frac{d(S_0 - S)}{dt} = - \frac{dS}{dt}$$

Por lo tanto:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{V_{\text{máx}} S}{K_M + S}$$

Anexo 2

Curva estándar de albúmina sérica bovina (ASB). La proteína se determinó por el método de Bradford.



Datos experimentales:

Concentración de ASB (ug/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Promedio
2	0.0404	0.0479	0.0441
4	0.1215	0.1336	0.1275
6	0.2178	0.2271	0.2224
8	0.3316	0.3361	0.3338
10	0.395	0.4123	0.4036

## Oxidation of dibenzothiophene by laccase or hydrogen peroxide and deep desulfurization of diesel fuel by the later

F. Villaseñor, O. Loera, A. Campero, G. Viniestra-González\*

*Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186 Col. Vicentina C.P. 09340, México D.F., Mexico*

Received 1 February 2003; received in revised form 1 November 2003; accepted 1 December 2003

### Abstract

Enzymatic oxidation of dibenzothiophene (DBT) catalyzed by laccase in the presence of 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) was compared with the chemical oxidation with hydrogen peroxide catalyzed by phosphotungstic acid. Enzymatic oxidation with laccase (2.4 U/ml) of 25  $\mu\text{M}$  DBT with 1.5 mM ABTS required a molar ratio  $[\text{O}_2]/[\text{ABTS}] = 140$  and 72 h at 40  $^\circ\text{C}$  in a water–acetonitrile reaction mixture, showing a rate constant of  $k_1 = 6.3 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ . Whereas peroxide oxidation of 10 mM DBT with 39  $\mu\text{M}$  phosphotungstic acid required only a molar ratio  $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{DBT}] = 2$ , showing a rate constant of  $k_2 = 6.1 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  in a hexane–ethanol system. A sample of diesel fuel, containing 342 ppm of sulfur, was chemically oxidized by an excess of hydrogen peroxide and 119  $\mu\text{M}$  phosphotungstic acid dissolved in ethanol, in less than 3 h at 60  $^\circ\text{C}$  and atmospheric pressure. No sulfur could be detected in these samples after an additional extraction with an equal volume of ethanol.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

*Keywords:* Laccase; Dibenzothiophene; Phosphotungstic acid; Deep desulfurization; Diesel

The presence of sulfur in fuels is considered a major source of atmospheric pollution because sulfur atmospheric discharge from combustion is a precursor of acid rain due to the formation of sulfur oxides. Sulfur-containing compounds, such as thiophenes and organic sulfides also poison chemical catalysts used to remove residual hydrocarbons and nitrogen oxides derived from combustion reactions. The conventional process to remove sulfur in fuels is known as catalytic hydrodesulfurization. This process applied to diesel fuel requires high temperatures (200–425  $^\circ\text{C}$ ) and high pressures ( $1.03 \times 10^6$ – $1.72 \times 10^6$  Pa) to remove

\* Corresponding author. Tel.: +52-5804-4662; fax: +52-5804-4712.

*E-mail address:* vini@xanum.uam.mx (G. Viniestra-González).

organic sulfur, present mainly in the form of dibenzothiophene derivatives [1]. Therefore, it seems interesting to develop new technologies for the removal of dibenzo[*b,d*]thiophene (DBT) and its derivatives in fuels under milder operational conditions. According to Hangun et al. [2], an alternative chemical process is the formation of sulfones, which are more polar than DBT and can be extracted with polar solvents such as acetonitrile or short chain alcohols [3]. Another interesting possibility is the use of enzymes, mainly peroxidases or peroxidase-like proteins [4–7]. The reaction catalyzed by peroxidase is very fast, but unfortunately the enzyme is inactivated by the presence of one of the substrates, hydrogen peroxide. Alternatively, Bressler et al. [8] proposed the use of more stable enzymes such as laccases together with mediators such as 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) or 1-hydroxybenzotriazole, but there are uncertainties about the kinetics and reproducibility of such a reaction (M.A. Pickard, personal communication, 2001). On the other hand, several authors have shown that it is possible to oxidize DBT by the action of hydrogen peroxide in the presence of low molecular weight catalysts like phosphotungstic acid [9], formic acid [10–12] and tetra-amido macrocyclic compounds called TAML [2,13,14]. In this process, the removal of nitrogen oxides and sulfones present in petroleum fuels can be accomplished by liquid to liquid extraction using polar solvents. For example, solvents with high values of Hildebrand solubility parameter,  $\delta$ , defined as the square root of the cohesive energy of a given solvent, expressed in relative units (J. Burke, <http://www.palimpsest.stanford.edu>). Gore [3] proposed the use of solvents with  $\delta > 22$  such as *n*-propanol ( $\delta = 24.9$ ), ethanol ( $\delta = 26.2$ ), methanol ( $\delta = 29.7$ ), ethylene glycol ( $\delta = 34.9$ ), glycerol ( $\delta = 36.2$ ) and water ( $\delta = 48$ ).

In this paper, a comparison of two process for DBT oxidation is presented: DBT oxidation catalyzed by a laccase enzyme in the presence of ABTS, and the chemical oxidation process using hydrogen peroxide and phosphotungstic acid. Additionally, results on the chemical oxidation and extraction of organosulfur compounds from a diesel fuel are presented, in order to show the feasibility of complete deep fuel desulfurization by the oxidative way.

## 1. Materials and methods

### 1.1. Enzyme laccase

The enzyme used was obtained as a gift from Novo Nordisk in the form of a commercial preparation called DeniLite II S. The laccase contained in this preparation represented 90% of the total protein. It was partially purified by acetone precipitation showing the following properties: MW = 80 kDa,  $k_{\text{cat}} = 713 \text{ min}^{-1}$ ,  $K_M = 0.2 \text{ mM}$  (at 40 °C, using ABTS as substrate) and optimal temperature close to 75 °C (unpublished data from J.I. López, 2002). Those properties correspond to features of laccase enzyme from *Myceliophthora termophila*, cloned in *Aspergillus oryzae* [15].

### 1.2. DBT oxidation with the laccase enzyme and ABTS

The reaction mixture contained 25  $\mu\text{M}$  DBT and 1.5 mM ABTS in a 0.1 M acetate buffer (pH 5) with acetonitrile 15% (v/v) and laccase 2.4 U/ml (269.23  $\mu\text{g}$  protein/

ml  $\approx$  3.4  $\mu$ M). The final volume was adjusted to 6 ml. The reactions were carried out in 120 ml tightly sealed serologic bottles, at 40 °C with constant stirring at 200 rpm. Head space in the bottles was flushed out with nitrogen for air displacement, and known volumes of pure oxygen were added, at local atmospheric pressure ( $p = 77.6 \times 10^3$  Pa). The assay was started by adding enzyme with a glass syringe injected through the rubber cap previously covered with teflon septum and was stopped by adding one volume of acetonitrile per volume of reaction mixture. Heat inactivated enzyme controls exhibited no activity. The acetonitrile was allowed to extract the products for 12 h. Then, after centrifugation (14,000 rpm, 15 min), 20  $\mu$ l samples were analyzed by HPLC by using a C<sub>18</sub> reverse-phase column (BONDCLONE 00H-2117-CO) purchased from Phenomenex, México.

### *1.3. DBT oxidation with hydrogen peroxide and phosphotungstic acid in hexane/polar dissolvent mixture*

The reaction mixtures containing 10 mM of DBT dissolved in 50 ml of hexane and then 12 ml of ethanol were added to 120 ml serological bottles. In these experiments, 39  $\mu$ M phosphotungstic acid were used as catalyst [9] with different amounts of a 30% solution of hydrogen peroxide (J.T. Baker). The reaction was ended by adding 2 ml of water and separating the reaction mixture in two phases, since phosphotungstic acid and hydrogen peroxide are not soluble in hexane. When acetonitrile was used instead of ethanol, 50 ml of acetonitrile were added to 50 ml of hexane to form a two-phase system. The DBT content in both phases was estimated by HPLC.

### *1.4. DBT distribution in two-phase systems*

DBT distribution in the two-phase systems (hexane/acetonitrile or hexane/ethanol) was studied. Acetonitrile does not mix with hexane, while absolute ethanol is completely miscible with hexane. However, two phases were formed in the hexane–ethanol system if a small volume of water was added. Then, distribution of 10 mM DBT between hexane and acetonitrile–water or ethanol–water phases was estimated by measuring the concentration of DBT in the two phases. The DBT concentrations were measured by HPLC using a standard calibration curve.

### *1.5. Diesel fuel desulfurization by hydrogen peroxide oxidation*

The reaction mixture contained (v/v) as final concentrations: diesel (48.8%); ethanol or acetonitrile (48.8%); different amounts of 30% solution of hydrogen peroxide adjusting the volume with water (2.4%) and 119  $\mu$ M phosphotungstic acid. The latter compound was previously dissolved in hydrogen peroxide solution. Reaction conditions were 60 °C for 3 h with steady and vigorous stirring. Before assaying for sulfur content, the reaction mixture was centrifuged (5000 rpm, 5 min) to separate the diesel phase. Dehydration was done with anhydrous calcium chloride (1 g/10 ml). A final centrifugation (5000 rpm, 5 min) produced an anhydrous diesel sample, and then sulfur content was assayed as indicated below.

### 1.6. Analytical determinations

Dibenzothiophene and the corresponding sulfone were obtained as standards from Aldrich. Samples were analyzed by HPLC, using the column described above under isocratic elution with acetonitrile–water mixtures, 60:40 (v/v), the flow was 1.5 ml/min and the compounds were monitored by absorbance ( $\lambda = 254$  nm).

The sulfur content in fuel was measured by two methods: X-ray fluorescence in liquid phase using a Horiba sulfur-in-oil-analyzer SLFA–1100H device and by gas chromatography (GC) with a sulfur specific photometric flame detector (FPD) having a  $30 \text{ m} \times 0.25$  cm SPB-20 column (Supelco). The GC program started at  $100$  °C for 2 min and the temperature raised to  $290$  °C at  $8$  °C/min, and was held for 10 min.

## 2. Results

### 2.1. DBT oxidation by the laccase-ABTS system

DBT oxidation by laccase was monitored by HPLC. Fig. 1 shows that DBT peak decreased only with a complete reaction mixture: DBT + ABTS + enzyme. In this case, the head space was filled with air, since the reaction did not proceed with pure nitrogen (results not shown). Negative controls, lacking either, DBT, ABTS or with inactive

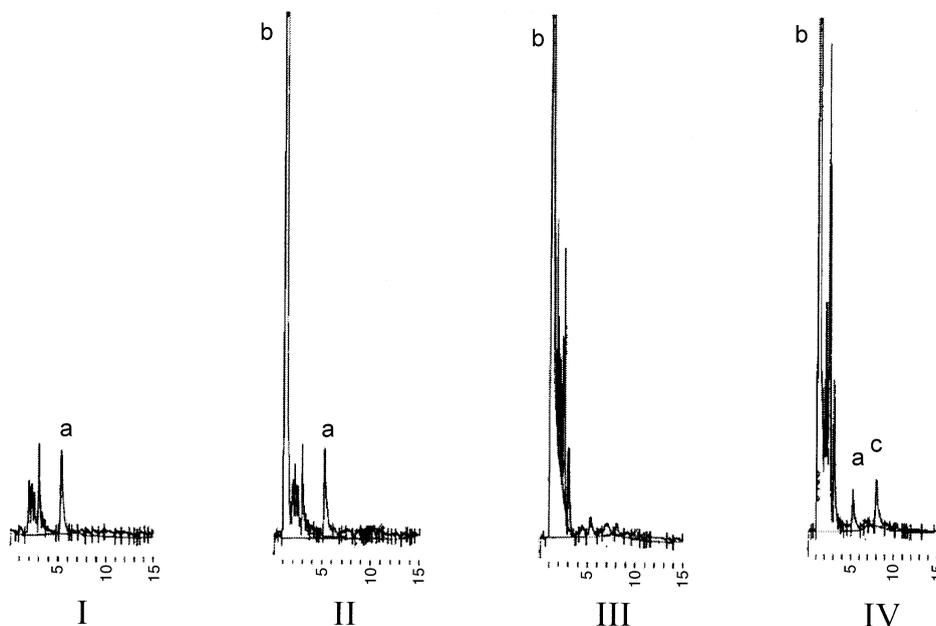


Fig. 1. HPLC profiles of DBT oxidation with the laccase enzyme and ABTS with air after 72 h at  $40$  °C. I: negative control without ABTS, II: negative control with inactive enzyme, III: negative control reaction mixture without DBT and IV: reaction with DBT. The labelled peaks correspond to DBT (a), ABTS (b) and product (c).

enzyme showed no reaction at all. Interestingly, in the complete reaction mixture, DBT decreased by 45% as compared with the negative controls. In such a case, a new peak was detected with longer retention time ( $t_R = 7.98$  min). The increase in retention time of that product may be explained by the formation of a polymer with lower polarity than DBT. The lack of quantitative agreement between reactant and product peaks may be related to different extinction coefficients or to the presence of a blue precipitate in the bottom of acetonitrile phase. Thus in addition to DBT oxidation, the resulting products might be found in this precipitate. No attempt was made to further characterize those products.

In order to improve the DBT oxidation different molar ratios,  $[O_2]/[ABTS]$  were assayed after 48-h incubation at 40 °C. Fig. 2 shows the influence of oxygen on DBT transformation. The plot was fit by hyperbolic curve, showing asymptotic trend when the molar ratio  $[O_2]/[ABTS] > 50$ , and with nearly completion when this molar ratio was 140. This showed that oxygen was needed in large excess. It is worth recalling that oxidized ABTS was reported to oxidize substrates in the absence of the enzyme [16]. However, our attempts to oxidize DBT by direct contact of oxidized ABTS, separated from the laccase were unsuccessful. This supports a non-stoichiometric role for oxygen in this complex reaction, involving the oxidation and possibly recycling of ABTS between enzyme and DBT, using oxygen as a final electron acceptor and perhaps a driving force by excess oxygen, for the stabilization of unknown intermediates. DBT oxidation was accompanied by a blue precipitate, insoluble in both acetonitrile or in water. Polymer formation derived from DBT oxidation may be an interesting way to remove sulfur compounds as has been reported by Collins [14].

Fig. 3 shows the kinetics of DBT oxidation by the laccase-ABTS system with a molar ratio  $[O_2]/[ABTS] = 396$ . The reaction was accomplished using the acetonitrile–water system. The pseudo-first order rate constant was  $k_1 = -6.3 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ . This result shows two major drawbacks of the laccase-ABTS system. It is a very slow process with a half-life for DBT close to 18.5 h and requires a large excess of oxygen and mediator. We

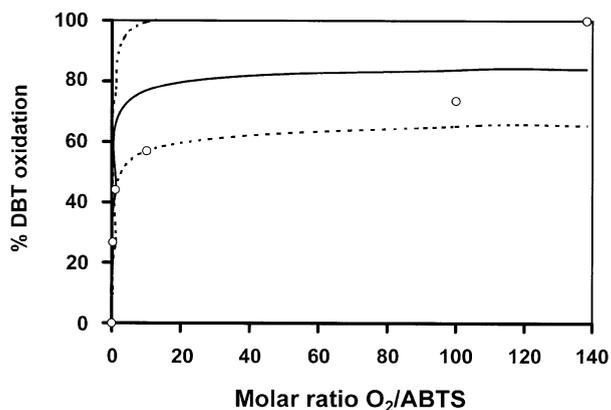


Fig. 2. Relation between the extent of DBT oxidation and the ratio  $[O_2]/[ABTS]$  after 3 days of incubation with 4 U/ml of laccase and 1.5 mM ABTS at 40 °C in sealed bottles. Experimental data (○), fit to experimental data (—), range of confidence at 95% (---).

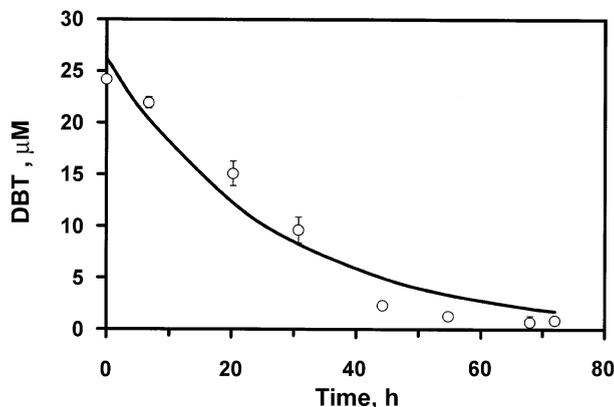


Fig. 3. Kinetics of DBT oxidation in water–acetonitrile system by laccase enzyme and ABTS mediator at 40 °C and initial molar ratio  $[O_2]/[ABTS]=396$ .

have not succeeded to increase the rate of DBT oxidation by increasing temperature because oxidized ABTS (azodication form) is a heat labile compound (results not shown). Nevertheless, the laccase-mediated ABTS oxidation is very fast with an apparent first order rate constant  $k_0 = k_{cat}[E]/K_M = 12 \text{ min}^{-1}$  estimated from a Michaelis–Menten kinetics when  $K_M \gg [S]$  (data in Section 1). This shows that the limiting step is the non-enzymatic oxidation of DBT by oxidized ABTS, which happens to be a rather slow process as compared to the reported rates of reaction with other organic catalysts, such as TAML [2].

## 2.2. DBT distribution between hexane and a polar phase

Yazu et al. [9] reported the use acetonitrile in order to extract DBT from light fuel and oxidize it in this phase. Nevertheless, acetonitrile has been reported to be a toxic compound [17]. We have compared the use of acetonitrile and ethanol–water mixtures as extractants of DBT from a hydrocarbon phase. DBT was used as a model compound. Table 1 shows the distribution of DBT (10 mM) in 10 ml of hexane, after adding 2.4 ml of polar solvent (ethanol or acetonitrile) and 0.5 ml of water. (These proportions of hexane, solvent and water were the same to mixtures described below concerning DBT oxidation by phosphotungstic acid using ethanol as a solvent.) DBT was much more soluble in

Table 1

Distribution of DBT (10 mM) in 10 ml of hexane in the two phase system constituted by 2.4 ml of solvent (ethanol or acetonitrile) and 0.5 ml of water

Two phase system	Concentration DBT (mM)		% total DBT	
	Hexane	Solvent and water	Hexane	Solvent and water
Hexane/acetonitrile water	9.2	4.4	87.9	12.1
Hexane/ethanol water	9.4	3.1	91.3	8.7

Villaseñor et al.: oxidation of dibenzothiophene by laccase or hydrogen peroxide and deep desulfurization of diesel fuel by the latter.

hexane than in acetonitrile or ethanol as shown in Table 1. Hence, both solvents can be used to extract DBT from a hydrocarbon phase, as suggested by Gore [3]. Also, both solvent systems are able to accomplish the extraction of oxidized sulfur compounds. Ethanol has the advantage of low toxicity, as compared to acetonitrile, although when using acetonitrile it is not necessary to add water to have separation of two phases.

### 2.3. DBT oxidation by hydrogen peroxide with phosphotungstic catalyst

The chemical oxidation of DBT was carried out in a reaction mixture containing 10 mM DBT dissolved in hexane (50 ml), and ethanol (12 ml), hydrogen peroxide (76 mM) and 39  $\mu$ M phosphotungstic acid. In this system, almost all DBT was oxidized after 1 h. Fig. 4 shows liquid chromatography (HPLC) profile of the DBT oxidation with hydrogen peroxide and phosphotungstic acid in hexane–ethanol system at different times. DBT peak decreased simultaneously with the appearance of two new peaks, one corresponding to dibenzo[*b,d*]thiophene 5-oxide (DBT sulfoxide) in the hexane phase and the other one corresponding to dibenzo[*b,d*]thiophene 5,5-dioxide (DBT sulfone) in the ethanol phase. When the reaction was allowed to proceed longer, DBT oxidation formed a solid precipitate in the ethanol phase. This solid material was dissolved in acetonitrile and analyzed by HPLC. It had the same retention time as compared to DBT sulfone standard.

Fig. 5 shows the kinetics of DBT oxidation in hexane, as a function of hydrogen peroxide concentration, using 39  $\mu$ M phosphotungstic acid as a catalyst. Hydrogen peroxide concentration had little effect on the initial rate of the reaction. However, a molar ratio  $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{DBT}]=2$  was required for the reaction to be completed. This stoichiometric relation is compatible with a reaction of two stages, in which the DBT

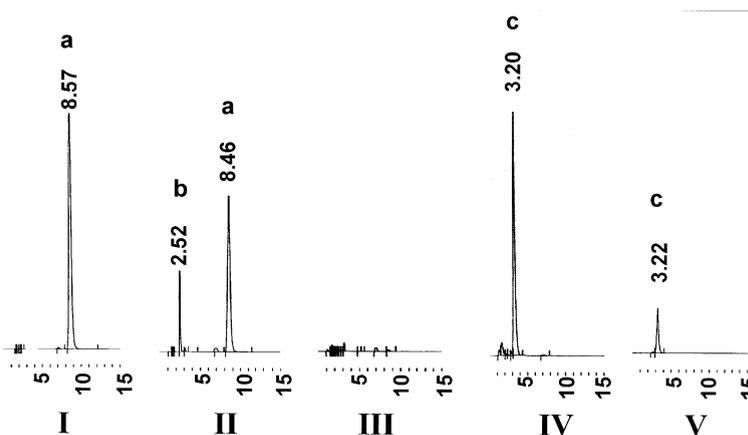


Fig. 4. HPLC profile of the DBT oxidation with hydrogen peroxide and phosphotungstic acid in hexane–ethanol system. I: 0 min, DBT (4.52 mM) in the hexane phase after a 1:1 dilution with pure hexane; II: 25 min, DBT (2 mM) in the hexane phase; III: 120 min, DBT (0.003 mM) in the hexane phase; IV: 120 min, DBT sulfone (14 mM) in the ethanol phase; V: DBT sulfone standard (2.5 mM). The labelled peaks correspond to DBT (a), DBT sulfoxide (b) and DBT sulfone (c). Numbers above peaks represent retention times (min).

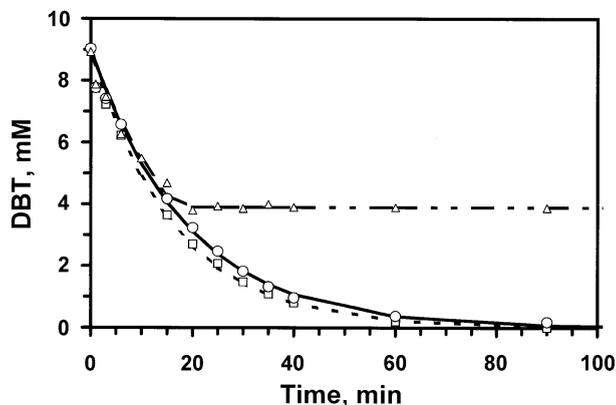


Fig. 5. Oxidation kinetics of 10 mM DBT in hexane–ethanol system, using different concentrations of hydrogen peroxide, (Δ) 9.8 mM, (○) 24.5 mM and (□) 97.9 mM.

sulfoxide formation is the first stage and then DBT sulfone formation is the second one. Thus, one mol of hydrogen peroxide would be required for each step. When hydrogen peroxide was at 9.8 mM, DBT decreased from 10 mM down to 5 mM confirming the molar ratio mentioned above. This indicates that ethanol was not significantly oxidized by hydrogen peroxide since the total concentration of the later was utilized to oxidize DBT.

The effect of the molar ratio  $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{DBT}]$  on the DBT pseudo first rate oxidation constant ( $k_2$ ) was determined. It was  $k_2 = -4.9 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  for  $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{DBT}] = 0.98$ ,  $k_2 = -5.3 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  for  $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{DBT}] = 2.4$  and  $k_2 = -6.1 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  for  $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{DBT}] = 9.8$ .

Selectivity of this reaction was analyzed using both DBT and 9H-fluorene (fluorene), under the same conditions as described above. DBT was totally oxidized after 60 min, while fluorene was not modified (data not shown). These results point out the selectivity of this reaction on sulfur compounds as discussed by Collins [14].

#### 2.4. Diesel fuel desulfurization by chemical oxidation

Chemical oxidation of sulfur compounds in diesel, containing 342 ppm of sulfur, with hydrogen peroxide and catalyzed by 119  $\mu\text{M}$  phosphotungstic acid, was done as indicated in Section 1. Fig. 6 shows the comparison of hydrocarbon and sulfur profiles, of control and treated samples as detected by FPD with (a') and without (a) sulfur detection systems. The hydrocarbon profile of control sample (Fig. 6a) was practically the same than the treated sample (Fig. 6b) showing that hydrogen peroxide oxidation did not remove any significant fraction of diesel fuel. Nevertheless, the sulfur profile of treated sample (Fig. 6b') had a much weaker signal than the control sample (Fig. 6a'). Also, the retention times of the organosulfur compounds in the treated sample were longer than in the control sample, showing an increase in the boiling point of most sulfur compounds due to the oxidation process. Those results are consistent with a rather selective oxidation and removal of sulfur compounds in the diesel mixture, as shown in Fig. 7.

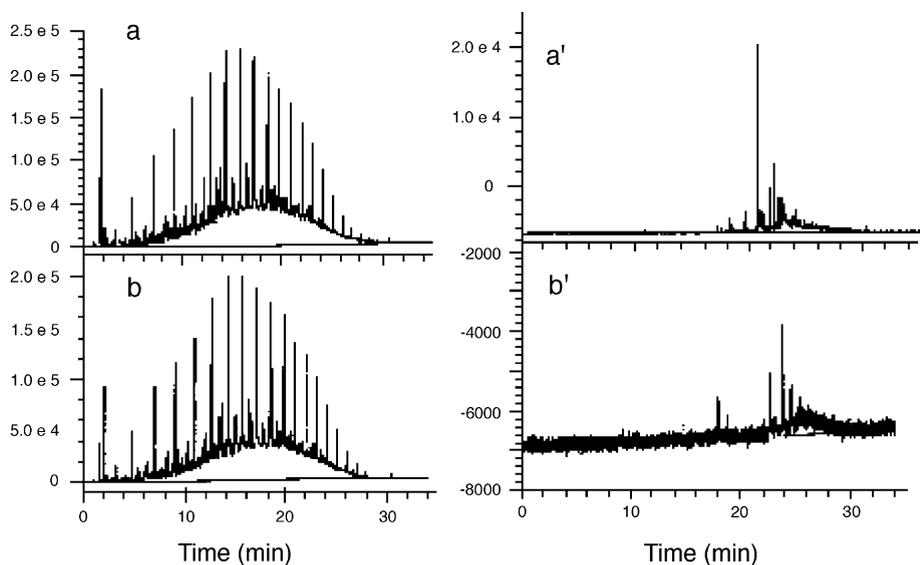


Fig. 6. Relative hydrocarbon profiles of diesel fuel obtained in a photometric flame analyzer (FPD). Panel (a): Total hydrocarbon profile (control); (a') sulfur hydrocarbon profile (control); (b) total hydrocarbon profile after the reaction with peroxide and phosphotungstic acid using ethanol as solvent; (b') sulfur hydrocarbon profile after the reaction with peroxide and phosphotungstic acid using ethanol as solvent. Ordinates are given in arbitrary attenuation scales.

One extraction step of oxidized diesel fuel with ethanol removed 68% of sulfur oxidized compounds, while one extraction step with acetonitrile removed 77%. Thus, ethanol can be considered as a good option as an extractant of the oxidized product in these reactions since its removal capacity of sulfur oxidized compounds from diesel is similar to that obtained with acetonitrile, with the additional advantage that ethanol is not toxic.

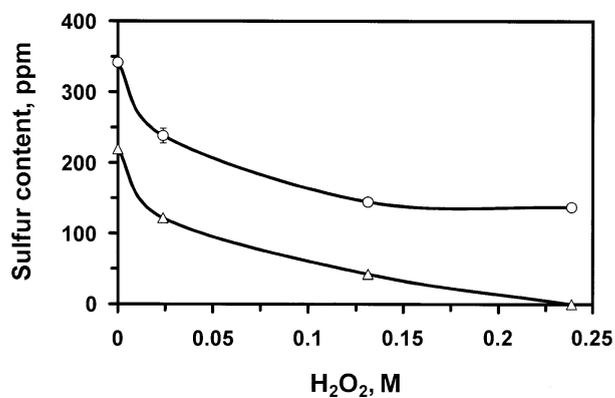


Fig. 7. Effect of the hydrogen peroxide concentration on sulfur removal in diesel, using the ethanol as extractant, (O) after reaction, ( $\Delta$ ) after reaction and one extraction with an equal volume of ethanol.

The effect of hydrogen peroxide concentration on sulfur removal in diesel was determined using 119  $\mu\text{M}$  phosphotungstic acid as catalyst and then extracted by an equal volume of ethanol (Fig. 7). Removal of sulfur in this system as a function of hydrogen peroxide concentration followed an inverse saturation pattern, in which hydrogen peroxide concentration higher than 0.24 M produced a diesel containing less than 5 ppm of sulfur, below the detection limit of the X-ray fluorescence. In a negative control where hydrogen peroxide was replaced by an equal volume of water, and after one extraction with ethanol, the sulfur content decreased only from 342 to 254 ppm. Final reduction of sulfur content with 0.24 M hydrogen peroxide was from 342 ppm down to no detectable values (less than 5 ppm), as show in Fig. 7. It is worth noticing that the best molar ratio for  $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{S}]$  was higher than 10, since the estimated molar concentration of sulfur compounds was close to 10 mM. This result shows that hydrogen peroxide, in the presence of a convenient catalyst, does not have important limitations to oxidize the sulfur organic compounds present in diesel fuel, since it was possible to remove all the oxidized sulfur compounds present in this fuel.

### 3. Conclusions

Results presented in this paper confirm that enzyme laccase in presence of 1.5 mM of mediator ABTS can oxidize 25  $\mu\text{M}$  of DBT in reaction mixture with 15% of acetonitrile (% v/v) at 40 °C, showing a rate constant of  $k_1 = -6.3 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ . This is a rather low rate process hindering the use of laccase system as a practical process for deep desulfurization. The limiting step of this process seems to be the oxidation of DBT by oxidized ABTS, rather than oxidation of ABTS by laccase. On the other hand, 25 mM hydrogen peroxide supplemented with 39  $\mu\text{M}$  phosphotungstic acid can oxidize 10 mM DBT dissolved in hexane with a half-life time around 11 min, at atmospheric pressure and 60 °C, corresponding to rate constant of  $k_2 = -6.1 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ . The main product was DBT sulfone with no effect on fluorene. It was also shown that ethanol can be nearly as effective extractant of DBT from hexane as acetonitrile, which in turn allows DBT oxidation to occur in the polar phase.

Finally, it was found that the sulfur bound to organic compounds of commercial diesel could be removed down to non detectable limits from an initial concentration of 342 ppm using hydrogen peroxide and phosphotungstic acid.

Present evidence favours the use of hydrogen peroxide with appropriate abiotic catalysts as a feasible technique for deep desulfurization of commercial fuels, such as diesel fuel. Enzyme catalysis by laccase would require the development of a much faster reaction scheme with a better mediator than ABTS. It should be stressed that DBT and some similar sulfur compounds present in diesel fuel can be effectively removed, after oxidation, using ethanol. Although other similar cheap extractants can also be used, such as methanol as suggested by Gore [3] to yield a fuel with sulfur content lower than 15 ppm. Sulfur oxidation has the advantage over deep hydrodesulfurization, of being feasible at 60 °C and atmospheric pressure, without appreciable modification of the non-sulfur hydrocarbons present in the fuel.

## Acknowledgements

Excellent technical assistance by Carmen Fajardo during most of the instrumental work. Technical cooperation and significant criticism provided by Dr. Rafael Vazquez-Duhalt (Instituto de Biotecnología, UNAM). Technical advice and help by Dr. Jorge Soriano for laccase purification. Also, technical assistance for sulfur determination analysis by Gladys Castorena from Instituto Mexicano del Petróleo (IMP). This project was partially financed by project FIES-98112-2 from IMP. F. Villaseñor had a doctoral fellowship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) and was granted a leave of absence from Instituto Tecnológico de Celaya.

## References

- [1] A. Wang, Y. Wang, T. Kabe, Y. Chen, A. Ishihara, W. Qian, P. Yao, *Journal of Catalysis* 210 (2002) 319–327.
- [2] Y. Hangun, L. Alexandrova, S. Khetan, C. Horwitz, A. Cugini, D.D. Link, B. Howard, T.J. Collins, *Petroleum Chemistry Division Preprints* 47 (2002) 42–44.
- [3] W. Gore, United States Patent 6,274,785 (2001).
- [4] A.R. Pokora, M.A. Johnson, United States Patent 5,178,762 (1993).
- [5] R. Vazquez-Duhalt, D.W.S. Westlake, P.M. Fedorak, *Enzyme and Microbial Technology* 15 (1993) 494–499.
- [6] M. Ayala, R. Tinoco, V. Hernandez, P. Bremauntz, R. Vazquez-Duhalt, *Fuel Processing Technology* 57 (1998) 101–111.
- [7] M. Ayala, N. Robledo, A. Lopez-Munguia, R. Vazquez-Duhalt, *Environmental Science and Technology* 34 (2000) 2804–2809.
- [8] D.C. Bressler, P.M. Fedorak, M.A. Pickard, *Biotechnology Letters* 14 (2000) 1119–1125.
- [9] K. Yazu, Y. Yamamoto, T. Furuya, K. Miki, K. Ukegawa, *Energy & Fuels* 15 (2001) 1535–1536.
- [10] D. Chapados, Petro. Star. Presentation, National Petrochemical and Refiners Association, Annual Meeting, San Antonio, 2000 March 26–28.
- [11] A.S. Rappas, United States Patent 6,402,940 (2002).
- [12] A.S. Rappas, V.P. Nero, S.J. DeCanio, United States Patent 6,406,616 (2002).
- [13] T.J. Collins, *Accounts of Chemical Research* 27 (1994) 279–285.
- [14] T.J. Collins, *Accounts of Chemical Research* 35 (2002) 782–790.
- [15] R.M. Berka, P. Schneider, E.J. Golightly, S.H. Brown, M. Madden, K.M. Brown, T. Halkier, K. Mondorf, F. Xu, *Applied and Environmental Microbiology* 63 (1997) 3151–3157.
- [16] A. Majcherczyk, C. Johannes, *Biochimica et Biophysica Acta* 1474 (2000) 157–162.
- [17] A.M. Saillenfait, P. Sabate, *Toxicology and Applied Pharmacology* 163 (2000) 149–163.