

# Construcción de una cascada quimio-enzimática heterogénea: optimización de la actividad peroxidasa inmovilizada

## Building a heterogeneous chemo-enzymatic cascade: optimization of immobilized peroxidase activity

Presentación: 4 y 5 de Octubre de 2022

### Doctorando:

#### **Fabrizio Emiliano Viale**

Centro de Investigación y Tecnología Química, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Facultad Regional Córdoba, Universidad Tecnológica Nacional - Argentina  
fviale@frc.utn.edu.ar

### Director:

#### **Gabriel Orlando Ferrero**

### Codirectoras:

#### **Tamara Belén Benzaquén**

#### **Verónica Rita Elías**

### Resumen

La aplicación de tecnologías sustentables y eliminación de contaminantes ha dado lugar a la utilización de enzimas como complementos de catalizadores tradicionales por su increíble selectividad y trabajo a temperatura y pH moderado. Se plantea utilizar materiales mesoporosos modificados con metales de transición para generar radicales superóxido y soportar las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y peroxidasa de rábano (HRP). En esta cascada quimio-enzimática, los superóxidos generados serán sustrato de SOD para generar  $H_2O_2$  *in situ*, el cual será utilizado por HRP para oxidar materia orgánica. Se presenta la optimización de la etapa final, evaluándose la actividad de HRP libre e inmovilizada en soportes SBA-15 o Cr/Ti/SBA-15. La actividad de HRP fue óptima a una concentración 1,4 mM de  $H_2O_2$ , obteniéndose gran parte de la reacción en los primeros minutos. Por otro lado, la menor superficie de Cr/Ti/SBA-15 disminuyó la actividad enzimática en ese soporte frente a SBA-15 sin modificar.

Palabras clave: Peroxidasa de rábano picante, Catálisis heterogénea enzimática, Cascada quimio-enzimática, Sílices mesoporosas.

### Abstract

The application of sustainable technologies and degradation of toxic pollutants has given room to the use of enzymes as complements of traditional catalysts due to their high selectivity and work at moderate temperature and pH conditions. The use of mesoporous materials modified with transition metals is proposed to generate superoxide radicals and serve as support for the enzymes superoxide dismutase (SOD) and horseradish peroxidase (HRP). The induced superoxide radicals will serve as SOD substrates in order to generate  $H_2O_2$  *in situ*, which will then be used by HRP to oxidize organic molecules in this chemo-enzymatic cascade. The free-HRP

and SBA-15 or Cr/Ti/SBA-15 immobilized HRP activity was evaluated to optimize the last step of the chemo-enzymatic cascade, as presented in this study. HRP activity reached an optimum at 1.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, with a large part of the reaction occurring within the first minutes. On the other hand, the smaller surface of the Cr/Ti/SBA-15 material diminished the enzyme's activity in that support compared to that in unmodified SBA-15.

Keywords: Horseradish peroxidase, Enzymatic heterogeneous catalysis, Chemo-enzymatic cascade, Mesoporous silica.

## Introducción

En los últimos años la preocupación por los altos niveles de contaminación y por los efectos globales del cambio climático, han sido el incentivo para el desarrollo de la denominada química verde. Esta nueva tendencia busca la reducción de emisiones contaminantes, un uso más eficiente de la energía, la eliminación de desechos tóxicos y la sustitución de compuestos petroquímicos por fuentes renovables. Una de las alternativas más prometedoras para cumplir con estos requisitos es el uso de enzimas como sustitutos de los catalizadores tradicionales. Además de ser totalmente renovables, estas proteínas son capaces de generar productos muy complejos de una manera extraordinariamente selectiva y operando en condiciones de temperatura y pH moderados. Sumado a esto, inmovilizar una enzima puede mejorar su estabilidad y permitir su múltiple reutilización, lo que resulta en un mayor rendimiento y, por lo tanto, en una mayor viabilidad comercial (Sheldon y Woodley, 2018; Ferrero et al., 2020). A partir de la inmovilización enzimática también surge la posibilidad de generar reacciones en cascada multicatalíticas. Estas reacciones simultáneas de varios pasos permiten evitar etapas de purificación de intermediarios de reacción, que a menudo contribuyen significativamente al costo y al impacto ambiental de un proceso (Schrittwieser et al., 2018). Inclusive se puede lograr complementar una etapa química con otra enzimática, lo cual permite combinar las ventajas de ambos tipos de reacciones, y por lo general las reacciones en cascada son más eficientes que la suma de los pasos individuales (Losada-García et al., 2020).

El uso de peroxidasas como la HRP en química orgánica ofrece una alternativa ecológica a muchas de las reacciones de oxidación conocidas (Hamid y Khalil-ur-Rehman, 2009). Estas enzimas son capaces de utilizar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en reemplazo de costosos cofactores como la Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato (NADPH) o flavinas, para llevar a cabo reacciones como la hidroxilación de carbonos no activados, la polimerización de ciertos compuestos fenólicos o la degradación de tintas u otros contaminantes (Bankar et al., 2009; Ni et al., 2009). Todas estas reacciones se desarrollan de manera extraordinariamente precisa en ambientes acuosos con pH neutro y a temperatura ambiente, lo cual evita el uso de disolventes, la generación de residuos alcalinos o ácidos y reduce la energía necesaria para calefaccionar los reactores. En particular, el empleo de tales enzimas inmovilizadas para Procesos Avanzados de Oxidación aplicados a la degradación de materia orgánica podría representar una alternativa claramente ventajosa frente a los procesos Fenton y fotoFenton convencionales, teniendo en cuenta que los mismos, en general, resultan efectivos a bajas condiciones de pH con la consecuente generación de efluentes ácidos (Xiao et al., 2020; Gutiérrez et al., 2019). Entre las vías más comúnmente empleadas para proveer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a la enzima, logrando una óptima actividad y estabilidad, se encuentran la adición lenta de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluido o la producción *in situ* de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La producción *in situ* de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede lograrse mediante el acople de otra enzima, la SOD, que utiliza como sustrato el radical superóxido para generar especies menos reactivas (O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Abreu y Cabelli, 2009; Nosaka y Nosaka, 2017). A su vez, la ingeniería de materiales ha trabajado en el desarrollo de silicatos mesoporosos modificados con metales de transición (Cr, Ti, Fe, Co, etc.) para generar especies reactivas de oxígeno (como el radical superóxido, O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) a partir de O<sub>2</sub> para la degradación de contaminantes acuosos (Elías et al., 2012; Elías et al., 2016). De estos antecedentes es que se propone construir una cascada quimio-enzimática heterogénea impulsada por luz para la oxidación de materia orgánica (Figura 1).

En este trabajo se muestra la optimización de la actividad de la enzima HRP respecto al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con el fin de conocer las concentraciones ideales que deben ser producidas *in situ* para lograr desarrollar una cascada enzimática. Entre las innumerables moléculas orgánicas susceptibles de ser oxidadas, se utilizó fenol como sustrato modelo.

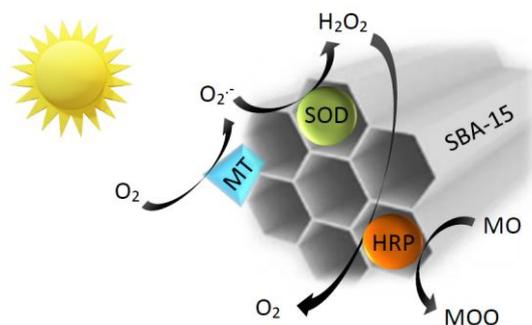


Figura 1: Diagrama de la cascada quimioenzimática impulsada por luz. Los electrones del metal de transición (MT) depositado en la superficie del silicato SBA-15 son fotoexcitados, generando en presencia de  $O_2$  radicales superóxidos. Éstos se convierten posteriormente en  $H_2O_2$  por acción de la SOD. Luego, este  $H_2O_2$  generado *in situ* es utilizado por la HRP para la degradación (MOO, materia orgánica oxidada) de la materia orgánica (MO)

## Material y método

Se sintetizaron sílices mesoporosas SBA-15 utilizando el método sol-gel (Zhao et al., 1998), utilizando tetraetilortosilicato (TEOS) como fuente de silicio, pluronic acid P123 como agente director de estructura y HCl para hidrólisis y ajuste de pH. El sólido resultante se filtró, lavó con agua destilada y secó a  $60^\circ C$ . Posteriormente se removió el P123 por calcinación a  $500^\circ C$  por 6 horas con una rampa de calentamiento de  $1^\circ C/min$ . La estructura de la SBA-15 sintetizada fue evaluada por difracción de rayos X a bajo ángulo (DRX).

Parte del material obtenido se modificó post-síntesis por impregnación húmeda para incorporar Cr (2,5%) y Ti (20%) a la matriz silícea. Primero se realizó una solución de agua destilada y  $Cr(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$  que se mezcló con el material SBA-15 obtenido en el paso anterior. Luego se evaporó el solvente en evaporador rotatorio a  $50^\circ C$ . El sólido obtenido se secó a  $60^\circ C$  y se calcinó a  $500^\circ C$  por 5 horas con una rampa de calentamiento de  $10^\circ C/min$ . Una vez obtenido el material modificado con Cr, se coimpregnó el material con Ti realizando la misma cadena de pasos, pero a partir de una solución de isopropanol y n-butóxido de titanio ( $Ti(OBu)_4$ ).

Posteriormente se procedió a inmovilizar la enzima HRP (Cat. N°P8250, Sigma Aldrich, 150-250 unidades/mg) en soportes SBA-15 y Cr/Ti/SBA-15. Se suspendió el soporte mesoporoso en una solución enzimática 0,1 mg/mL de HRP en buffer fosfato 25 mM, pH 7 siguiendo el método de Chouyyok et al. (2009).

Finalmente se evaluó la actividad de la enzima HRP libre, inmovilizada en soporte SBA-15 (HRP/SBA-15) e inmovilizada en soporte Cr/Ti/SBA-15 (HRP/Cr/Ti/SBA-15), trabajando con distintas concentraciones iniciales de  $H_2O_2$  (0,7-1,4-2,8 mM) en buffer fosfato 25 mM, pH 7 con fenol 20 ppm como contaminante modelo (5 mL de volumen de reacción). La reacción se llevó a cabo incluyendo un plazo de 45 minutos para la adsorción del fenol en la superficie de los materiales mesoporosos en fase heterogénea (tiempo 0), tomándose luego muestras a 30, 60 y 120 minutos. Esta reacción se realizó en reactores batch de vidrio de 10 mL equipados con un agitador magnético a temperatura ambiente. Los reactores contaban con 10 mg de material mesoporoso por reacción o 200  $\mu L$  de solución 0,1 mg/ml de HRP en el caso de las reacciones con enzima libre.

Las concentraciones de fenol en cada muestra fueron determinadas por HPLC-UV a 268 nm de longitud de onda, según el método indicado por Silva et al. (2013). Por otro lado, el grado de inmovilización de la enzima en los soportes SBA-15 y Cr/Ti/SBA-15 se evaluó midiendo la absorbancia de los sobrenadantes de inmovilización y de la solución de enzima libre por espectrofotometría UV/visible y el coeficiente de absortividad molar de la HRP ( $102000 M^{-1}cm^{-1}$ ) a 403 nm (Ohlsson y Paul, 1976).

## Resultados

Para evidenciar la estructura mesoporosa del material SBA-15 sintetizado se realizó un DRX. Como se puede observar en el espectro (Figura 2), el material SBA-15 muestra la presencia de picos bien definidos que pueden indexarse a los planos (1 0 0), (1 1 0) y (2 0 0). Estos picos están asociados con la presencia de una estructura porosa altamente ordenada con una disposición de poros hexagonales del tipo SBA-15. Posteriormente, el

material fue modificado por impregnación húmeda con los metales cromo y titanio para obtener Cr/Ti/SBA-15 como se indica en Material y método. Ambos materiales fueron utilizados como soporte para la enzima HRP.

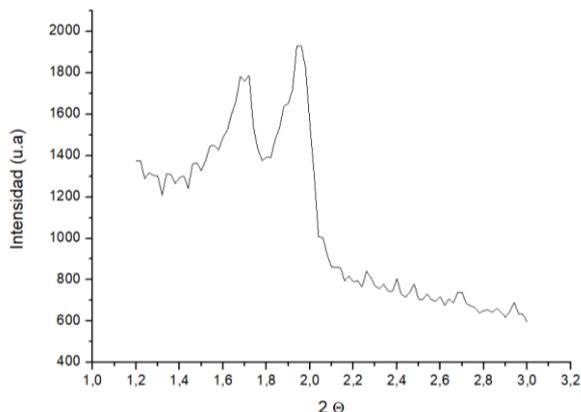


Figura 2: Espectro DRX para el material SBA-15 sintetizado

Utilizando el coeficiente de extinción molar de la HRP ( $102000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) se determinó el contenido de enzima en los sobrenadantes ( $0,02 \mu\text{M}$ ) de los materiales que fueron incubados con la enzima, indicando una inmovilización del 89% al compararla con la cantidad de enzima libre ( $0,18 \mu\text{M}$ ).

Para evaluar la estabilidad del fenol frente a los materiales y los catalizadores enzimáticos heterogéneos (enzima + material) durante la reacción, se realizaron los controles con los materiales (SBA-15 y Cr/Ti/SBA-15) y los catalizadores enzimáticos heterogéneos (HRP/SBA-15 y HRP/Cr/Ti/SBA-15) en ausencia de peróxido; los resultados se muestran en las tablas 1 y 2:

t (min)	C/C <sub>0</sub>	
	SBA-15	HRP/SBA-15
0	86,33%	82,52%
30	81,55%	82,17%
60	84,32%	82,48%
120	88,98%	76,63%

Tabla 1: Porcentaje de fenol soluble presente durante la reacción

t (min)	C/C <sub>0</sub>	
	Cr/Ti/SBA-15	HRP/Cr/Ti/SBA-15
0	80,00%	85,55%
30	83,13%	83,57%
60	82,38%	90,93%
120	80,44%	95,15%

Tabla 2: Porcentaje de fenol soluble presente durante la reacción

Como se puede observar, en el tiempo cero ya existe una disminución de la cantidad del fenol debido a la adsorción de éste en la superficie del material mesoporoso. Las cantidades de fenol determinadas a  $t_0$  y  $t_{120}$  tanto para los materiales como para los catalizadores enzimáticos indican que es estable y no es degradado por el material o la enzima en dichas condiciones de reacción.

La actividad enzimática para degradar fenol se evaluó en función de la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  como se muestra en las tablas 3 y 4. Ambos catalizadores enzimáticos heterogéneos presentan la mayor degradación del fenol con una concentración inicial de  $1,4 \text{ mM}$ . A concentraciones muy bajas la reacción resulta casi imperceptible debido a la baja concentración de sustrato, afectando así la cinética de la reacción, mientras que a concentraciones más elevadas se llega a valores muy cercanos a los de inactivación de la enzima (Nazari et al., 2005), lo cual también disminuye la actividad de la HRP.

HRP/SBA-15	C/C <sub>0</sub>		
t (min)	0,7 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,4 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2,8 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
0	75,05%	45,95%	76,61%
30	69,32%	44,99%	70,04%
60	82,21%	49,37%	69,16%
120	76,57%	46,07%	68,46%

Tabla 3: Actividad del biocatalizador HRP/SBA-15 en función de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizada

HRP/Cr/Ti/SBA-15	C/C <sub>0</sub>		
t (min)	0,7 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,4 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2,8 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
0	91,27%	68,54%	88,19%
30	72,94%	75,28%	84,74%
60	70,88%	75,58%	84,30%
120	80,49%	72,02%	82,30%

Tabla 4: Actividad del biocatalizador HRP/Cr/Ti/SBA-15 en función de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizada

Conociendo las condiciones ideales de trabajo de la enzima, se repitió la experiencia para la HRP libre (Tabla 5), para comparar la actividad de la misma con la enzima inmovilizada en los dos soportes evaluados.

t (min)	C/C <sub>0</sub>
0	84,56%
30	76,19%
60	75,00%
120	70,09%

Tabla 5: Degradación de fenol por la HRP libre

Se compararon los valores de degradación obtenidos entre la enzima libre y los catalizadores heterogéneos enzimáticos para evaluar la actividad de HRP cuando es inmovilizada (Figura 3). Los materiales con la enzima inmovilizada presentan una mayor actividad que la enzima libre a t<sub>0</sub> indicando que la inmovilización favorece la reacción de degradación. Por otro lado, se puede observar que una gran parte de la reacción transcurre en los primeros 45 minutos, observándose luego una meseta donde la cantidad de fenol varía poco hasta los 120 min. Este comportamiento es típico de las reacciones enzimáticas al llegar a su velocidad máxima de trabajo, por lo tanto, para realizar ensayos cinéticos se deberá trabajar dentro de los 45 min que se dejan transcurrir para lograr el equilibrio de adsorción fenol-material. En el caso de HRP/SBA-15, la disminución en el consumo de fenol puede deberse a la lixiviación del mismo desde la fase heterogénea.

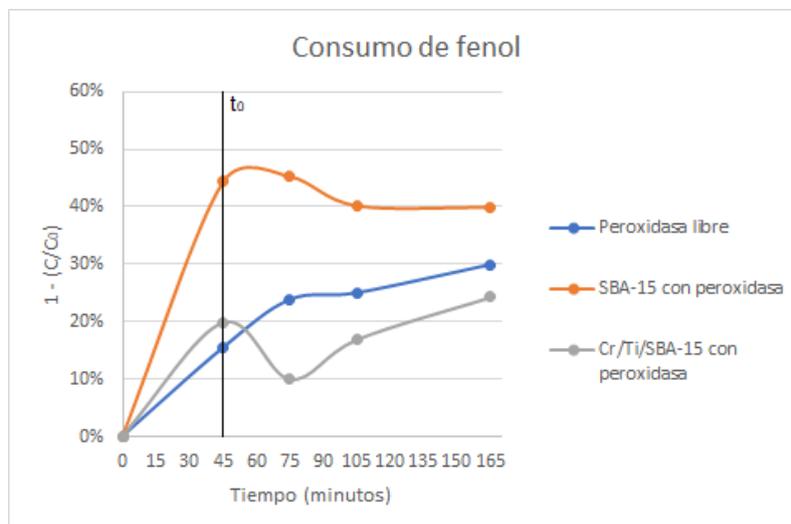


Figura 3: Consumo de fenol a lo largo del tiempo para HRP libre e inmovilizada en soportes SBA-15 y Cr/Ti/SBA-15

## Conclusiones

La enzima HRP logró inmovilizarse en los soportes SBA-15 y Cr/Ti/SBA-15, según indicaron las pruebas por espectrofotometría UV/visible. Probablemente la inmovilización en soportes Cr/Ti/SBA-15 de menor superficie activa debido a la presencia de los metales de transición dificulta el trabajo de la enzima, demostrando menor actividad que en soportes SBA-15. Sin embargo, la actividad de la enzima mejora al ser inmovilizada.

Se pudo verificar que concentraciones de peróxido de hidrógeno cercanas a 3 mM generan una inactivación suicida de la peroxidasa. Por otro lado, concentraciones bajas del sustrato disminuyen considerablemente el avance de la reacción, siendo la concentración óptima de 1,4 mM, lo cual indica las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que se deben producir en la segunda etapa de la cascada quimio-enzimática propuesta.

Resulta necesario obtener más datos respecto a las condiciones de inmovilización de la enzima y de la disponibilidad de sitios activos en el seno de los materiales silíceos con una caracterización de los mismos mediante distintas técnicas.

## Referencias

- Abreu, I.A. y Cabelli, D.E. (2010). "Superoxide dismutases – a review of the metal-associated mechanistic variations", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804(2), 263-274. doi: 10.1016/j.bbapap.2009.11.005.
- Bankar, S.B. et al. (2009). "Glucose oxidase -- an overview", *Biotechnology Advances*, 27(4), 489-501. doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.04.003.
- Chouyyok, W. et al. (2009). "Effects of pH and pore characters of mesoporous silicas on horseradish peroxidase immobilization", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56(4), 246-252. doi: 10.1016/j.molcatb.2008.05.009.
- Elías, V. et al. (2012). "Influence of the Cr loading in Cr/MCM-41 and TiO<sub>2</sub>/Cr/MCM-41 molecular sieves for the photodegradation of Acid Orange 7", *Applied Catalysis A: General*, 413-414, 280-291. doi: 10.1016/j.apcata.2011.11.019.
- Elías, V.R. et al. (2016). "Improved stability in SBA-15 mesoporous materials as catalysts for photo-degradation processes", *Microporous and Mesoporous Materials*, 236(C), 218-227. doi: 10.1016/j.micromeso.2016.09.001.
- Ferrero, G.O. et al. (2020). "Alternatives to rethink tomorrow: biodiesel production from residual and non-edible oils using biocatalyst technology", *Renewable Energy*, 150, 128-135. doi: 10.1016/j.renene.2019.12.114.
- Gutiérrez, E.L. et al. (2019). "On Piraxicam degradation by homogeneous Fenton's reaction and the influence of iron cations complexation", *Journal of Water Process Engineering*, 28, 82-87. doi: 10.1016/j.jwpe.2019.01.004.
- Hamid, M. y Khalil-ur-Rehman. (2009). "Potential application of peroxidases", *Food Chemistry*, 115(4), 1177-1186. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.02.035.
- Losada-García, N. et al. (2020). "Recent Advances in Enzymatic and Chemoenzymatic Catalytic Processes", *Catalysts*, 10(11), 1258-1276. doi: 10.3390/catal10111258.
- Nazari, K. et al. (2005). "Suicide-peroxide inactivation of horseradish peroxidase in the presence of sodium n-dodecyl sulphate: a study of the enzyme deactivation kinetics", *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 20(3), 285-292. doi: 10.1080/14756360500042846.
- Ni, Y. et al. (2016). "Peroxygenase-Catalyzed Oxifunctionalization Reactions Promoted by the Complete Oxidation of Methanol", *Angewandte Chemie International Edition - English*, 55(2), 798-801. doi: 10.1002/anie.201507881.
- Nosaka, Y. y Nosaka, A.Y. (2017). "Generation and Detection of Reactive Oxygen Species in Photocatalysis", *Chemical Reviews*, 117(17), 11302-11336. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00161.
- Ohlsson, P.-I. y Paul, K.-G. (1976). "The Molar Absorptivity of Horseradish Peroxidase", *Acta chemical Scandinavica Ser. B: Organic chemistry and biochemistry*, 30(B), 373-375. doi: 10.3891/acta.chem.scand.30b-0373
- Schrittwieser, J.H. et al. (2018). "Artificial Biocatalytic Linear Cascades for Preparation of Organic Molecules", *Chemical Reviews*, 118(1), 270-348. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00033.
- Sheldon, R.A. y Woodley, J.M. (2018). "Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry", *Chemical Reviews*, 118(2), 801-838. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00203.
- Silva, P. et al. (2013). "Método rápido para la determinación de fenol y pentaclorofenol en agua potable mediante HPLC con detección UV", *Revista Ingeniería UC*, 20(3), 79-86. Disponible en <<https://www.redalyc.org/pdf/707/70732641010.pdf>>
- Xiao, J. et al. (2020). "Fenton-like degradation of dimethyl phthalate enhanced by quinone species", *Journal of Hazardous Materials*, 382, 121007. doi: 10.1016/j.jhazmat.2019.121007.
- Zhao, D. et al. (1998). "Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores", *Science*, 279(5350), 548-552. doi: 10.1126/science.279.5350.548.