



Instituto Politécnico Nacional

ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA

SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACION

*“Estudio de la actividad catalítica y
transferencia de electrones de CYP2B4
inmovilizada en MCM-41 con cobre y
aluminio”*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN INVESTIGACION EN MEDICINA

P R E S E N T A:

M. en C. Martha Cecilia Rosales Hernández

DIRECTOR: D. en C. JOSÉ TRUJILLO FERRARA
CO- DIRECTOR: D. en C. DANIEL RAMÍREZ ROSALES



México, D.F. MARZO DEL 2007

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA DE LA ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL Y EN EL LABORATORIO DE MEDICIONES MAGNÉTICAS Y BIOFÍSICA DE LA ESFM BAJO LA ASESORIA DEL D. EN C. JOSE G. TRUJILLO FERRARA Y DEL D. EN C. DANIEL RAMIREZ ROSALES

AGRADECIMIENTOS:

Al D. en C. Trujillo por darme la oportunidad de trabajar con él y proporcionarme su confianza para la realización de esta tesis.

Al D. en C. Eduardo Torres por brindarme su confianza y porque ha creído en mi.

Al D. en C. Daniel Ramírez Rosales por haberme compartido sus conocimientos en EPR.

Al D. en C. Rafael Zamorano por haberme permitido trabajar en su laboratorio y conocer a su grupo de trabajo.

A todos los sinodales: Dr. Eduardo Terrés, Dr. Guillermo Ceballos, Dr. Sergio Meza Toledo, Dr. René Miranda Ruvalcaba, quienes han colaborado en esta tesis.

A todos los profesores de la academia de Bioquímica por darme la oportunidad de aprender enseñando.

A los integrantes del laboratorio de mediciones magnéticas y biofísica de la ESFM-IPN (Ignacio, Rogelio, Rocío, Javier, Lupita, Vero, Arturo Jorge, Natasha) a quienes les agradezco su amistad y apoyo.

A Karem y Vero quienes dedicaron parte de su tiempo a escucharme y aconsejarme en la realización de esta tesis. Muchas gracias

A todos los que integran el Laboratorio de Bioquímica (Lety, Mario, Arturo, Dr Araujo, Marvín, Juan, Araceli, Jessi, Gilberto, Jazz, a los jefes Sr. José Luis y la Sra. Josefina)

A Jessi y Félix a quienes solo puedo decirles GRACIAS por todo el apoyo.

A Gis y Salomón quienes han sido unos grandes amigos.

Dedicatorias:

A mis padres quienes me dieron la oportunidad de estar aquí y por haberme enseñado el camino.

A mis hermanas Rosario, Tania y Samantha por estar conmigo siempre

A José Correa Basurto por ser paciente conmigo y brindarme toda su confianza y cariño.

A mis tíos especialmente Margarita, Rubén y Francisco Gracias. .

A la memoria del una gran persona que durante mi vida me lleno de consejos y sabiduría A TI ABUELITA (28- julio-2006)

A la memoria de un gran profesor quien siempre tuvo tiempo y dedicación para escucharme, Prof. Iván Vázquez Alcántara (28-septiembre-2006)

CONTENIDO GENERAL

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICAS	IV
ABREVIATURAS	VIII
RESUMEN	X
ABSTRACT	XIII

ÍNDICE

	pág
1- INTRODUCCIÓN	1
1.1. Citocromo P-450	6
1.1.1. Sitio activo y ciclo catalítico	7
1.1.2. Citocromo P-450 reductasa	10
1.1.3. Reacciones catalizadas por el citocromo P-450	12
1.2. Inmovilización	14
1.2.1. Material mesoporoso del tipo MCM -41	20
1.2.1.1. Caracterización	21
1.2.1.1.1. Difracción de rayos X	21
1.2.1.1.2. Microscopía electrónica de transmisión	23
1.2.1.1.3. Análisis de texturas	23
1.2.1.1.4. Espectrofotometría de absorción en el infrarrojo	25
1.3. Resonancia paramagnética electrónica	26
1.3.1. Equilibrio térmico	30
1.3.2. Ión de hierro	32
2- JUSTIFICACIÓN	35
3- HIPÓTESIS	38
4- OBJETIVOS	38
4.1. Objetivo general	38
4.2. Objetivos específicos	39
5- DISEÑO METODOLÓGICO	40
5.1. Inducción y obtención de citocromo P-450	40
5.1.1. Administración de fenobarbital	40
5.1.2. Extracción y disección del hígado	40
5.1.3. Obtención de los microsomas	40

5.1.4. Determinación del contenido de proteína	41
5.1.5. Determinación y cuantificación del citocromo P-450	41
5.2. Purificación de CYP2B4	42
5.3. Síntesis del material mesoporoso del tipo MCM-41	43
5.3.1. Caracterización del material MCM-41	44
5.3.1.1. Difracción de rayos X	44
5.3.1.2. Microscopía electrónica de transmisión	44
5.3.1.3. Propiedades texturales	44
5.4. Inmovilización de CYP2B4	45
5.5. Determinación del contenido de proteína unida a MCM-41	45
5.6. Evaluación de la actividad enzimática	46
5.6.1. Cuantificación de <i>p</i> -aminofenol	46
5.7. Detección de la transferencia de electrones mediante resonancia paramagnética electrónica.	46
5.8. Modificación del grupo hemo	47
6. RESULTADOS	49
6.1. Obtención y cuantificación de citocromo P-450	49
6.2. Purificación de CYP2B4	49
6.3. Síntesis de MCM-41 impregnado con aluminio y cobre	51
6.4. Inmovilización de CYP2B4 en MCM-41 modificado con cobre y aluminio	54
6.5. Actividad catalítica de CYP2B4 inmovilizada en MCM-41 modificado con cobre y aluminio	54
6.6. Transferencia de electrones de CYP2B4 inmovilizada en MCM-41 modificada con cobre y aluminio	58
6.6.1. Transferencia de electrones de CYP2B4 inmovilizada en MCM-41 modificada con aluminio.	60
6.6.2. Transferencia de electrones de CYP2B4 inmovilizada MCM-41 modificada con cobre	63
67. Energías HOMO-LUMO de hemos modificados	68

7.- DISCUSIÓN	73
8.- CONCLUSIONES	78
9.-PROPUESTAS	80
10.-REFERENCIAS	81

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICAS

FIGURAS		Pág
Figura 1	Niveles de energía de los electrones 3d en un campo cristalino octaédrico. Configuraciones de alto y bajo espín para Fe ⁺³ . El estado fundamental (<i>t_{2g}</i>) esta constituido por orbitales <i>d_{xy}</i> , <i>d_{zx}</i> y <i>d_{zy}</i> mientras que los orbitales <i>d_{x²-y²}</i> y <i>d_{z²}</i> son la base del doblete <i>e_g</i> .	4
Figura 2	Espectro UV-Visible del complejo formado por citocromo P-450 de hígado de rata reducido con ditionita de sodio y CO (curva A) y curva B sin CO.	6
Figura 3	Sitio activo del citocromo P-450 protoporfirina IV constituido por 4 anillos pirrólicos (gris) un átomo de hierro (azul) y un residuo de cisteína (amarillo) unido al átomo de hierro	7
Figura 4	Ciclo catalítico de las enzimas del complejo multienzimático citocromo P-450.	8
Figura 5	Mecanismo de transferencia de electrones entre CPR y el CYP-450	9
Figura 6	Citocromo P450 reductasa (dímero). Esta enzima es una flavoproteína que contiene una molécula de FAD (verde) y FMN (morado) pdb. 1AMO.	10
Figura 7	Interacción electrostática entre CPR y CYP450. CPR tiene un potencial electrostático negativo alrededor de la molécula de FMN, el cual interacciona con la región positiva de CYP450.	12
Figura 8	Reacciones de monooxigenación catalizadas por citocromo P-450	13
Figura 9	Oxidación de anilina a <i>p</i> -aminofenol catalizada por el CYP450.	14
Figura 10	Inmovilización y aplicación de las enzimas inmovilizadas	15
Figura 11	Estructura hexagonal de MCM-41 a) inmovilización de enzimas (verde-rojo) en sus poros, b) interacción de la enzima con la superficie del material.	18

Figura 12	Representación del arreglo hexagonal de la MCM-41.	21
Figura 13	Patrón de difracción de rayos X de MCM-41 calcinada.	22
Figura 14	Isoterma de adsorción de MCM-41 con poros de 4 nm a 77 K con N ₂ [22].	24
Figura 15	Espectro electromagnético en donde se localiza la frecuencia 10 ⁶ -10 ⁸ Hz para RMN y de 10 ¹⁰ -10 ¹¹ Hz para EPR.	27
Figura 16	Orbitales del átomo de hierro: d _{xy} , d _{xz} , d _{yz} son llamados también orbitales t _{2g} o d _E ; d _z ² y d _{x²-y²} son llamados también orbitales e _g o d _γ .	33
Figura 17	Columna de w-aminoocetil sefarosa empleada durante la purificación de CYP2B4.	42
Figura 18	Estructura del grupo hemo con los grupos vinílicos (R2, R4) y los propiónicos (R6,R7) susceptibles de ser modificados.	48
Figura 19	(A) Electroforesis en gel de poliacrilamida de a) CYP2B4 pura de Sigma, b y c) CYP2B4 purificada; (B) Electroforesis con diferentes cantidades de CYP2B4 y marcador de peso molecular.	50
Figura 20	Patrón de difracción de rayos X (DRX) de MCM-41 impregnada con aluminio y cobre.	51
Figura 21	Espectro EPR de CYP2B4 (120 μM) con valores de g _x =2.4205, g _y = 2.2442, g _z =1.9165 característicos del átomo de hierro en bajo espín (s=1/2): el espectro fue obtenido a 77 K, frecuencia de microondas, 8.8582 GHz; potencia de microondas, 25 mW; frecuencia, 100 kHz; ganancia 2 x 1000.	59
Figura 22	Espectro EPR de NADPH el cual muestra un singulete característico de un radical libre con un valor de g =2.01; el espectro fue obtenido a 77 K, frecuencia de microondas, 9.400 GHz; potencia de microondas, 1 mW; frecuencia, 100 kHz; ganancia 6.3 x 100.	59

Figura 23	Espectros EPR de CYP2B4 a) CYP2B4 inmovilizada en Al-MCM 41, b) CYP2B4 inmovilizada en Al-MCM 41 más anilina (20mM), c) CYP2B4 inmovilizada en Al-MCM 41 más anilina y NADPH. El espectro fue recorrido a 77 K, frecuencia de microondas, 9.096 GHz; potencia de microondas, 20 mW; frecuencia, 100 kHz; ganancia 4×10^4 .	61
Figura 24	Al-MCM-41h irradiada por 2 min a 200 W con una lámpara de tungsteno.	62
Figura 25	Espectro EPR de la reacción de CYP2B4 inmovilizada en Al-MCM 41(3 nmol); NADPH y anilina. El espectro fue recorrido a 120 K, frecuencia de microondas, 8.8616 GHz; potencia de microondas, 25 mW; frecuencia, 100 kHz; ganancia 2×1000 .	63
Figura 26	Espectro EPR de a) CuMCM-41 y b) CuMCM-41 más NADPH.	64
Figura 27	Espectro EPR de a) CYP2B4 inmovilizada en Cu-MCM-41, b) CYP2B4 inmovilizada en Cu-MCM-41 más anilina, c) CYP2B4 inmovilizada en Cu-MCM 41 más anilina y NADPH.	65
Figura 28	Espectro EPR de 1,8, diaminoctano inmovilizado en Cu-MCM-41a.	67
Figura 29	Espectro EPR del ácido succínico inmovilizado en Cu-MCM 41.	67
Figura 30	Estructuras en tercera dimensión de las energías HOMO (izquierda) y LUMO (derecha) de 1 .	69
Figura 31	Estructuras en tercera dimensión de las energías HOMO de 2 (izquierda) y 3 (derecha).	70
Figura 32	Energías de LUMO de 5 (derecha) y de 5-Cys (izquierda).	71

TABLAS

Tabla 1	Distribución de los electrones en los orbitales <i>d</i> del Fe ⁺³ y Fe ⁺² .	34
Tabla 2	Modificaciones en el grupo hemo.	48
Tabla 3	Contenido de proteínas totales y CYP450 en microsomas de hígado de conejos tratados con fenobarbital.	49
Tabla 4	Relaciones Al/Si y Cu/Si en MCM-41.	52
Tabla 5	Características texturales de Al-MCM-41h y Cu-MCM 41a.	53

GRÁFICAS

Gráfica 1	Actividad catalítica de CYP2B4 sigma a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno y anilina (5mM).	55
Gráfica 2	Actividad catalítica de CYP2B4 sigma (1nmol) a diferentes concentraciones de anilina.	55
Gráfica 3	Actividad catalítica de CYP2B4 purificada (1nmol) a diferentes concentraciones de anilina.	56
Gráfica 4	Actividad catalítica de CYP2B4 inmovilizada en Al-MCM-41h (1.5 nmol de enzima) y diferentes concentraciones de anilina.	57

ABREVIATURAS

Al	Aluminio
Ar	Argón
BJH	Barrett-Joyner-Halenda
BMP	Dominio de la región del hemo de P450BM-3 from <i>Bacillus megaterium</i>
CYP450	Citocromo P-450
CLAs	Colloidal Liquid Aphrons
CTABr	Bromuro de cetiltrimetilamonio
CO	Monóxido de carbono
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
DRX	Difracción de rayos X
ESFM	Escuela superior de física y matemáticas
FAD	Flavinadeninucleótido
Fe	Hierro
FMN	Flavinmononucleótido
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
IR	Infrarrojo
KD	Kilodaltons
MCM-41	Mobil Composition of Matter
MET	Microscopía electrónica de transmisión
mT	MiliTeslas
N₂	Nitrógeno
NADP⁺	Nicotinamida adeninucleótido fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida adeninucleótido fosfato reducido
Nm	Nanómetros

O₂	Oxígeno
Θ	Ángulo de difracción
P	Presión de referencia
Py	Piridina
PCR	Rección en cadena de la polimerasa
P₀	Presión del adsorbato
Si	Silicio
Si/Al	Relación silicio/aluminio
UDP	Uridindifosfato
UV-Visible	Ultravioleta Visible
EPR	Resonancia paramagnética electrónica
HOMO	Orbital Molecular ocupado de alta energía
LUMO	Orbital Molecular desocupado de baja energía

RESUMEN

El Citocromo P-450 (CYP-450) es un complejo multienzimático de gran importancia para el organismo ya que participa en el metabolismo de xenobioticos durante la etapa de biotransformación de fase I. Entre los principales CYP-450 metabolizadores de xenobióticos en humanos se encuentra CYP3A4, CYP2C9 y CYP2E1 localizadas en el retículo endoplásmico liso (R.E.L.) de hígado, por lo anterior estas enzimas han sido de las más estudiadas junto con CYP2B4 obtenida de hígado de conejo.

Son diversas las reacciones por las cuales las enzimas del CYP-450 biotransforman los xenobióticos, produciendo en algunas ocasiones metabolitos activos o inclusive tóxicos, por esta razón durante muchos años se han hecho estudios de biotransformación de fármacos *in vitro* empleando enzimas de CYP-450, NADPH y citocromo P-450 reductasa (CPR: enzima transportadora de electrones entre el NADPH y CYP-450) con el objetivo de conocer como serán biotransformados en el organismo. Sin embargo, el uso de CPR en reacciones *in vitro* con enzimas del CYP-450 purificadas suele resultar costoso, por lo que, en este trabajo se propuso evaluar la actividad catalítica de CYP2B4 inmovilizada en un material mesoporoso del tipo MCM-41 en ausencia de CPR. Este material fue descubierto recientemente y tiene características que lo han hecho atractivo para su uso en la inmovilización de enzimas como son: área específica alta ($\sim 1000 \text{ m}^2/\text{g}$), una estructura porosa hexagonal altamente ordenada, el diámetro de poro es controlable (20-500 Å). Además se ha reportado que este material modificado con aluminio (Al-MCM-41) y cobre (Cu-MCM-41) puede participar en la transferencia de electrones con carotenoides, lo cual implicaría una gran ventaja en las reacciones de biotransformación *in vitro* ya que esto evitaría el uso de CPR cuando CYP2B4 es inmovilizada en Al-MCM-41 o Cu-MCM-41, por lo tanto la posible transferencia de electrones entre CYP2B4 y el material fue evaluada mediante resonancia paramagnética electrónica (EPR).

Los resultados obtenidos muestran que el CYP2B4 inmovilizado mediante adsorción mantuvo cerca de la mitad de su actividad catalítica. El espectro EPR de CYP2B4 inmovilizado sobre Al-MCM-41 usando anilina como sustrato y NADPH como donador de electrones mostró dos señales. La primera de ellas, con un valor de g de 2.2442 la cual fue debida al hierro del grupo hemo de CYP2B4, en el cual el átomo de hierro tiene una valencia de +3 y un estado de bajo espín ($S=1/2$). La segunda señal con un valor de $g = 1.98$ se asignó a cambios en el ambiente químico de la porfirina, debida a la formación y/o ruptura de algunos enlaces cuando CYP2B4 y Al-MCM-41 interactúan; dando origen a defectos puntuales en el material. La transferencia de electrones fue observada cuando la señal con $g=1.98$ se incrementó al mismo tiempo que la señal con $g = 2.2442$ disminuyó debido a la adición de NADPH a CYP2B4 inmovilizado, indicando que el átomo de hierro se reduce de un estado de oxidación de +3 a +2. Por lo tanto, es posible que el Al-MCM-41 participe en la transferencia de electrones en procesos biológicos y así sea posible evaluar la biotransformación de fármacos y de nuevas moléculas con actividad biológica a un menor costo.

La transferencia de electrones también puede ser modulada mediante modificaciones en los grupos hemo de las hemoproteínas. En este trabajo la geometría molecular y las energías HOMO-LUMO de derivados de hemo fue optimizada haciendo cálculos de la teoría de funcionales de la densidad (DFT). Los resultados obtenidos mostraron correlación con datos experimentales obtenidos en reportes previos. La densidad LUMO en el átomo de hierro y en los carbono sp^3 de los grupos propiónicos de los hemo incrementa cuando los grupos vinílicos y propiónicos son sustituidos por grupos electroattractores, mientras que su densidad HOMO incrementa cuando grupos electrodonadores son sustituidos en las mismas posiciones. Cuando los grupos propiónicos son modificados con grupos electroattractores o electrodonadores, la densidad electrónica es mantenida sobre sus carbonos híbridos sp^3 , evitando la transferencia de electrones del sustituyente al átomo de hierro. Por lo tanto, es

posible que existan diferentes interacciones también entre el sustrato y los carbonos con hibridación sp^3 . Con cisteína como quinto ligante, hay cambios en la geometría de los derivados de hemo, induciendo coplanaridad entre los anillos pirrólicos e impidiendo la interacción entre grupos vinilos y los nitrofenilos localizados en las posiciones C-2 y C-7 respectivamente. Por lo tanto, modificaciones en el grupo hemo con moléculas electroattractoras, permitirán mejorar la actividad catalítica de enzimas del citocromo P-450 como CYP2B4 de tal forma que estas enzimas no solo sean usadas en procesos de biotransformación de fármacos sino también en otras reacciones de síntesis orgánica.

ABSTRACT

The cytochrome P-450 (CYP-450) is a multienzymatic complex of great importance due to its biotransformation of a wide variety of xenobiotics. The CYP3A4, CYP2C9 and CYP2E1 are the most important isoforms. They are located in the smooth endoplasmic reticulum in the human liver. These enzymes together with CYP2B4 (from rabbit liver) have been the most studied.

CYP-450 enzymes catalyze a great amount of reactions by which biotransform the xenobiotic. In some occasions active or toxic metabolites are produced, for this reason during several years have been carried out studies on the biotransformation of drugs with CYP450 enzymes using reconstituted systems with CYP-450, NADPH and cytochrome P-450 reductase (CPR). In order to know how the drugs will be biotransformed in the organism. However, the use of CPR in *in vitro* reactions with isoforms of CYP-450 purified are expensive, therefore in this work was proposed to evaluate the CYP2B4 catalytic activity immobilized on a mesoporous material, Mobil Crystalline Material in the absence of the CYP P450 reductase. This material has some chemical characteristics that make it attractive for the enzyme immobilizations such as uniform hexagonal arrangement, a pore diameter of 2-10 nm and a surface area of about 1000 m²/g. Also have been reported that this material can be modified with aluminum (Al-MCM-41) and copper (Cu-MCM-41) which can participate during the electron transfer which could be of great importance in the *in vitro* biotransformation reaction because it could avoid the use of CPR when CYP2B4 is immobilized on Al-MCM-41 and Cu-MCM-41, therefore the possible electron transfer between CYP2B4 and the material with aluminum and copper was studied by electron paramagnetic resonance.

The results obtained showed that when CYP2B4 was immobilized by adsorption, it's maintained near of 50% of its catalytic activity. Therefore the reaction was studied by EPR. The EPR spectrum of CYP2B4 immobilized on Al-MCM-41, using aniline as substrate and NADPH as electron donator showed two signals: the first, with a g value of 2.2442 was assigned to the iron atom of CYP2B4, which has a spin of $\frac{1}{2}$; the second, with a g value of 1.98, could be due to changes in the electronic environment of the porphyrin or perhaps to the formation and rupture of some bonds when CYP2B4 and Al-MCM-41 interact. The electron transfer was observed when the signal with a g = 1.98 was increased at the same time that the signal with a g value of 2.2442 decreased showing that Fe^{+3} was reduced to Fe^{+2} , both effects caused by to the addition of NADPH at CYP2B4 immobilized on Al-MCM-41, therefore, it is possible that Al-MCM-41 participates in the electron transfer process in biological systems, it is important because may allow to carried out biotransformation reactions at low cost.

The electron transfer can also be modulated by modifications in the heme groups of the hemeproteins. Therefore, the molecular geometry of the heme derivatives and their HOMO-LUMO energies were calculated. This data shows correlation with the experimental data reported in the literature. The LUMO density at the iron atom and sp^3 carbons of the heme increases when its vinyl and propionic groups are substituted by electron withdrawing groups, while their HOMO density increases when electron donating groups are substituted in the same positions. When the propionic groups are modified with electron withdrawing or electron donating groups, the electronic density is maintained at their sp^3 carbons, avoiding electron transfer from the substituent to the iron atom. Consequently, it is possible that different interactions also exist between the substrate and the sp^3 carbons. There is a change in the geometry of the heme derivatives, when cysteine is substituted at the 5th ligand, inducing a coplanarity among the four pyrrolic rings and avoiding the interaction between the vinyl and nitrophenyl

groups located at the C-2 and C-7 positions, respectively. Therefore modification in the heme group with electrodrawing molecules will allow to improving the catalytic activity of cytochrome P-450 enzyme as CYP2B4 in order these enzymes not only be used in biotransformation processes but also in other reactions.

1. INTRODUCCIÓN

El citocromo P-450 (CYP-450) es un complejo multienzimático formado por diversas isoformas, es decir proteínas con actividad catalítica (enzimas) que tienen diferente secuencia de aminoácidos pero que catalizan las mismas reacciones ^[1]. Hasta 1995 se habían identificado cerca de 220 isoformas del CYP-450, la nomenclatura que se ha empleado para designar a cada una de estas isoformas consiste en usar las letras (CY) para indicar que pertenece al sistema de citocromos, la P para referir el pico característico para estas enzimas en el espectro visible a 450 nm, el primer número indica la familia a la cual pertenece, la siguiente letra indica la subfamilia y el último número a la forma individual de citocromo; ejemplo CYP2C9 ^[2]. Las isoformas del CYP-450 se localizan en el retículo endoplásmico (R.E) liso de diferentes tejidos como hígado, riñón, pulmón y cerebro. Entre las isoformas que destacan por su participación en el metabolismo de xenobióticos se encuentran CYP2E1, CYP3A4 y CYP2C9 de humano, sin embargo una de las isoformas de CYP450 que ha sido más estudiada es CYP2B4 obtenida de hígado de conejo^[3-4].

Para que las enzimas del CYP-450 puedan llevar a cabo su catálisis requieren la participación de otra enzima localizada también en el R.E liso conocida como citocromo P-450 reductasa (CPR), la función de esta enzima es transferir dos electrones al CYP-450 a través de sus cofactores flavinadenin dinucleótido (FAD) y flavin mononucleótido (FMN), de hecho CPR es la única enzima conocida que contiene ambas coenzimas en igual proporción como cofactores ^[5]. Los electrones transferidos por la CPR al CYP-450 provienen del cofactor nicotinamida adenindinucleótido fosfato reducido (NADPH). Durante la transferencia de electrones de CPR a CYP450; la molécula de FAD recibe dos electrones a partir del NADPH y los transfiere a la molécula de FMN la cual los

transporta hacia el CYP450 [6]. Por lo tanto, es importante mencionar que las enzimas del CYP-450 mantienen actividad catalítica *in vivo* e *in vitro* cuando todos estos componentes (CYP-450-CPR-NADPH) están juntos.

Las enzimas del CYP-450 son de gran importancia debido a que están involucradas en el metabolismo de sustancias endógenas y muchos xenobióticos. Estos compuestos son transformados por el CYP-450 principalmente mediante reacciones de oxidación [7].

Tanto CYP450 como CPR han sido empleadas durante muchos años para el estudio de la biotransformación de fármacos *in vitro*, sin embargo el uso de CPR es costoso, por lo cual, se ha utilizado peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como oxidante evitando así el uso de CPR, además, recientemente, se ha publicado que CYP2B4 puede ser inmovilizada en Mobil Crystalline Material con aluminio (Al-MCM-41) conservando su actividad catalítica en ausencia de CPR [8], sugiriendo que el material Al-MCM-41 puede llevar a cabo la transferencia de electrones debido a sus propiedades ácido-base [9], las cuales pueden ser modificadas a través de la incorporación de metales como Al^{+3} [10], Cu^{+2} [11], Ti^{+4} [12] y V [13]. La incorporación de estos metales modifica la transferencia de electrones entre el material y las moléculas inmovilizadas [14]. Aunque el mecanismo aún no es claro, se ha propuesto que MCM-41 puede actuar como aceptor de electrones mediante sus sitios ácidos de Lewis [15-16].

La transferencia de electrones en diferentes sistemas tanto físicos como biológicos puede ser estudiada mediante resonancia paramagnética electrónica (EPR) [17]; ya que con esta técnica es posible detectar radicales libres y especies paramagnéticas, es decir, especies que tienen electrones desapareados como es el caso de algunos metales de transición, los cuales pueden existir en más de un estado de oxidación, haciéndolos indispensables para procesos biológicos que requieren la transferencia de electrones, como sucede en diversos procesos

biológicos como la cadena respiratoria y la transferencia de electrones entre proteínas. Por esta razón, dichos metales se encuentran en el sitio activo de un gran número de proteínas, como en el CYP-450 debido a que éste está involucrado en la transferencia de electrones con CPR ^[18]. El metal de transición que se encuentra en las enzimas del CYP-450 es el hierro localizado en el grupo hemo. Cabe mencionar que dicho metal tiene un papel fundamental durante la catálisis ^[7].

Lo anterior se debe a que el hierro es capaz de encontrarse en dos estados de oxidación Fe^{2+} ($[Ar] 3d^6 4s$) y Fe^{+3} ($[Ar] 3d^5 4s$). En estos estados de oxidación, el hierro tiene vacíos el orbital 4s, los orbitales 4p y varios orbitales 3d. Para un entorno con geometría octaédrica como en el caso del grupo hemo ^[19], estos cinco orbitales monoeléctricos *d* se desdoblan en un triplete y un doblete, siendo la energía del triplete menor que la del doblete (Fig 1) ^[17]. El ion Fe^{+3} posee cinco electrones en los orbitales 3d. Si el efecto de repulsión interelectrónica es mayor que el debido a la interacción con el entorno entonces, se disponen tres electrones en los orbitales t_{2g} y dos electrones en los orbitales e_g todos ellos con espín paralelo (Fig 1a). En este caso el espín total es $S= 5/2$ (alto espín). El Fe^{+3} en configuración de bajo espín, todos los electrones se disponen en orbitales t_{2g} quedando únicamente un electrón desapareado. El espín total es $s = 1/2$, (Fig 1b).

Dado que el CYP-450 es un complejo multienzimático, en él se hallan enzimas con Fe^{+3} y $s = 1/2$ es decir hierro en bajo espín como CYP2B4 y con Fe^{+3} y $s = 5/2$; es decir hierro en alto espín como CYP1A2 ^[20]. El estado de espín en el cual se encuentre el hierro en estas enzimas es independiente de la especie de la cual provengan o del órgano en el cual se encuentren. Lo anterior es de gran importancia en este tipo de enzimas ya que aunque ambas hidroxilan al sustrato lo hacen en diferentes posiciones, produciendo en algunas ocasiones, alguna de ellas metabolitos tóxicos, por lo tanto, cuando se evalúa la biotransformación de algún fármaco es conveniente hacerlo con varias de las isoformas.

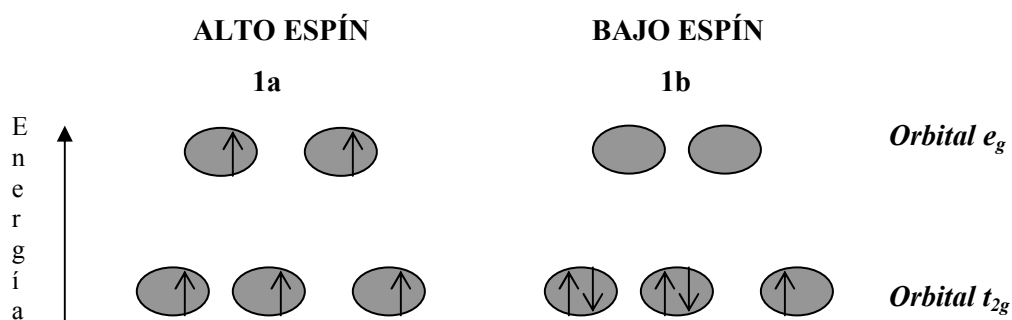


Figura 1. Niveles de energía de los electrones 3d en un campo cristalino octaédrico. Configuraciones de alto y bajo espín para Fe^{+3} . El estado fundamental (t_{2g}) está constituido por orbitales d_{xy} , d_{zx} y d_{zy} mientras que los orbitales $d_{x^2-y^2}$ y d_{z^2} son la base del doblete e_g [17].

El CYP450 tiene gran importancia en el metabolismo de fármacos por esta razón una gran cantidad de estudios han sido llevados a cabo *in vitro* empleando estas isoformas. En éste trabajo se propone inmovilizar CYP2B4 en MCM-41 con aluminio y cobre, para su uso en reacciones de biotransformación de fármacos, empleando como reacción modelo la biotransformación de anilina, ya que es probable que al incorporar algunos de estos metales en MCM-41 mejore también la transferencia de electrones con hemoproteínas inmovilizadas.

A su vez, es posible que al realizar modificaciones sobre el grupo hemo de CYP2B4, ya sea en los grupos vinílicos o en los propiónicos sea posible modular la transferencia de electrones, ya que estudios realizados con P450nor [21], P450BM3 [22-23], citocromo b_5 [24] y mioglobina [25] muestran que los grupos propionato y los grupos vinílicos juegan un papel importante en la regulación del potencial redox del grupo hemo; el cual es incrementado mediante la sustitución de los grupos 2,4 vinílicos por moléculas electroattractoras, las cuales a su vez disminuyen la densidad electrónica del hemo e incrementan el estado de bajo espín ($s=1/2$) del Fe^{+3} , lo cual lleva a una mayor transferencia de electrones. Por lo tanto, en este trabajo se propone modificar el grupo hemo de CYP2B4 para

evaluar la densidad electrónica en el átomo de hierro mediante estudios de función de la densidad. Todo esto tiene el propósito de mejorar la transferencia de electrones y con ello la actividad catalítica de la enzima, en ausencia de CPR.

1.1. CITOCROMO P-450

Las primeras evidencias sobre las enzimas del citocromo P-450 fueron descubiertas en 1955 por Axelrod y Brodie^[26-27], quienes las aislaron y caracterizaron a partir del retículo endoplásmico liso de hígado de rata y demostraron que son capaces de oxidar diversos compuestos.

En 1957 mientras Martín Klingenberg^[28] estudiaba la reacción de reducción catalizada por citocromo b_5 en microsomas de hígado de rata, encontró otro pigmento capaz de enlazar monóxido de carbono (CO) el cual al estudiarlo por UV-VIS dió un pico en 450 nm (Figura 2); a éste pigmento en 1960, Omura y Sato^[29-30] le dieron el nombre de citocromo P 450.

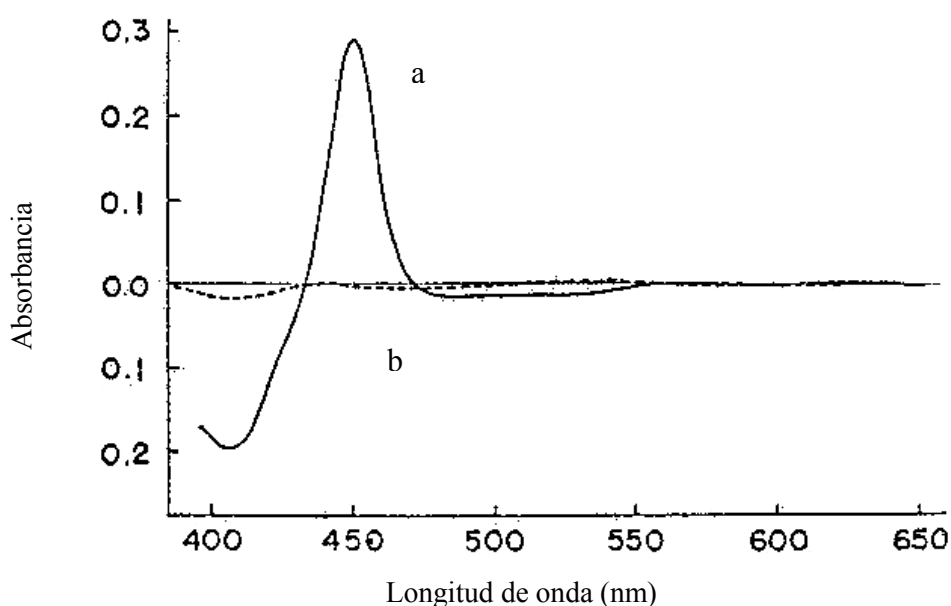


Figura 2. Espectro UV-Visible del complejo formado por citocromo P-450 de hígado de rata reducido con ditionita de sodio y CO (curva A) y curva B sin CO^[28].

1.1.1. SITIO ACTIVO Y CICLO CATALÍTICO

Durante muchos años se tuvo gran interés en conocer la estructura del citocromo P-450, particularmente su sitio activo ^[31-33]. Los estudios realizados con tal propósito, evidenciaron que el sitio activo está constituido principalmente por un grupo hemo (protoporfirina IX y hierro), en donde el hierro se encuentra hexacoordinado, formando cuatro enlaces con los átomos de nitrógeno de los anillos pirrólicos; como quinto ligante un átomo de azufre proveniente de un residuo de cisteína y como sexto ligante una molécula de agua (Figura 3).

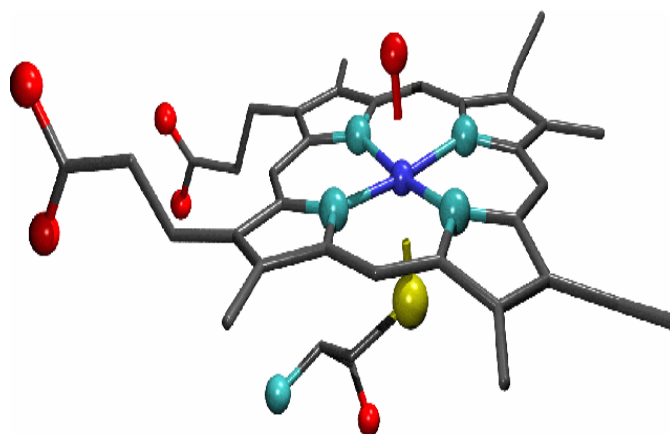


Figura 3. Sitio activo del citocromo P-450 protoporfirina IV constituido por 4 anillos pirrólicos (gris) un átomo de hierro (azul) y un residuo de cisteína (amarillo) unido al átomo de hierro

Como se muestra en la figura 4, el ciclo catalítico de las enzimas del citocromo P-450 se inicia mediante la unión del sustrato al hierro, provocando el desplazamiento de la molécula de agua cambiando el espín del hierro de un estado de bajo espín a uno de alto espín. Con ello el hierro pasa de un estado hexacoordinado a uno pentacoordinado ^[32-34] (1). El enlace del sustrato facilita la reducción del hierro del grupo prostético hemo al estado ferroso y origina un cambio conformacional de la enzima (2).

La reducción se lleva a cabo mediante la transferencia de un electrón a partir del NADPH por la enzima citocromo P-450 reductasa, ésta enzima también forma parte de la membrana y utiliza como coenzimas flavin mononucleótido (FMN) y por flavinadenin dinucleótido (FAD) como se muestra en la figura 5.

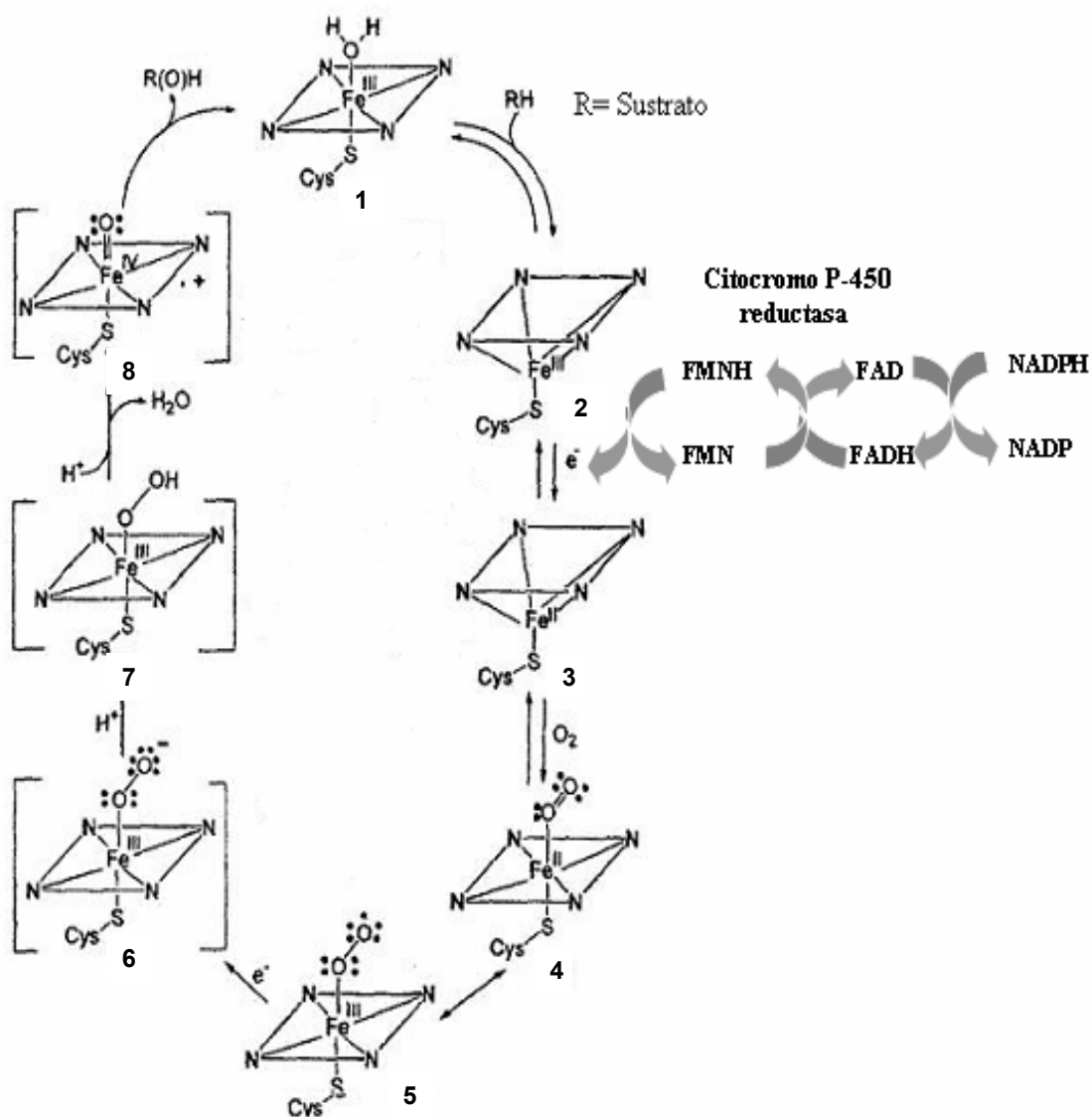


Figura 4. Ciclo catalítico de las enzimas del complejo multienzimático citocromo P-450 [34].

En la tercera etapa del ciclo catalítico (figura 4) una vez que se ha reducido el hierro este se enlaza, al oxígeno molecular dando origen a un complejo di-oxígeno ferrico $[\text{Fe}^{+3} - \text{O}_2^-]$ muy inestable ^[35] (4), que sufre una rápida conversión a un compuesto estable, mediante la transferencia de un electrón (e^-) (6) a partir del NADPH transportado por citocromo P-450 reductasa o por citocromo b_5 .

Esta reacción depende del sustrato o de la especie de citocromo P-450 involucrada, ya que existen algunas isoformas, en las cuales se estimula su actividad cuando la transferencia es a través de citocromo b_5 y otras que son inhibidas ^[36-37]. La segunda reducción origina el complejo $[\text{Fe}^{+3} - \text{O}_2^{-2}]$, el cual (6) reacciona con dos protones (7-8), rompiendo el enlace O-O generando agua y el complejo $[\text{Fe} - \text{O}]^{+3}$ ^[38].

En la última etapa (8) el átomo de oxígeno se transfiere al sustrato dando origen al producto hidroxilado que finalmente se libera del sitio activo de la enzima la cual regresa a su estado inicial (1).

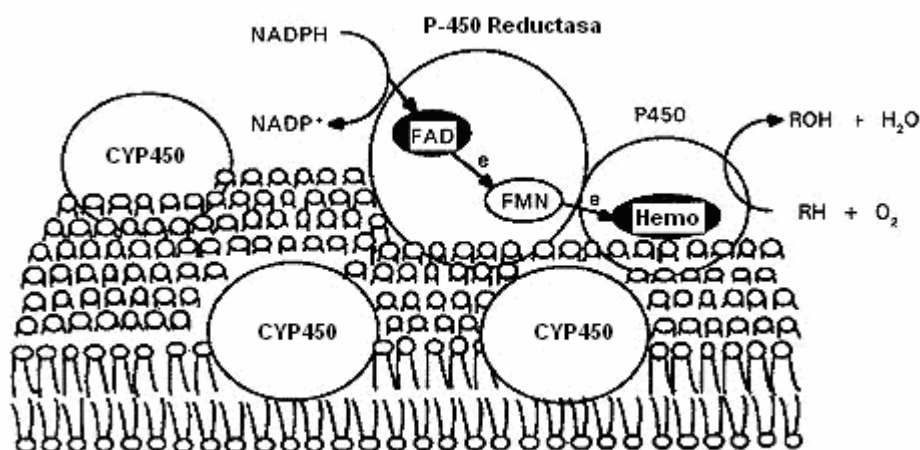


Figura 5. Mecanismo de transferencia de electrones de CPR al CYP-450.

(www.agnet.org/library/image/tb159ft.html)

1.1.2. CITOCROMO P-450 REDUCTASA

La transferencia de electrones de CPR al CYP450, es uno de los principales pasos durante su ciclo catalítico. El CYP450 bacterial y mitocondrial reciben los electrones a partir de una pequeña proteína hierro azufre soluble. Sin embargo, la pareja redox para CYP450 microsomal es la citocromo P-450 reductasa (CPR). En la CPR (Fig. 6), el FAD sirve como un aceptor de electrones a partir de NADPH y la molécula de FMN interactúa con el CYP450 reduciendo el hierro del grupo hemo de Fe^{+3} a Fe^{+2} . El reconocimiento, interacción y transferencia de electrones entre CPR y P450 es uno de los problemas más importantes en el área de CYP450. Actualmente se ha demostrado que la interacción entre CPR y CYP450 se lleva a cabo mediante fuerzas electrostáticas e hidrofóbicas. ^[39-44]

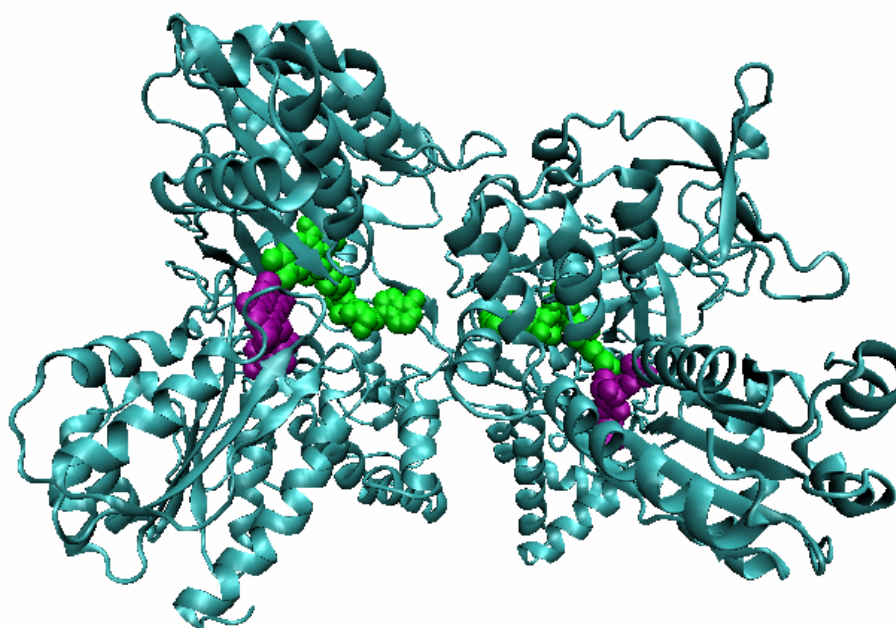


Figura 6. Citocromo P450 reductasa (dímero). Esta enzima es una flavoproteína que contiene una molécula de FAD (verde) y FMN (morado).(www.pdb 1AMO)

La CPR es el donador de electrones más importante para el CYP450, además de ser el componente limitante en los microsomas ^[42]. La interacción de CYP450 con la CPR puede ser el factor determinante de la actividad funcional del CYP450. Recientemente, se ha demostrado que la interacción entre diferentes especies de CYP450 y su correspondiente reductasa son importantes en los mecanismos funcionales y regulatorios de las monooxigenasas microsomales ^[43-44].

La formación del complejo entre CYP450 y sus donadores de electrones es importante ya que modifica el espín del átomo de hierro del grupo hemo, la afinidad por los sustratos y el grado de acoplamiento entre la hidroxilación del sustrato y la oxidación del NADPH. ^[45-47] Aunque la interacción de CYP450 con CPR y citocromo b₅ ha sido extensivamente estudiada, el mecanismo de formación del complejo entre estas proteínas no es totalmente claro.

La existencia de interacciones electrostáticas en la formación del complejo entre CYP450 y sus parejas redox ha sido extensivamente discutida en la literatura en la pasada década. En el caso de la interacción de CYP450 con citocromo b₅ se ha establecido que la interacción entre las proteínas es por pares de cargas o electrostática ^[46, 48-51]. Sin embargo, aunque en la literatura existe contradicción acerca del reconocimiento entre CYP450 y CPR, Wang ^[52] *et. al.* mostraron que la interacción entre estas dos enzimas es por atracción electrostática entre residuos de aminoácidos cargados, sugiriendo la participación de al menos dos a tres pares de cargas en el complejo. Comparando la estructura del dominio de FMN de CPR con el de P450BM-3, Sevriukova *et al* ^[53] sugiere que un fuerte potencial negativo sobre la superficie de CPR alrededor de FMN facilita la formación del complejo entre la CPR y el CYP450 (figura 7), aunque algunos estudios proponen que la región cargada alrededor del FMN sobre la superficie de CPR no es importante para la interacción de la flavoproteína con CYP2B4. ^[54] Sin embargo, comparando la distribución de los residuos cargados en la secuencia de aminoácidos de CYP2B4 y BMP, un análisis preliminar reveló grandes diferencias

entre estas hemoproteínas mediante el balance del número total de residuos cargados positiva y negativamente; mostrando que la carga total de CYP2B4 es + 6 mientras que para BMP es de -11; por lo tanto existen diferencias en las interacciones electrostáticas entre estas hemoproteínas y sus reductasas; de hecho se ha observado que las diferencias en los mecanismos de interacción entre las hemoproteínas y sus reductasas depende de la composición o características de las primeras.

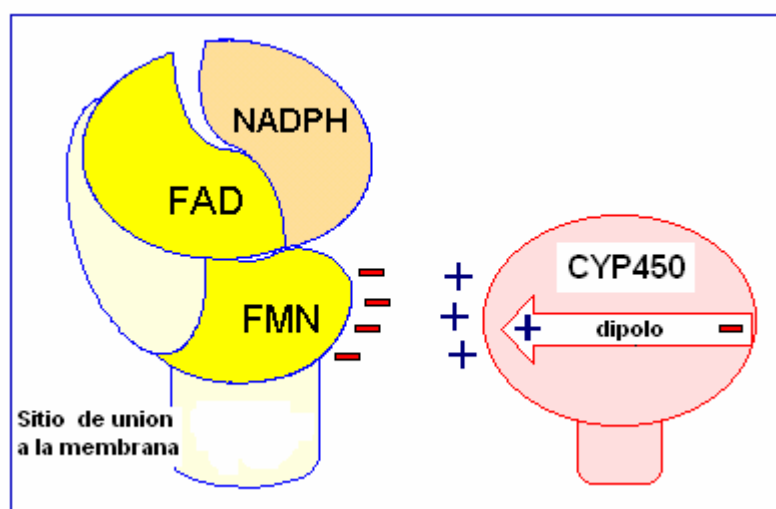


Figura 7. Interacción electrostática entre CPR y CYP450. CPR tiene un potencial electrostático negativo alrededor de la molécula de FMN, el cual interacciona con la región positiva de CYP450. (www.uky.edu/pharmacy/ps/poster/CPR_enzymology.htm)

1.1.3. REACCIONES CATALIZADAS POR EL CITOCROMO P-450

El sistema citocromo P-450 está involucrado en el metabolismo de varios endobióticos y xenobióticos además, posee por lo menos tres diferentes actividades catalíticas ^[55]. La primera se conoce por su actividad como monooxigenasa; en esta reacción, la enzima solo transfiere un átomo de oxígeno al sustrato mediante reacciones de hidroxilación y epoxidación (Figura 8).

La segunda forma de biotransformación del citocromo P-450, es la liberación de especies de oxígeno reducidas [55-57], en la cual se involucra la transferencia directa de un electrón a partir del citocromo P-450 a la molécula de oxígeno con la formación de radicales anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y posteriormente peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La tercera actividad del sistema citocromo P-450 se refiere a su actividad como reductasa.

Algunas de las reacciones llevadas a cabo por el CYP450 se muestran en la figura 8.

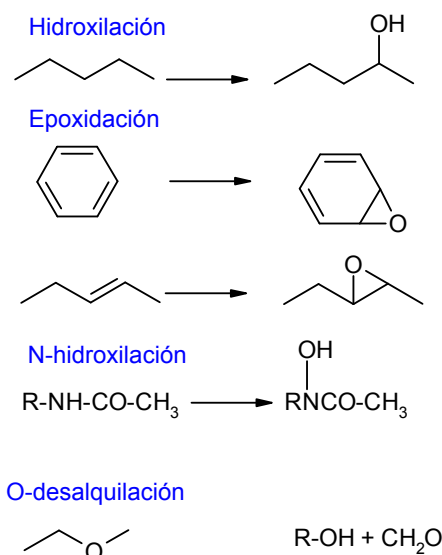


Figura 8. Reacciones de monooxigenación catalizadas por citocromo P-450 [1].

Una de las principales reacciones de citocromo P-450, es la monooxigenación; entre los sustratos que son biotransformados se encuentra la anilina. Esta sustancia es ampliamente utilizada en varios procesos industriales, como en la elaboración de plásticos [58], como intermediario en la síntesis de ciertos fármacos como la benzocaína, el ácido 5-aminosalicílico etc. Sin embargo, la anilina ha sido clasificada como un posible carcinógeno en humanos [59] y es reconocida por el

Nacional Institute for Occupational Safety and Health como un agente neurotóxico^[60].

Entre el 15-60% de la anilina absorbida, es oxidada por el citocromo CYP-450 a *p*-aminofenol (Figura 9), el cual es excretado en la orina principalmente como glucuronido y conjugados con sulfato; ^[61-64] menos del 1% es excretada sin cambio ^[65].



Figura 9. Oxidación de anilina a *p*-aminofenol catalizada por el CYP450

1.2. INMOVILIZACIÓN

Las enzimas son catalizadores biológicos (biocatalizadores) muy específicos lo cual los hace atractivos para su uso en diversos campos como: síntesis química fina, farmacéutica, biosensores, biorremediación, biología molecular (PCR) figura 10; estos biocatalizadores exhiben alta selectividad y reactividad bajo condiciones normales es decir bajo condiciones óptimas de pH y temperatura, pero son sensibles a desnaturalización o inactivación por pH y temperaturas extremos, solventes orgánicos y detergentes. Su corta vida bajo estas condiciones presenta limitaciones, por lo tanto mejorar la estabilidad de la enzima puede reducir la cantidad de enzima empleada, prolongar su vida útil de tal forma que la enzima pueda ser reutilizada o mantener buena señal cuando estas son empleadas en la fabricación de biosensores ^[66]. Existen varios métodos útiles para mejorar la estabilidad de las enzimas como: inmovilización, modificación química y modificación genética. La inmovilización de enzimas representa la unión o

incorporación de las moléculas de enzimas sobre o dentro de grandes estructuras, ya sea por simple adsorción, unión covalente o encapsulación ^[67].

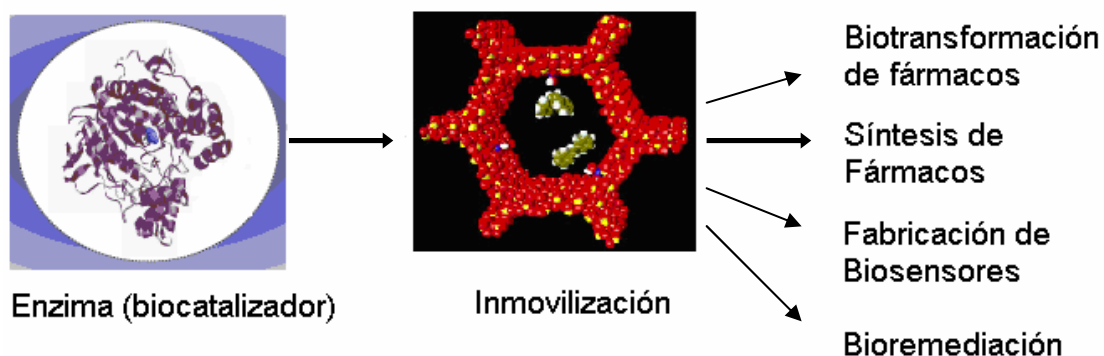


Figura 10. Inmovilización y aplicación de las enzimas inmovilizadas

Además, la inmovilización se ha definido como un proceso que permite fijar la enzima en una región del espacio ^[68], para dar lugar a sistemas insolubles, que mantengan su actividad catalítica y que pueden ser usados repetidamente, siendo ésta su principal ventaja.

El proceso de inmovilización presenta algunos inconvenientes como: a) cambios en la conformación de la enzima con respecto a su estado nativo; b) pueden existir distintas fracciones de proteína inmovilizada con diferente número de uniones al soporte debido a la gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte; y c) se puede perder la actividad enzimática durante la inmovilización. En ocasiones se observa un incremento en la estabilidad de las enzimas después de su inmovilización, debido principalmente a una estabilización conformacional originada por la existencia de uniones multipuntuales enzima-soporte. La estructura terciaria de la enzima adquiere una mayor rigidez y se hace más resistente a la desactivación térmica o química.

La inmovilización puede llevarse a cabo por diversos métodos, los cuales se han clasificado en dos categorías: retención física, entre los que se encuentra el atrapamiento e inclusión en membranas y unión química que tiene lugar cuando la enzima se enlaza a soportes mediante procesos de adsorción o formación de enlaces covalentes. La adsorción es uno de los métodos más sencillos en el cual la enzima se une al soporte sin funcionalizar mediante interacciones iónicas, fuerzas Van der Waals y por puentes de hidrógeno. Los principales factores que influyen en la adsorción son: el pH del medio, la fuerza iónica y el diámetro de poro.^[68]

Mediante el método de adsorción los aminoácidos de la enzima que pueden interaccionar con el soporte para la formación de enlaces son: la lisina, la cisteína, la tirosina y la histidina, y en menor medida la metionina, el triptófano, la arginina, el ácido aspártico y glutámico. Los otros aminoácidos, debido a sus grupos con carácter hidrofóbico, no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica, por lo que no intervienen en la unión.

Se ha utilizado una gran variedad, de materiales como soportes para la inmovilización de numerosas enzimas. Estos materiales difieren en tamaño, densidad, porosidad y forma, aunque generalmente los hay en forma de cilindro, hojas, fibras y también en forma de esferas. Debido a sus diferentes características los soportes se dividen en: soportes orgánicos (como polímeros naturales y polímeros sintéticos) y soportes inorgánicos, dentro de este último grupo hay una gran variedad de soportes que pueden ser naturales como la bentonita, piedra pómez, sílice etc. o materiales manufacturados (óxidos de metales y vidrio con tamaño de poro controlado, vidrio no poroso, alúmina, cerámicas, gel de sílice, etc.).

Recientemente, fueron reportados una nueva serie de materiales mesoporosos los cuales muestran un gran potencial para varias aplicaciones en diferentes

áreas entre las que cabe mencionar, cinética enzimática (inmovilización de enzimas) y medicina (regeneración de tejidos) ^[69]. Estos materiales ofrecen propiedades interesantes como alta área específica comportamiento hidrofóbico e hidrofílico e interacciones electrostáticas, un arreglo hexagonal ordenado, así como resistencia mecánica, haciéndolos atractivos para la inmovilización de enzimas ^[66].

Entre los materiales mesoporosos se encuentra MCM-41, el cual posee un área específica alta ($\sim 1000 \text{ m}^2/\text{g}$), una estructura porosa hexagonal altamente ordenada, su diámetro de poro es controlable ($20\text{-}500 \text{ \AA}$) ^[70]. MCM-41 ha sido utilizado como soporte de compuestos organometálicos y enzimas para catálisis. La figura 11 esquematiza la inmovilización de enzimas en materiales con arreglo hexagonal. La inmovilización de enzimas en MCM-41 fue reportada por primera vez por Diaz y Balkus 1996 ^[71]. Reportando la inmovilización de enzimas globulares como citocromo c (corazón bovino), papaína (papaya), tripsina (páncreas bovino) en MCM-41. La adsorción física de estas enzimas en MCM-41 con un diámetro de poro de 40 \AA mostró clara dependencia sobre el tamaño de la enzima. Encontrando que enzimas grandes como peroxidasa de rabano (molécula esférica con diámetro: 4.6 nm) eran poco adsorbidas sobre el material MCM-41 (tamaño de poro: 4 nm). Concluyendo que los materiales del tipo MCM-41 son útiles para inmovilizar enzimas pequeñas. Además encontró que la adsorción de las enzimas era dependiente también del pH reportando que la inmovilización de papaína y tripsina era favorable a un pH menor de 7, mientras que para citocromo c fue más eficiente a un pH mayor de 7 y fue menos susceptible a cambios de pH.

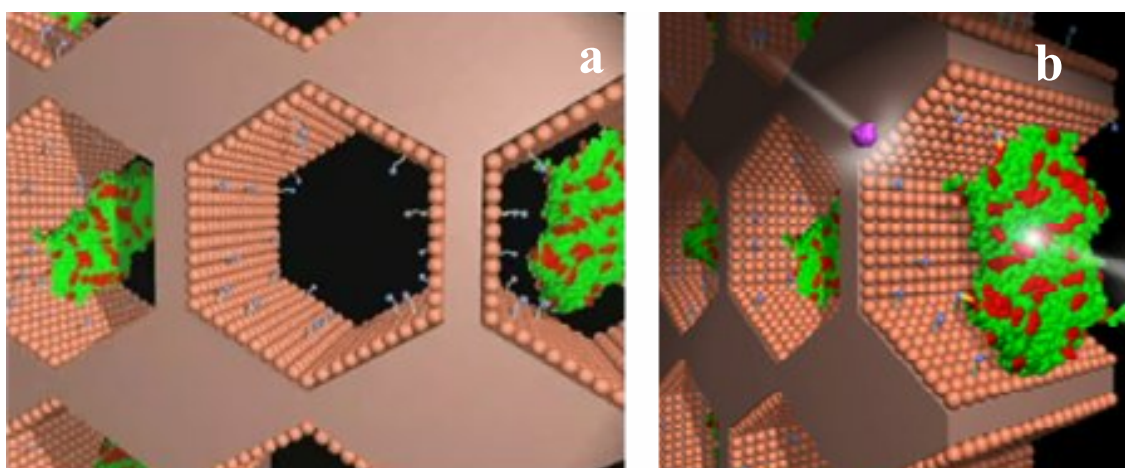


Figura 11. Estructura hexagonal de MCM-41 a) inmovilización de enzimas (verde-rojo) en sus poros, b) interacción de la enzima con la superficie del material. (www.technet.pnl.gov/sensors/biological/projects/Es4Enzimmob.stm)

Al igual que Díaz and Balkus, Takahashi *et. al.*^[72] reportaron que el tamaño del poro del material mesoporoso es uno de los factores que afectan la inmovilización de enzimas, como se mencionó anteriormente esto puede afectar la adsorción de la enzima e incluso puede ocasionar que la enzima que queda adsorbida se desprenda del material y que enzimas grandes no sean adsorbidas.

En el 2001 Yiu Humphery *et al.*^[73] Inmovilizaron tripsina a partir de páncreas bovino en diferentes materiales mesoporosos en los cuales se incluía MCM-41, SBA-15 ambos materiales con un arreglo hexagonal de sus poros. MCM-41 con diámetro de poro de 35 Å el cual era ligeramente menor al diámetro de tripsina (38 Å) por lo cual, la cantidad de enzima inmovilizada en éste material fue menor en comparación con SBA-15 (56 Å).

Con estos primeros estudios se llegó a la conclusión de que para el proceso de inmovilización de enzimas en materiales mesoporosos es importante que el diámetro de la enzima sea semejante al diámetro de poro del material. Otro factor importante para la inmovilización de enzimas en materiales mesoporosos es la

interacción entre cargas, ya que si la carga neta en la superficie de la enzima es opuesta a la carga del mesoporo, esto facilitaría no solo la adsorción de la enzima sino también contribuir a la estabilidad de la enzima debido a la atracción entre cargas opuestas, sin embargo, cuando la carga de la enzima y el material son las mismas es poca la enzima adsorbida y la estabilidad de ésta debido a la repulsión entre cargas. Las cargas en la enzima y el material pueden ser controladas cambiando el pH del buffer ^[74-75], funcionalizando el material con grupos amino y carboxilo o mediante modificaciones hidrofóbicas con octiltrióxido de silano, ya que Blanco et al 2004 demostró que las interacciones hidrofóbicas pueden estabilizar fuertemente a la lipasa ^[76].

MCM-41 también ha sido empleado para la inmovilización de la penicilina acilasa en ese trabajo los autores usaron dos métodos de inmovilización uno por simple adsorción física y otro por unión covalente usando glutaraldehído ^[87]. Encontrado que la actividad de la penicilina acilasa era cinco veces mayor cuando se inmovilizaba por simple adsorción mas que cuando se inmovilizó por unión covalente usando glutaraldehído. Por lo tanto se han estudiado diversas formas de modificar la superficie de los materiales MCM-41 mediante funcionalización con diversos grupos como son -SH y -COOH ya que este tipo de modificaciones puede aumentar las interacciones de la enzima con el soporte mediante fuerzas físicas como puentes de hidrogeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas e interacciones electrostáticas, estas modificaciones han hecho aun mas interesantes el uso de estos materiales para la inmovilización de enzimas.

Otra de las enzimas inmovilizadas en MCM-41 es la lipasa pancreática porcina esta enzima fue inmovilizada gracias a la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilos del soporte y la enzima, sin embargo viniltrimetoxisilano fue utilizado para modificar el material y evitar el desprendimiento de la enzima, con esta modificación la enzima pudo ser reutilizada ^[78]

A pesar del gran uso que han tenido los materiales mesoporosos para el la inmovilización de enzimas también han sido útiles para la inmovilización de zimógenos que si bien son proteínas que carecen de actividad catalítica estas pueden ser activadas por hidrólisis de los enlaces peptídico inclusive una vez inmovilizadas en MCM-41. En el año 2003 Fadnavis *et al* reportaron la inmovilización del α -quimiotripsinogeno sobre MCM-41^[79]. El zimógeno fue inmovilizado por simple adsorción física con alto rendimiento (170 mg/g sólido). Posteriormente el zimógeno fue activado con tripsina obteniéndose α -quimiotripsina inmovilizada en MCM-41. Esto fue de gran relevancia ya que los métodos comerciales por los cuales se obtiene α -quimiotripsina inmovilizada dan muy bajo rendimiento en comparación con el método reportado por Fadnavis.

1.2.1. MATERIAL MESOPOROSO DEL TIPO MCM-41

De acuerdo a la definición de la IUPAC, los materiales porosos se han dividido en tres clases: microporosos (< 2 nm), mesoporosos (2-50 nm) y macroporosos (>50 nm). Así por ejemplo, las zeolitas son materiales microporosos que han mostrado tener excelentes propiedades catalíticas. Sin embargo, su aplicación es limitada debido al tamaño de poro ^[80], por lo cual se han sintetizado materiales con tamaños de poro más grandes entre los que se encuentra el Mobil Crystalline Material (MCM-41).

Este material pertenece a la familia M41S integrada por MCM-41, MCM-48 y MCM-50. La MCM-41 fue el primer sólido mesoporoso sintetizado en 1992 por miembros de la compañía Mobil ^[81], quienes demostraron que tiene un arreglo hexagonal ordenado como se muestra en la figura 12. Debido a que se puede modificar el diámetro del poro y la acidez, se ha puesto gran interés en la caracterización, en el mecanismo de formación y en la síntesis de nuevos materiales mesoporosos del tipo MCM-41.

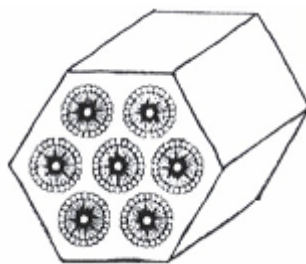


Figura 12. Representación del arreglo hexagonal de la MCM-41 ^[80]

1.2.1.1. CARACTERIZACIÓN

Para la caracterización de MCM-41 se han empleado diversas técnicas: a) difracción de rayos-X (DRX), b) microscopía electrónica de transmisión (MET) y c) análisis de texturas.

1.2.1.1.1. DIFRACCIÓN DE RAYOS X

El proceso de difracción puede visualizarse como una refracción debida a los planos cristalográficos (hkl) separados por una distancia d_{hkl} . El haz difractado corresponde a una reflexión para un ángulo θ particular entre el haz incidente y el plano cristalográfico para el cual se tendrá:

$$n\lambda = 2 d_{hkl} \sin \theta$$

donde λ es la longitud de onda, n el orden del haz difractado, θ el ángulo de difracción y d_{hkl} la distribución interplanar. Esta expresión se conoce como la ley de Bragg.

Bragg al estudiar la reflexión de los rayos X ^[82] sobre la cara exfoliada de halita (ClNa) comprobó que:

1) La reflexión de los rayos X tenía lugar al incidir sobre sólidos cristalinos, esto es, a un ángulo de incidencia θ correspondía otro ángulo de reflexión θ .

2) A diferencia con el fenómeno de la reflexión de la luz, los rayos X se reflejaban sólo en una mínima proporción.

3) La reflexión tenía lugar únicamente a valores discretos de θ que dependían de:

La λ de los rayos X utilizados.

Del tipo de cristal empleado.

De la orientación cristalográfica del cristal.

El patrón de difracción del MCM-41, muestra de tres a cinco difracciones, desde 2° hasta 5° en una escala 2θ . Las difracciones se han asignado al arreglo hexagonal de los tubos, las cuales están en los planos (100), (110), (200), (210) y (300), como se muestra en la Figura 13

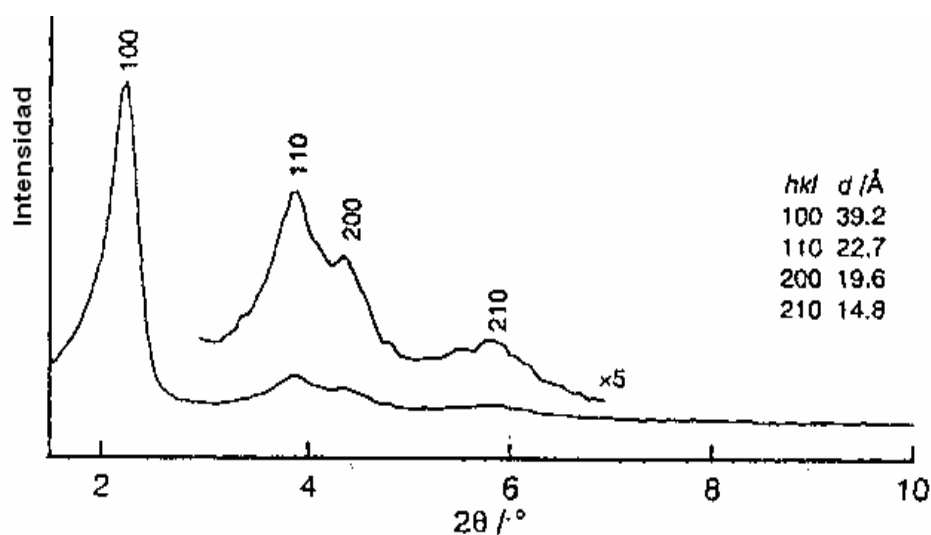


Figura 13. Patrón de difracción de rayos X de MCM-41 calcinada [83].

Las intensidades de las difracciones del MCM-41 en relación con el ángulo de difracción 2θ son mostradas en la figura 13; donde la intensidad del haz de rayos X se refiere al número de fotones por unidad de superficie y por unidad de tiempo.

1.2.1.1.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Para conocer la microestructura del material MCM-41, se emplea la microscopía electrónica de transmisión (MET). Esta técnica de caracterización debe su nombre a la utilización de electrones como elemento de interacción con la materia; los electrones transmitidos son los que dan origen a la imagen local del material ^[84]. Debido a que el elemento interactivo que el MET utiliza, es el electrón, se puede cambiar su energía cinética y con ello la longitud de onda del electrón, con esto se puede controlar la resolución del microscopio.

1.2.1.1.3. ANÁLISIS DE TEXTURAS

Para determinar el área específica del MCM-41 se emplea el análisis de texturas. Éste se basa en el fenómeno de adsorción desarrollado por Langmuir quien consideró que la superficie del adsorbente (sólido) contiene un número fijo de lugares de adsorción y cada lugar puede adsorber una sola molécula de adsorbato (gas o vapor), sin que exista interacción con las moléculas adsorbidas ^[85]. La relación existente entre la cantidad de gas adsorbido en el equilibrio y la presión del mismo a una temperatura dada es lo que se conoce como isoterma de adsorción.

Para determinar el área específica de los materiales mesoporosos MCM-41, se expone el área geométrica externa e interna a un gas como N₂, O₂ y Ar y mediante la isoterma de adsorción de Langmuir, se determina la cantidad de gas necesaria para cubrir con una monocapa adsorbida la superficie del sólido ^[86-87].

La isoterma de adsorción se obtiene al graficar el volumen adsorbido contra la relación entre la presión de referencia y la presión del adsorbato (p/p_0). De acuerdo a la clasificación de la IUPAC, el material mesoporoso MCM-41 con

poros alrededor de 4 nm presenta una isoterma de adsorción de tipo IV cuando se emplea como adsorbato nitrógeno.

La isoterma de adsorción del MCM-41 muestra dos características principales, la primera es una condensación capilar a una presión relativa de 0.4 y la segunda no presenta histéresis entre la adsorción y desorción, como se muestra en la Figura 14. El desfaseamiento entre la curva de adsorción y desorción del gas es lo que se conoce como histéresis.

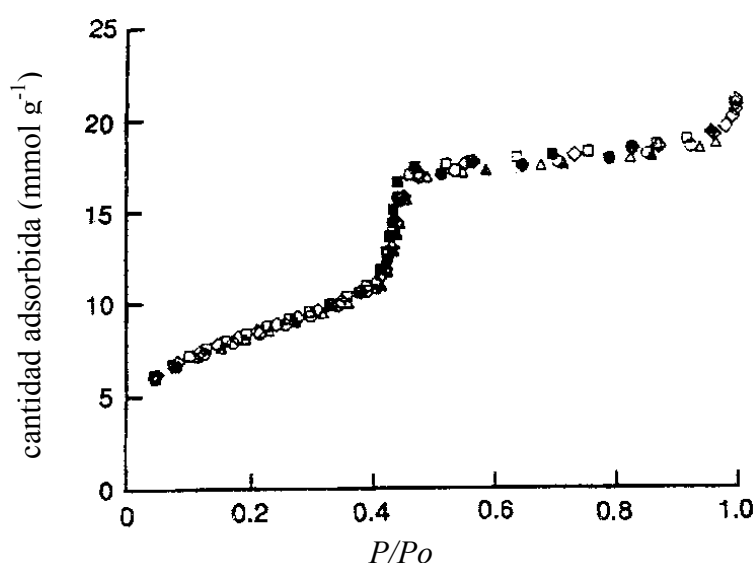
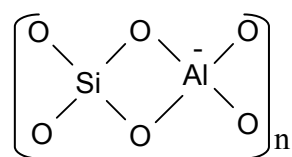


Figura 14. Isotherma de adsorción del MCM-41 con poros de 4 nm a 77 K con N₂ [73].

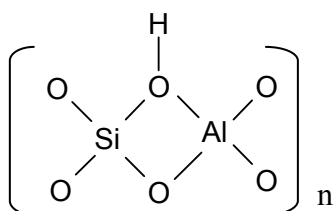
La distribución de diámetro de poro, se obtiene de los datos de la desorción del adsorbato, ya que una vez que la isoterma de adsorción termina, se puede desadsorber el gas y con esto obtener la curva de desorción. El método tradicional para analizar la distribución de diámetro de poros en el rango de mesoporos es el Barrett-Joyner-Halenda (BJH) [86].

1.2.1.1.4. ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN EN EL INFRARROJO

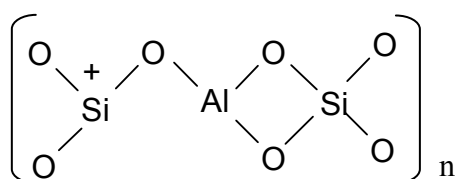
La acidez es una de las características superficiales del MCM-41. Los sitios ácidos de Bronsted en los sólidos pueden ser generados cuando un catión trivalente está presente en coordinación tetraédrica con oxígeno, por ejemplo el aluminio como se muestra a continuación:



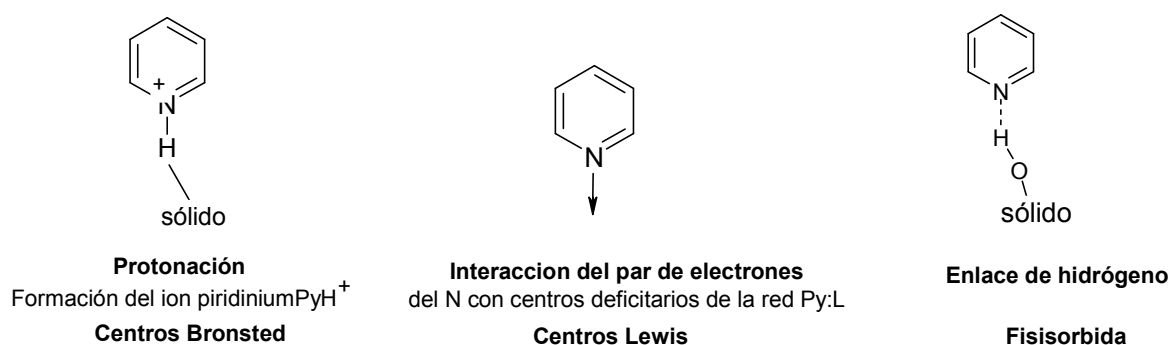
Cuando el exceso de cargas negativas son compensadas por protones se forman los grupos silanol ^[82-88].



Los sitios ácidos de Lewis pueden aceptar electrones ya que el silicio tiene una carga positiva, como se esquematiza a continuación:



Para determinar la acidez se emplea la espectrofotometría de absorción en el infrarrojo (IR) con piridina (Py) ^[89]. La piridina puede distinguir entre los sitios ácidos de Bronsted (I) y Lewis (II) en el material, ya que se originan las siguientes especies cuando reacciona con el sólido:



Estas estructuras tienen distintos modos vibracionales y son fácilmente identificados por espectroscopia de infrarrojo (IR). Cuando se realizan estudios de IR con piridina en muestras de aluminosilicatos como MCM-41, se observan bandas en 1546 y 1492 cm^{-1} asignadas a iones piridinium formados por la adsorción de piridina sobre los sitios ácidos de Bronsted. La banda a 1455 cm^{-1} la cual es parcialmente sobre puesta a la banda de 1449 cm^{-1} indica la presencia de sitios ácidos de Lewis por la coordinación de la piridina. [88-89].

1.3. RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA

Muchos procesos biológicos que se llevan a cabo en el organismo y que involucran transferencia de electrones han sido estudiados mediante resonancia paramagnética electrónica (EPR), un ejemplo de gran importancia es la cadena respiratoria, en la cual los electrones donados por el NADPH y el FADH son transferidos a través de los complejos multienzimáticos, además, en este proceso participan proteínas que tienen en su sitio activo átomos de hierro en un estado de oxidación de Fe^{+3} y cobre en un estado de oxidación de Cu^{+2} , estos dos metales son especies paramagnéticas, ya que poseen electrones desapareados y pueden originar una señal de EPR. Por lo tanto, todas aquellas proteínas que contengan átomos con electrones desapareados y todos aquellos procesos biológicos que involucren la transferencia de electrones pueden ser estudiados mediante EPR.

Para que un sistema exhiba el fenómeno de resonancia magnética, éste debe estar compuesto de partículas que poseen un momento magnético y un momento angular. Tanto los núcleos como los electrones satisfacen esta condición.

El núcleo tiene un momento magnético miles de veces mas pequeño que el de un electrón; consecuentemente, la resonancia magnética nuclear (RMN) y la resonancia paramagnética electrónica (EPR) son diferentes, ya que los experimentos en RMN se llevan a cabo a 10^6 - 10^8 Hz en el rango de radio frecuencia, mientras que en EPR es 10^{10} - 10^{11} Hz en el rango de microondas (figura 15). Mediante estas dos técnicas se obtiene diferente tipo de información; sin embargo, la teoría fundamental es común en ambas^[90].

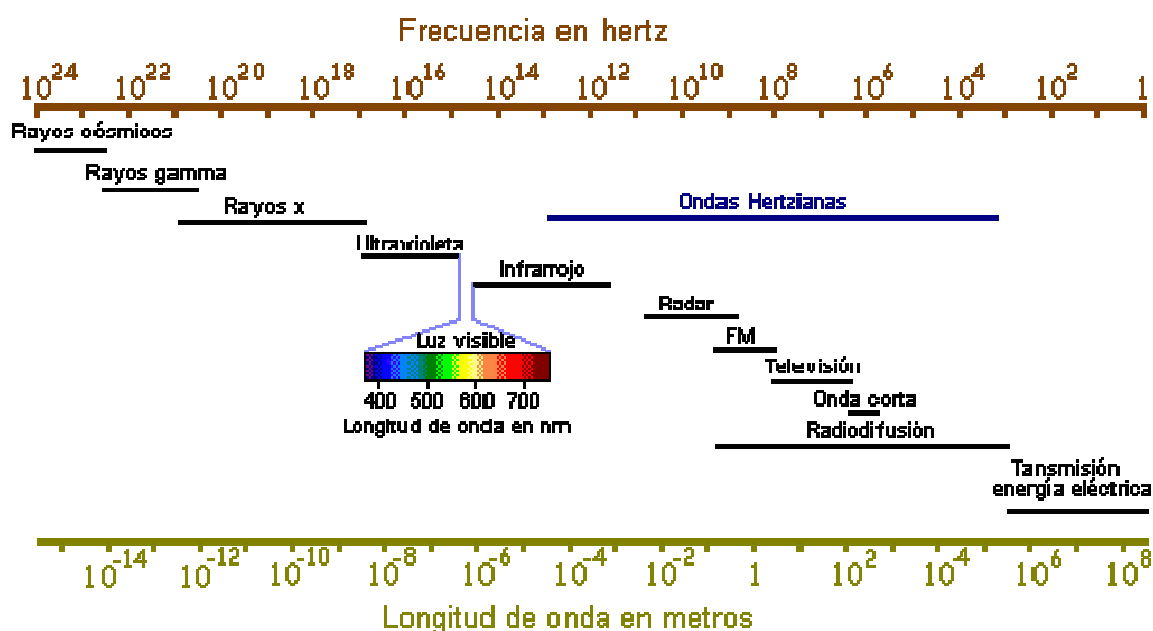


Figura 15. Espectro electromagnético en donde se localiza los intervalos de frecuencia 10^6 - 10^8 Hz para RMN y de 10^{10} - 10^{11} Hz para EPR. (<http://edison.upc.edu/curs/ilum/luz/vision/luz.html>)

Un átomo o molécula la cual contiene electrones desapareados tienen un momento angular y posee su correspondiente momento magnético. Los mejores ejemplos son los iones de los elementos de transición con electrones desapareados en orbitales parcialmente llenos; por ejemplo, el hierro y el cobre,

los cuales son de gran importancia en diferentes enzimas como la hemoglobina, la cloroperoxidasa, el CYP-450 y la citocromo oxidasa esta última enzima contiene ambos metales en su sitio activo. Por lo tanto, estas enzimas al igual que el material MCM-41 modificado con algún metal de estos pueden ser estudiados por EPR. El principio básico de la resonancia se basa en lo siguiente: si un dipolo magnético es situado en un campo magnético uniforme externo H_0 , el vector del momento magnético va a precesar (es decir a girar sobre el mismo eje) en dirección de H_0 con una frecuencia angular ω_0 dada por:

$$\omega_0 = g_L (e/2mc)H_0 \quad \text{ec. 1}$$

donde ω_0 corresponde a la clásica frecuencia de precesión de Larmor, g_L es el factor de Landé ($g_L = 1$, para un momento orbital puro y $g_L = 2$ para el espín de un electrón libre).

Para el caso de un ión en un cristal, el comportamiento es modificado por el ambiente y el factor g podría diferir a partir del valor de Landé. El factor g es conocido como factor espectroscópico^[91].

Si un campo magnético oscilante polarizado circularmente es aplicado al sistema para que este rote cerca de H_0 en el mismo sentido y con la misma frecuencia angular como el vector del momento precesor, éste podría ejercer un acoplamiento sobre el dipolo invirtiendo su dirección con respecto a H_0 , lo cual origina un intercambio de energía entre el campo oscilatorio y el sistema magnético. Esto ocurre solo cuando la frecuencia de oscilación coincide con la frecuencia de precesión de Larmor de acuerdo a la ecuación 1, ω_0 es referida a la frecuencia resonante^[91].

Un campo polarizado linealmente puede estar compuesto por dos componentes polarizados circularmente rotando en sentidos opuestos, solo uno de ellos es capaz de inducir transiciones en el sistema magnético. Este caso podría ser entendido considerando un solo electrón libre con espín $s=1/2$ y momento magnético:

$$\mu = \beta = \frac{eh}{4\pi mc} \quad \text{ec. 2}$$

donde β es el magneton de Bohr ($\beta = ek/2mc = 0.927 \times 10^{-20}$ erg gauss⁻¹; donde k es la constante de Boltzmann). En un campo H_0 , μ podría ser alineado paralela o antiparalelamente a dicho campo H_0 . Por lo tanto, una gráfica de la energía magnética contra el campo magnético consiste en dos líneas rectas una para cada estado de energía permitido, estas son referidas como niveles de energía. Un electrón en su nivel energético más bajo puede ser excitado al siguiente nivel; para que éste electrón pueda cambiar de nivel energético, debe absorber un cuanto de energía del campo oscilatorio, tal que:

$$h\nu_0 = E_2 - E_1 = 2\mu H_0 \quad \text{ec. 3}$$

$$h\nu_0 = g\beta H_0 \quad \text{ec. 4}$$

donde el factor g para un electrón libre es tomado como 2. Si el valor $eh/(4\pi mc)$ es sustituido por β la ecuación 3 es idéntica a la ecuación 4. Es conveniente reemplazar h y β con valores numéricos y las condiciones de resonancia pueden ser escritas:

$$H_0 \text{ (kG)} = (0.71449/g) \nu_0 \text{ (GHz)}$$

(1 GHz = 10^9 Hz).

Con esta ecuación podemos calcular el valor de g si conocemos la frecuencia (ν_0) y el campo (H_0) o el campo si tenemos el valor g y la frecuencia. Para un valor de $g = 2$ y $\nu_0 = 10$ GHz el campo magnético es cercano a 3.5 kG.

En general los trabajos experimentales son llevados a cabo a frecuencias en el rango de 1-100 GHz donde pueden ser usadas técnicas estándar de microondas. Las frecuencias más usadas son de 9 GHz (Banda X), 35 GHz (Banda Q).

El procedimiento experimental consiste en colocar la muestra en la cavidad resonante, la fuente de microondas es sintonizada a la frecuencia de la cavidad resonante y mantenida constante, mientras que la magnitud del campo se varía hasta que se cumple las condiciones de resonancia de la ecuación 4. Esto puede ser detectado midiendo el cambio en el factor Q de la cavidad resonante cuando la energía de microondas es absorbida por el sistema magnético ^[91-92].

1.3.1. EQUILIBRIO TÉRMICO

Cuando un sistema consiste de un gran número de dipolos magnéticos en un campo a la frecuencia resonante la probabilidad de absorción de un cuanto radiante de energía es exactamente igual para la de emisión (de acuerdo a leyes de radiación de Einstein). Entonces la velocidad de transición de un nivel de menor energía a otro de mayor energía y viceversa son proporcionales al número de iones en el estado 1 de menor energía (N_1) y al número de iones en el estado 2 de mayor energía (N_2) respectivamente. La velocidad de absorción o emisión es determinada por la diferencia entre las transiciones del estado base al primer estado excitado y viceversa.

Bajo condiciones de equilibrio térmico, las poblaciones son determinadas por la función de distribución de Boltzmann:

$$N_1/N_2 = \exp((E_2 - E_1)/kT) = \exp(h\nu_0/kT)$$

donde T es la temperatura absoluta del sistema cuya unidad es el Kelvin (K) y k es la constante de Boltzmann. Entonces bajo equilibrio térmico, $N_1 > N_2$ resultando

en un exceso de transiciones de un nivel del estado base al primer estado excitado y la absorción neta de energía a partir del campo. Sin embargo, tal evento puede conducir obviamente a un incremento en N_2 es decir una mayor población en el estado excitado lo cual podría continuar hasta que N_2 sea igual a N_1 y la absorción de energía neta tienda a cero. Entonces el sistema magnético no puede absorber más energía (potencia de microondas) y se dice que esta *saturado*.

La saturación del sistema magnético no ocurre de forma general debido al acoplamiento entre el sistema magnético (generalmente referido como el 'sistema espín') y la red cristalina conteniendo especies magnéticas. Esta 'relajación espín-red cristalina' provee una vía alternativa mediante la cual los iones excitados pueden regresar al estado base y como este es un proceso no radiactivo, no es gobernado por las leyes de radiación. Un fuerte acoplamiento espín-red cristalina permite al sistema espín perder energía hacia el cristal tan rápidamente como el campo suministra energía, en equilibrio térmico los valores de N_1 y N_2 son mantenidos y la energía es absorbida permanentemente hasta que las condiciones de resonancia son alcanzadas. Un acoplamiento débil permite la saturación a bajas potencias de microondas, mientras que un fuerte acoplamiento podría ser superado solo incrementando el campo en la cavidad por ejemplo aumentando la potencia. La saturación debe ser normalmente evitada porque esta reduce la señal observable y distorsiona la forma de la línea de absorción.

Finalmente, una forma de obtener el número efectivo de espines en un experimento de resonancia, es:

$$N_1 - N_2 = N$$

$$N_1 - N_2 = n$$

$$n = N \left(\frac{\exp(h\nu_0/kT) - 1}{\exp(h\nu_0/kT) + 1} \right)$$

Si se asume que $h\nu_0 \ll kT$, lo cual es usualmente una buena aproximación a bajas temperaturas (4 K), entonces podemos escribir:

$$n \sim 1/2 N (h\nu_0)/kT$$

A temperatura ambiente y una frecuencia de 10^{10} Hz, $n \sim N/1000$. Excepto a temperatura en el rango de helio líquido, n es una pequeña fracción del número total de iones magnéticos presentes.

1.3.2. IÓN DE HIERRO

Para un ion particular, los electrones desapareados casi siempre están en un solo orbital y tienen energías apropiadas de acuerdo a éste. Tanto el hierro como el cobre tiene electrones d en el orbital $3d$ sin llenar, estos electrones están involucrados en las reacciones de oxido-reducción. Por lo tanto, es importante describir las densidades electrónicas, por ejemplo las funciones de onda (orbitales). La dependencia angular de los orbitales ortogonales $3d$ se muestra en la figura 16. Los orbitales d_{xy} , d_{xz} , d_{yz} son llamados orbitales t_{2g} o d_E , mientras que d_z^2 y $d_{x^2-y^2}$ son llamados orbitales e_g o d_γ . En el ion libre, la energía de los cinco orbitales es la misma ya que son orbitales degenerados. El punto importante del campo cristalino es que el efecto del ambiente cristalino no es el mismo sobre todos los orbitales d y por lo tanto se rompe la degeneración de los cinco orbitales.

Una vez establecido el orden de los niveles de energía, los electrones son distribuidos en ellos. Es energéticamente favorable poner a cada uno de los electrones en cada orbital. El hierro (+2) tiene seis electrones d y el hierro (+3) tiene cinco electrones d para ser acomodados. El cobre (+2) tiene nueve electrones d y el valor de espín es igual a $1/2$, no así para el cobre (+1) en donde su valor de espín es igual a 1

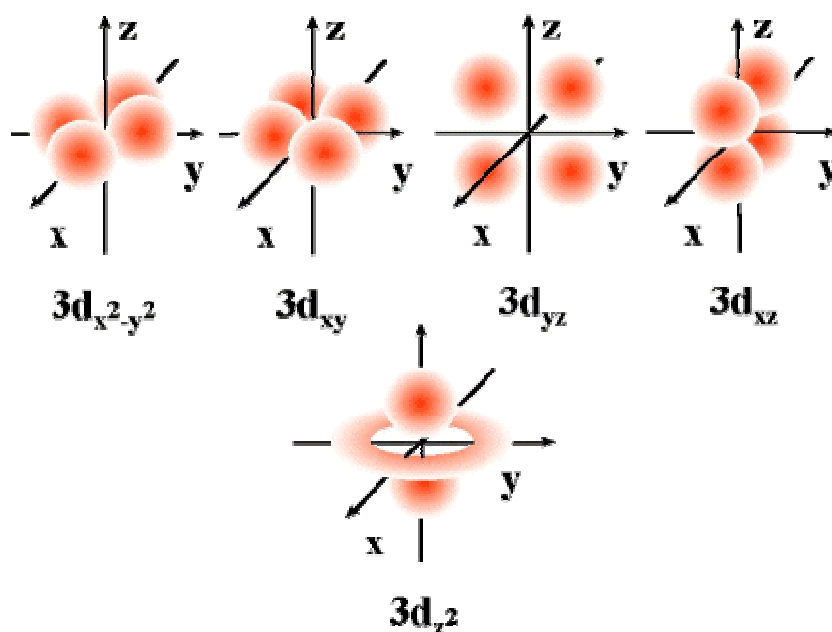


Figura 16. Orbitales del átomo de hierro: d_{xy} , d_{xz} , d_{yz} son llamados también orbitales t_{2g} o d_E ; $d_{x^2-y^2}$ y d_{z^2} son llamados también orbitales e_g o d_γ . (<http://edison.upc.edu/curs/ilum/luz/vision/luz.html>)

En un complejo octaédrico regular, los primeros tres electrones pueden ser colocados con sus espines paralelos en los orbitales t_{2g} . El cuarto electrón, con su espín paralelo a los tres anteriores es colocado en el orbital e_g . Esto puede ser energéticamente ventajoso dependiendo del valor de Δ . Si el valor de Δ es muy grande, uno habla de campo cristalino alto en el cual los orbitales t_{2g} están llenos; resultando un compuesto de bajo espín. Para pequeños valores de Δ , se tiene un campo cristalino bajo, resultando en un compuesto de alto espín. Los posibles valores de espín para Fe^{+2} y Fe^{+3} se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 1. Distribución de los electrones en los orbitales d del Fe^{3+} y Fe^{2+} .

	<i>Alto Espín</i> <i>Campo bajo</i>	<i>Espín intermedio</i> <i>Campo intermedio</i>	<i>Bajo espín</i> <i>Campo alto</i>
Cinco electrones d Fe^{3+}	 $\uparrow \uparrow \uparrow \quad S=5/2$	 $\uparrow \uparrow \uparrow \quad S=3/2$	 $\uparrow \uparrow \uparrow \quad S=1/2$
Seis electrones d Fe^{2+}	 $\uparrow \uparrow \uparrow \quad S=2$	 $\uparrow \uparrow \uparrow \quad S=1$	 $\uparrow \uparrow \uparrow \quad S=0$

2. JUSTIFICACIÓN

Una de las principales enzimas en el metabolismo de fase I es el complejo multienzimático citocromo P-450, del cual las familias CYP1, CYP2 y CYP3 son las encargadas principalmente del metabolismo de fármacos. Entre CYP3A4 y CYP3A5 metabolizan cerca del 50% de éstos. El proceso de biotransformación es uno de los más importantes para la eliminación de los fármacos ya que las enzimas del CYP-450 convierten las moléculas hidrofóbicas en hidrofílicas, generando en algunas ocasiones metabolitos inactivos o metabolitos con potente actividad biológica.

Muchos estudios sobre metabolismo de fármacos son llevados a cabo *in vitro*, empleando microsomas obtenidos de hígado de rata o de humano y NADPH, sin embargo con este sistema es difícil conocer cual de las isoformas es la que metaboliza el compuesto que se desea evaluar. Por tal motivo, se han hecho estudios empleando isoformas de citocromo P-450 puras como CYP3A4 y CYP2C9 obtenidas de muestras de hígado humano y sistema regenerador de NADPH con glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, lo cual resulta costoso y en algunas ocasiones difícil de obtener.

Una alternativa a estos problemas es el uso de isoformas del citocromo P-450 inmovilizadas y nuevos sistemas regeneradores de NADPH ^[93]. La inmovilización de citocromo P-450 permitiría tener sistemas aislados con cada una de las isoformas y conocer cual de las enzimas metaboliza una mayor cantidad del compuesto y cual de ellas origina un metabolito que pudiera ser tóxico. Todo esto con la gran ventaja de que estos sistemas puedan ser reutilizados.

Diversos trabajos sobre la inmovilización de citocromo P-450 han sido llevados a cabo; en 1980 se llevó a cabo la inmovilización de microsomas conteniendo

citocromo P-450, citocromo P-450 reductasa y glucoroniltransferasa sobre sefarosa activada^[94], para estudiar el metabolismo de fármacos en la fase I y II al mismo tiempo. La actividad de la enzima se incrementó cerca de un 40 % sin embargo, en éste sistema no se tuvo actividad sin NADPH, ni en ausencia de la citocoromo P-450 reductasa.

En 1993 se inmovilizaron los microsomas obtenidos de hígado de rata pretratada con fenobarbital en membranas Romicon PM. 10^[95]; en este estudio se comparó la actividad de la preparación microsomal libre e inmovilizada, reteniéndose tan solo el 20 a 25 % de la actividad en la forma inmovilizada.

De las isoformas del citocromo P-450 que han sido inmovilizadas se encuentra CYP71B1 de planta, está se ha inmovilizado junto con la citocromo P-450 reductasa empleando una técnica coloidal (CLAs)^[96], la eficiencia de la inmovilización fue mayor del 85% y la actividad fue 10 veces mayor que la enzima libre. Otra de las isoformas de citocromo P-450 que se han inmovilizado es CYP105D1 a partir de *Streptomyces griseus* expresada en *Escherichia coli* utilizando DE52 y un sistema regenerador de NADPH^[97].

Como puede observarse se ha hecho un gran esfuerzo en obtener un sistema con citocromo P-450 inmovilizado para su aplicación en estudios de biotransformación, sin embargo, isoformas puras del citocromo P-450 microsomal no han sido inmovilizadas. Además de que en estudios anteriores el uso de NADPH y citocromo P-450 reductasa han sido necesarios para mantener la actividad catalítica.

Por lo tanto, en este trabajo se plantea la posibilidad de inmovilizar CYP2B4 una isoforma del citocromo P-450 obtenida de hígado de conejo, la cual ha sido ampliamente estudiada y comparte relación estructural y catalítica con CYP3A4. Para la inmovilización de la enzima se propuso usar como soporte MCM-41 un

material mesoporoso, debido a que este tipo de materiales han tenido una gran aplicación en biología y medicina ^[98], además de que MCM-41 ha sido empleado para la inmovilización de otras enzimas como citocromo c, papaína, tripsina entre otras, debido a que este material tiene una área específica elevada alrededor de 1000 m²/g, además sus características superficiales pueden ser modificadas mediante la incorporación de metales como aluminio, cobre, vanadio y titanio entre otros. Estas modificaciones son importantes ya que modulan la acidez y basicidad de MCM-41 y estas pueden ser de gran interés en la inmovilización de enzimas ya que el material puede participar en la transferencia de electrones gracias a la formación de sitios ácidos de Lewis y Bronsted. Por lo tanto, al usar el material MCM-41 modificado con aluminio (Al-MCM-41) y cobre (Cu-MCM-41) e inmovilizar en éste la enzima CYP2B4 es posible que no sea necesario el uso de CPR para la transferencia de electrones. Por consiguiente este sistema de CYP2B4 inmovilizada en Al-MCM-41 y Cu-MCM-41 permitiría evaluar la biotransformación de fármacos y nuevos compuestos a un menor costo, obtener este tipo de sistemas con diferentes isoformas del citocromo P-450, así como evaluar su posible reutilización ya que se ha demostrado que otras enzimas inmovilizadas en este tipo de materiales mantienen su actividad catalítica^[99]. Además es posible que la transferencia de electrones pueda ser modulada de forma más eficiente mediante la incorporación de metales en MCM-41 o la modificación del grupo hemo de CYP2B4, ya que algunos estudios con hemoglobina ^[100] han mostrado que la actividad de esta enzima se incrementa cuando el grupo hemo es modificado con grupos electroattractores en las posiciones de los vinílicos y propiónicos, esto quiere decir que modificaciones de este tipo en el grupo hemo de CYP2B4 podrían incrementar su actividad catalítica, esto sería de gran importancia ya que las enzimas del citocromo P-450 catalizan una gran variedad de reacciones y por lo tanto podrían ser usadas no sólo para el estudio de biotransformación de fármacos sino también en síntesis orgánica y en procesos de bioremediación.

3. HIPÓTESIS

Si varias enzimas muestran actividad catalítica inmovilizadas en MCM-41, es posible que CYP2B4 inmovilizada en MCM-41 con aluminio y cobre tenga actividad catalítica. Además, si este material participa en la transferencia de electrones con carotenoides, es probable que también realice dicho proceso con CYP2B4 inmovilizada, sustituyendo así el uso de CPR.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Explorar la actividad catalítica y la transferencia de electrones entre CYP2B4 y MCM-41 modificada con aluminio y cobre, en ausencia de CPR, utilizando como reacción modelo la oxidación de anilina. Lo anterior, con la finalidad de obtener un sistema que permita llevar a cabo reacciones de biotransformación de fármacos *in vitro* a menor costo. Además evaluar la influencia que ejercen las modificaciones en el grupo hemo de CYP2B4 mediante estudios de orbitales frontera, con el propósito de encontrar las modificaciones que permitan incrementar la actividad de CYP2B4.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener y cuantificar citocromo P-450 de hígado de conejo.
2. Purificar la isoforma CYP2B4.
3. Sintetizar el material mesoporoso MCM-41 con aluminio (Al^{+3}) y cobre (Cu^{+2}).
4. Identificar el material mesoporoso MCM-41 por difracción de rayos X, análisis texturales y microscopía electrónica de transmisión
5. Inmovilizar CYP2B4 sobre MCM-41 con aluminio y cobre.
6. Determinar la actividad de CYP2B4 inmovilizada sin emplear citocromo P-450 reductasa.
7. Detectar la transferencia de electrones mediante estudios EPR.
8. Evaluar mediante estudios de orbitales frontera, modificaciones en el grupo hemo especialmente en las posiciones donde se localizan los grupos vinílicos y propiónicos.

5. DISEÑO METODOLÓGICO

5.1. INDUCCIÓN Y OBTENCIÓN DE CITOCROMO P-450.

5.1.1. ADMINISTRACIÓN DE FENOBARBITAL. Se emplearon 6 conejos machos New Zeland con un peso de 2-2.5 Kg, los cuales fueron divididos en dos grupos de 3 conejos, un grupo sirvió como testigo a éste se le administró solución salina y al otro grupo se les administró fenobarbital vía intraperitoneal (120 mg/Kg en solución salina 0.9%) por 10 días^[101].

5.1.2. EXTRACCIÓN Y DISECCIÓN DEL HÍGADO. Al onceavo día de tratamiento, los conejos se sacrificaron y el hígado se prefundió *in situ*, por la vena cava inferior con 100 mL de solución fisiológica fría^[101].

5.1.3. OBTENCIÓN DE LOS MICROSOMAS. Se extrajo el hígado, se mantuvo en hielo seco y se homogeneizó con 20 mL de sacarosa 0.25 M usando un homogenizador Dispergierstation T 8.10 (5 min, velocidad 4). La fracción microsomal se obtuvo por una modificación del método de Manno^[102-103]. El homogenizado se centrifugó a 8 500 rpm por 16 min a 4 °C utilizando una centrifuga Eppendorf 5804R. Al sobrenadante se le adicionó cloruro de calcio hasta alcanzar una concentración final de 8 mM, se agitó y se centrifugó a 19 500 rpm por 28 min a 4 °C. El sobrenadante se descartó y los microsomas contenidos en el precipitado se resuspendieron en 15 mL de una solución de KCl 0.15 M, se agitó y centrifugó nuevamente a 19 500 rpm por 28 min a 4 °C. Finalmente, los microsomas se resuspendieron en buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.4 con 20% de glicerol y se almacenaron a -80 °C.

5.1.4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA. Se empleo el método de Lowry ^[104] para determinar el contenido de proteína en la suspensión de microsomas. Primero se hizo una dilución 1/10 (suspensión microsomas/buffer de fosfatos pH=7, 0.1 M) de la muestra. Posteriormente se preparó cada una de las siguientes soluciones: A) carbonato de sodio 0.1 % p/v en hidróxido de sodio 0.5 N; B) sulfato de cobre pentahidratado al 1 % p/v; C) tartrato de potasio 2 % p/v. Posteriormente, se preparó una mezcla que contenía 25 mL de la solución A, 0.75 mL de la solución B y 0.75 mL de la solución C. Los tubos conteniendo 10 μ L de la suspensión diluida de microsomas, se mezclaron con agua hasta 0.5 mL, se les adicionaron 0.5 mL de la mezcla preparada anteriormente y se dejaron reposar a temperatura ambiente por 15 min. Finalmente, se les adicionaron 1.5 mL del reactivo de folin (10% v/v) se mantuvieron a temperatura ambiente por 45 min y después se determinó la absorbancia a 540 nm. Para la curva estándar se utilizo albúmina de suero bovino.

5.1.5. DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL CITOCROMO P-450.

Una vez obtenidos los microsomas se determinó el contenido de citocromo P-450 a través del método de Omura y Sato ^[29]. Se diluyó 1 mL de la solución de microsomas en 9 mL de buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.4. Se adicionaron 90 μ g de ditionita de sodio para reducir el hierro del grupo hemo; se tomó una muestra de 3 mL la cual sirvió de testigo y el resto se burbujeo con monóxido de carbono de ultra alta pureza. Se realizó un barrido a la muestra desde 200 hasta 900 nm en un espectrofotómetro Cintra 5 UV-Visible para observar el pico característico en 450 nm. Para calcular la cantidad de citocromo P-450 en la muestra se empleo un coeficiente de extinción de 91 $\text{cm}^{-1} \text{mM}^{-1}$.

5.2. PURIFICACIÓN DE CYP2B4

Una vez obtenidos los microsomas se resuspendieron en buffer de fosfatos de potasio (0.1 M pH 7.25, 20% de glicerol, 0.6 % p/v de colato de sodio, 1 mM de EDTA y 1 mM de ditioneitol) hasta una concentración de 1.5 mg de proteína por mL. La suspensión fue agitada ligeramente durante 30 min y centrifugada a 77,000 g por 2 h. La purificación de CYP2B4 se realizó con base a lo reportado por Imai 1980^[101].

El sobrenadante se aplicó a una columna de w-aminooctil sefarosa (Figura 17); esta es una columna de interacción mixta, ya que tiene una parte hidrofóbica y una parte con carga (grupo amino). Para eluir la proteína de esta columna se usó Igepal CO-720 (detergente no polar).

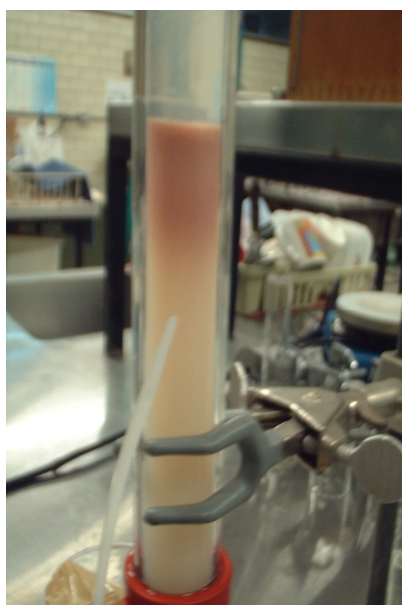


Figura 17. Columna de w-aminooctil sefarosa empleada durante la purificación de CYP2B4.

El eluyente de la columna de w-aminooctil sefarosa se introdujo a una columna de hidroxiapatita la cual es una columna de interacción electrostática. Para eluir la enzima se incremento el contenido de sales, para debilitar la interacción entre la enzima y la columna. Finalmente, el eluyente de la columna de hidroxiapatita se adsorbió sobre una columna de CM-sefadex, esta columna es de intercambio catiónico y al igual que en la columna de hidroxiapatita la elusión se condujo mediante un incremento en el contenido de sales. Esta última columna se empleo para eliminar el detergente (Igepal CO-720) de la muestra. Una vez obtenida la isoforma pura, se concentró en una celda de ultrafiltración y el CYP2B4 puro se almacenó a -80 °C para realizar posteriormente la electroforesis, la cual se corrió en geles de policrilamida (10%) por 100 min a 88V. Posteriormente los geles fueron fijados por 1 h en una solución de metanol: ácido acético: agua (50:10:40). Transcurrido este tiempo el gel se introdujo en una solución de azul de coomassie durante 1 h y finalmente se lavó con una solución desteñidora de metanol: ácido acético: agua (5:7:88) el gel en el que se corrió el marcador no se trato con azul de coomassie. La enzima purificada fue codificada para este trabajo como CYP2B4 pura y la enzima comercial como CYP2B4 sigma.

5.3. SÍNTESIS DEL MATERIAL MESOPOROSO DEL TIPO MCM-41

El material MCM-41 se obtuvo por síntesis hidrotérmica y a temperatura ambiente con diferentes relaciones Al/Si y Cu/Si. Para la síntesis hidrotérmica^[105,107] se emplearon 9 g de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTABr) como templete, el cual se mezcló con 43 mL de agua destilada en una autoclave con recipiente de teflón a 65 °C. Bajo agitación durante 30 min se adicionaron 4.5 g de ácido silícico y 1.2 g de hidróxido de sodio en seguida se cerro la autoclave y se aumento la temperatura hasta 95 °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo se adicionó el nitrato de aluminio (de acuerdo a la relación silicio/aluminio empleada) y se dejó nuevamente a 95 °C por 24 h. El material obtenido se lavó con agua desionizada y se calcinó a 650 °C por 24 h.

Para la síntesis a temperatura ambiente se emplearon 3.6 g de CTABr a los cuales se les adicionaron 75 mL de agua y 18 mL de hidróxido de amonio, gota a gota se adicionan 5.5 mL de tetraetilortosilicato (TEOS) y se deja agitar durante 48 h. Después se filtra y el filtrado se lava con agua destilada se deja secar y el polvo obtenido se calcina en las mismas condiciones que el material obtenido mediante síntesis hidrotérmica. Las relaciones Al/Si empleadas fueron de 0.01 (la única obtenida mediante síntesis hidrotérmica) 0.04, 0.08, 0.16 y 0.32 obtenidas a temperatura ambiente. Las relaciones Cu/Si obtenidas fueron las mismas que para Al/Si obtenidas a temperatura ambiente.

5.3.1 CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL MCM-41

El material sintetizado MCM-41 con aluminio y cobre se caracterizó por difracción de rayos-X, microscopía electrónica de transmisión (MET), análisis texturales. Mediante estos análisis, se determinó la estructura del material, el área específica, volumen y diámetro de poro.

5.3.1.1. DIFRACCIÓN DE RAYOS X. Los difractogramas de rayos-X de MCM-41 sintetizados con diferente relación Al/Si y Cu/Si fueron obtenidos en un difractómetro Siemens D5005 con un monocromador de grafito, en la región a bajo ángulo de 1.5° a 20° en una escala de 2 θ . La identificación de las fases se realizó mediante la comparación de los difractogramas obtenidos con el difractograma ya reportado como se observa en la Figura 10

5.3.1.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN. Mediante el uso de esta técnica se pudo corroborar el arreglo de los poros obteniéndose las micrografías para algunas de las MCM-41 sintetizadas.

5.3.1.3. PROPIEDADES TEXTURALES. Dichas propiedades se determinaron mediante un analizador de área superficial y porosimetría Micrometrics ASAP 2405 empleando como adsorbato N₂.

5.4. INMOVILIZACIÓN DE CYP2B4

La inmovilización se realizó por adsorción ^[71], empleando 0.9 mL de una solución 9 μ M de enzima (CYP2B4) y 50 mg de MCM-41, se emplearon las mismas cantidades con todas las muestras de material MCM-41 sintetizado. Se agitó el material en la solución de enzima a 4 °C por 2 h; una vez transcurrido este tiempo las muestras se centrifugaron a 5000 rpm a 4 °C por 20 min y al sobrenadante se le determinó la cantidad de proteínas.

El material precipitado se lavó con agua destilada y se centrifugó nuevamente a 5000 rpm a 4 °C por 20 min. Al sobrenadante obtenido en esta segunda centrifugación también se le determinó el contenido de proteína. El material se filtró y secó para ser empleado en la reacción, con el fin de determinar si la enzima que se fija al material tiene actividad catalítica.

5.5. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA UNIDA A MCM-41

La determinación de proteínas antes y después de la inmovilización se realizó empleando el método de BCA ^[108-109], debido a que la concentración de la solución de enzima es baja y este método es mucho más sensible que el de Lowry. El método de BCA permite determinar desde 0.2 hasta 50 μ g de proteína en 500 μ l. Para la curva estándar, se empleo albúmina de suero bovino. Los reactivos para el ensayo fueron adquiridos de la casa sigma.

5.6. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Para llevar a cabo la reacción con la enzima libre e inmovilizada se empleó como sustrato anilina en un intervalo de concentración de 0.2 a 6.4 mM , 1mM de NADPH, 1nmol de CYP450 puro, todo esto en un volumen final de 0.5 ml utilizando buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.4. En el caso de las reacciones en las que se empleó peróxido de hidrógeno (H₂O₂), la concentración fue de 2mM. La mezcla de reacción fue incubada a 37 °C por 30 min, se finalizó con la adición de 100 µL de ácido tricloroacético.

5.6.1. CUANTIFICACIÓN DE *p*-AMINOFENOL

Una vez concluida la reacción, las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm por 10 min. 0.5 ml del sobrenadante fueron colocados en tubos de ensayo para realizar la cuantificación de *p*-aminofenol. A la muestra se le adicionaron 0.25 ml de Na₂CO₃ (20 % p/p) y 0.75 ml de fenol (2 % p/p) posteriormente fue incubada a 37 °C por 30 min. El coeficiente de extinción molar del producto coloreado es de 10 mM⁻¹cm⁻¹ a 630 nm^[110-111].

5.7. DETECCIÓN DE LA TRANSFERENCIA DE ELECTRONES MEDIANTE RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA

Las mediciones EPR se llevaron a cabo empleando una frecuencia de 9.2 GHz (Banda X) con un espectrómetro de EPR Varian E-12 (Universidad de Alabama), el campo magnético fue medido con un gausometro Bruker EPR 0.035M y la frecuencia de microondas con un contador de frecuencia modelo HP-5245L. En este trabajo también se utilizó un espectrómetro JEOL JES-RES 3X (IPN México). En este equipo se realizaron además mediciones a temperatura variable las cuales fueron hechas empleando un dispositivo elaborado en la escuela superior

de física y matemáticas (ESFM-IPN). Los valores de g fueron calculados a partir de las mediciones del campo magnético con una resolución de ± 0.01 mT, empleando la frecuencia de microondas y utilizando DPPH como marcador.

Las muestra fue colocada en un tubo para EPR, a su vez el tubo con muestra fue colocada en un dewar con nitrógeno líquido y por último el dejar fue introducido en la cavidad resonante. Durante las mediciones se circuló alrededor de la cavidad nitrógeno gas para evitar la condensación de agua, lo cual impide las mediciones, debido a que ésta absorbe las frecuencias de microondas.

5.8. MODIFICACIÓN DEL GRUPO HEMO

Las modificaciones del grupo hemo se realizaron en las posiciones R2, R3 y R6, R7 correspondiente a los grupos propiónicos y vinílicos respectivamente (figura 18). Los grupos modificados se muestran en la tabla 2. Para evaluar su posible actividad se calcularon sus energías de orbitales frontera, las cuales nos permiten conocer la energía que predomina en el átomo de hierro del grupo hemo. Para dicha evaluación se utilizaron sustituyentes electroattractores y electrodonadores es decir, aquellos que disminuyan e incrementen la densidad electrónica en el átomo de hierro respectivamente. Cuando un sustituyente es un electroattractor se espera que la energía del orbital de menor energía desocupado (LUMO) sea mayor que la del orbital de mayor energía ocupado (HOMO) y con sustituyentes electrodonadores la energía de LUMO sea menor que la del HOMO en el átomo de hierro. Por lo tanto, al sustituir los grupos vinílicos y propiónicos en el grupo hemo se espera que la energía de LUMO sea mayor, lo cual indica que el átomo de hierro tiene menor densidad electrónica y por lo tanto se incrementa su potencial redox y por consiguiente la transferencia de electrones.

Tabla 2. Modificaciones en el grupo hemo.

Hemos	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
1	CH ₃	CHCH ₂	CH ₃	CHCH ₂	CH ₃	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	CH ₃
2	CH ₃	H	CH ₃	CHCH ₂	CH ₃	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	CH ₃
3	CH ₃	CHCH ₂	CH ₃	H	CH ₃	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	CH ₃
4	CH ₃	COCH ₃	CH ₃	COCH ₃	CH ₃	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	(CH ₂) ₂ CO ₂ H	CH ₃
5	CH ₃	CHCH ₂	CH ₃	CHCH ₂	CH ₃	<i>p</i> -nitrofenol	<i>p</i> -nitrofenol	CH ₃
5-Cys	CH ₃	CHCH ₂	CH ₃	CHCH ₂	CH ₃	<i>p</i> -nitrofenol	<i>p</i> -nitrofenol	CH ₃
6	CH ₃	CHCH ₂	CH ₃	CHCH ₂	CH ₃	<i>p</i> -aminofenol	<i>p</i> -aminofenol	CH ₃
6-Cys	CH ₃	CHCH ₂	CH ₃	CHCH ₂	CH ₃	<i>p</i> -aminofenol	<i>p</i> -aminofenol	CH ₃

Para realizar estos cálculos se optimizó la energía de los hemos empleando cálculos de la teoría de la función de densidad (DFT) usando un nivel de cálculo B3LYP/3-21G* y las energías HOMO-LUMO fueron obtenidas empleando un nivel de cálculo B3LYP/6-31G*. Todo esto empleando el programa Gaussian 98 facilitado por el IMP.

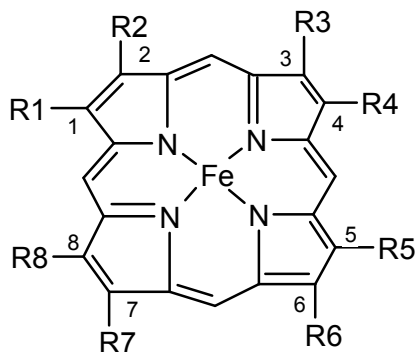


Figura 18. Estructura del grupo hemo con los grupos vinílicos (R2, R4) y los propiónicos (R6,R7) susceptibles de ser modificados.

6. RESULTADOS

6.1. OBTENCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CITOCROMO P-450

Se obtuvieron los microsomas a partir de conejos pretratados con fenobarbital. Los resultados obtenidos de la cuantificación de proteínas totales y CYP-450 muestran que si hubo inducción del CYP-450 al tratar los conejos con fenobarbital, tal y como ha sido reportado^[101] (tabla 3). El peso del hígado de los conejos tratados con fenobarbital incremento cerca del doble en comparación con el peso del hígado de los conejos que no fueron inducidos. Por lo tanto, al tener una mayor cantidad de CYP-450 nos permitirá obtener una mayor cantidad de CYP2B4 pura, ya que esta es la principal isoforma inducible de conejo con fenobarbital^[112].

Tabla 3. Contenido de proteínas totales y CYP450 en microsomas de hígado de conejos tratados con fenobarbital.

<i>Muestra</i>	<i>Proteínas totales (g)</i>	<i>Citocromo P-450 (nmoles)</i>	<i>Peso del hígado (g)</i>
Control	0.372 ± 0.31	708 ± 115	64 ± 3.5
Fenobarbital	0.914 ± 0.1	1277 ± 125	120 ± 1.52

6.2. PURIFICACIÓN DE CYP2B4

Una vez obtenido el contenido de CYP450 y el de proteínas totales en cada una de las muestras, éstas se solubilizaron hasta tener 1.5 mg/mL en buffer conteniendo 0.6% p/v de colato, 1 mM de dithiothreitol (DTT), 1 mM EDTA. Posteriormente la muestra solubilizada se pasó por las columnas descritas en

metodología y se obtuvo el CYP2B4 puro, el cual se observó mediante geles de policrilamida utilizando como referencia CYP2B4 puro de Sigma (figura 19a) carril **a**. En esta figura se observa que la enzima adquirida de sigma tiene más de una banda, lo cual indica la presencia de otras proteínas. En el carril **b** de este gel donde se corrió la enzima purificada en donde se observa que una de las bandas corresponde a una del carril **a**, por lo tanto esta podría corresponder a CYP2B4. Sin embargo, no es una sola banda. Por esta razón otro lote de microsomas fue purificado y la electroforesis se realizó nuevamente con diferentes cantidades de proteína (partiendo de una solución que contenía 198 ug/100 μ L). En cada pozo se depositaron 2.5, 5, 10 y 15 μ L (Figura 19b). Se empleó también un marcador de peso molecular. En dicho gel se observó una sola banda para todas las concentraciones de proteína empleada, encontrándose correlación entre la intensidad de la banda y el contenido de proteína. Esta banda corresponde a un peso molecular entre 85 000 y 38000 Da, lo cual indica que se trata de CYP2B4 la cual tiene un peso de 54 000 Da. Es importante mencionar que cuando la concentración de proteína se incrementó no se observó ninguna otra banda adicional, por consiguiente podemos concluir que la enzima se encuentra pura.

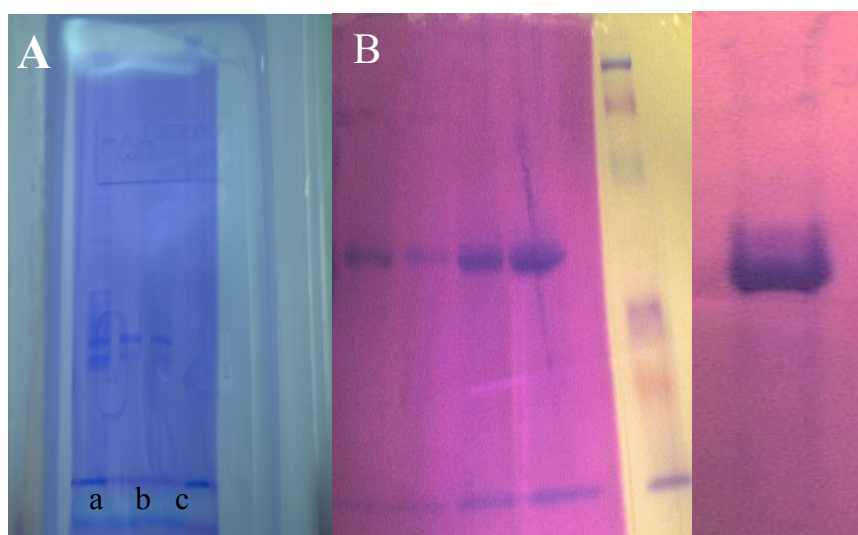


Figura 19. (A) Electroforesis en gel de policrilamida de a) CYP2B4 pura de Sigma, b y c) CYP2B4 purificada; (B) Electroforesis con diferentes cantidades de CYP2B4 y marcador de peso molecular.

6.3. SÍNTESIS DE MCM-41 IMPREGNADO CON ALUMINIO Y COBRE

La figura 20 muestra el patrón de difracción de rayos X (DRX) de MCM-41 con relación Al/Si = 0.04 (Al-MCM-41) el cual muestra un intenso pico de difracción (100) y dos picos bien definidos (110) (200), el material con relación Al/Si = 0.01 mostró un patrón de difracción semejante al igual que los materiales con relación Cu/Si=0.04 y 0.08 (Cu-MCM-41), lo cual indica que todos los materiales sintetizados tienen una estructura hexagonal ordenada.

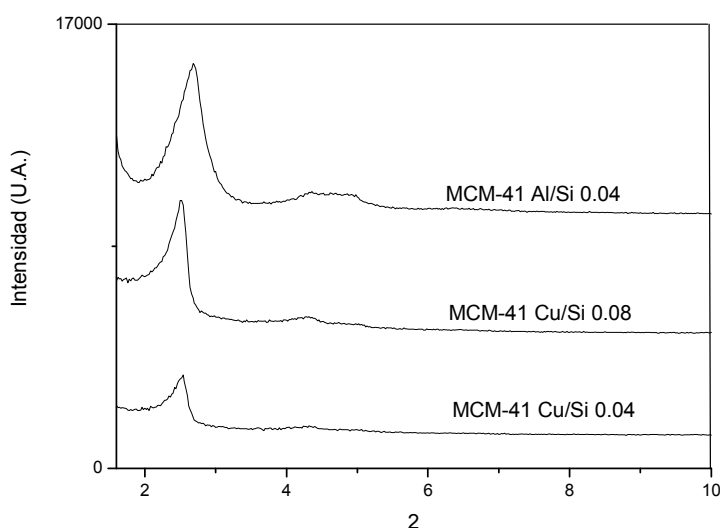


Figura 20. Patrón de difracción de rayos X (DRX) de MCM-41 impregnada con aluminio y cobre.

Las relaciones Cu/Si y Al/Si fueron determinadas por EDS dispersión de energía de rayos X en el MEB, para los materiales sintetizados a temperatura ambiente, los resultados se muestran en la Tabla 4. Como se puede observar en dicha tabla cuando las relaciones Al/Si y Cu/Si teóricas son bajas estas son muy semejantes a las experimentales, sin embargo, a medida que va incrementando la relación teórica, la relación experimental no se ve incrementada. Esto se debe a que la superficie del material se satura y ya no hay intercambio con el metal.

Tabla 4. Relaciones Al/Si y Cu/Si en MCM-41.

Relación teórica Cu/Si							
0.04		0.08		0.16		0.3	
<i>Elemento</i>	<i>Peso (%)</i>	<i>Elemento</i>	<i>Peso (%)</i>	<i>Elemento</i>	<i>peso (%)</i>	<i>Elemento</i>	<i>peso (%)</i>
O	51.16	O	50.05	O	46.32	O	44.24
Si	42.52	Si	44.94	Si	47.1	Si	46.93
Cu	3.31	Cu	5.01	Cu	6.58	Cu	8.83
Total	100	Total	100	Total	100	Total	100
Relación experimental Cu/Si							
0.07		0.11		0.14		0.19	

Relación teórica Al/Si							
0.04		0.08		0.16		0.3	
Elemento	<i>peso (%)</i>	Elemento	<i>peso (%)</i>	Elemento	<i>peso (%)</i>	Elemento	<i>Peso (%)</i>
O K	44.41	O K	47.43	O K	48.72	O K	44.4
AlK	2.39	AlK	2.21	AlK	5.67	AlK	8.02
SiK	53.2	SiK	50.36	SiK	45.61	SiK	47.58
Total	100	Total	100	Total	100	Total	100
Relación experimental Al/Si							
0.04		0.044		0.12		0.17	

De todas los materiales sintetizadas a temperatura ambiente e impregnados con el metal se eligieron las relaciones de Cu/Si y Al/Si de 0.04 para inmovilizar la enzima y estudiar la transferencia de electrones, debido a que la concentración del metal no se incremento en el material a pesar de que esta fue incrementada

en la solución, además estudios semejantes han empleado esta relación para el estudio de transferencia de electrones con carotenoides.

Para el material obtenido mediante síntesis hidrotérmica se eligió la relación Al/Si = 0.01 con base en estudios anteriores^[8]. Por lo tanto durante el trabajo los materiales se designaron como Al-MCM-41a y Cu-MCM-41a para los materiales que fueron sintetizados a temperatura ambiente y con relación Al/Si y Cu/Si = 0.04 respectivamente. Al-MCM-41h para el material obtenido mediante síntesis hidrotérmica con relación Al/Si = 0.01

Mediante análisis de texturas se obtuvo el área específica así como el diámetro y volumen de poro de Al-MCM-41h y de Cu-MCM-41a datos confinados en la tabla 5.

Tabla 5. Características texturales de Al-MCM-41h y Cu-MCM-41a .

	<i>Cu/Si = 0.04</i>	<i>Al/Si = 0.01</i>
Área específica (m ² /g)	511.63	1056.72
Diámetro de poro (Å)	34.45	51.6
Volumen de poro (cm ³ /g)	0.4407	1.47

Como puede observarse en la tabla 5, Al-MCM-41h tiene mayor área específica, diámetro y volumen de poro que Cu-MCM-41a. Esto es debido a que durante la síntesis hidrotérmica el aluminio es intercambiado por átomos de silicio; sin embargo, cuando el metal es añadido al material después de que este fue sintetizado como es el caso del método de impregnación, el metal queda en la superficie reduciendo el diámetro y volumen de poro y por consiguiente área específica. Aunque resulta obvio el interés de tener materiales para inmovilización de enzimas con mayor diámetro y volumen de poro puede ser también interesante tener materiales cuya superficie sea modificada de tal forma que la enzima pueda interaccionar con ésta, quedando la enzima en la superficie, lo cual representaría

algunas ventajas como puede ser una mayor interacción de la enzima con su sustrato.

6.4. INMOVILIZACIÓN DE CYP2B4 EN MCM-41 MODIFICADO CON COBRE Y ALUMINIO

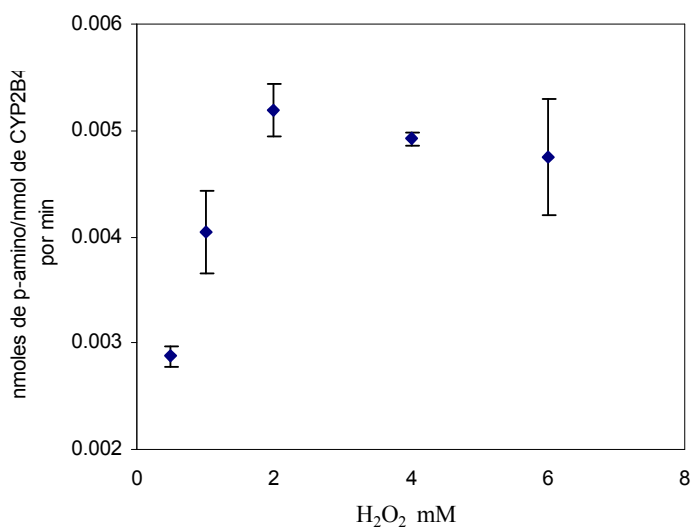
La cantidad de CYP2B4 inmovilizada fue del 95%, determinada por el método de BCA. Esto se debe a que el área específica de Al-MCM-41h es grande así como su diámetro y volumen de poro, lo cual permite que suficiente cantidad de CYP2B4 sea inmovilizada. En Cu-MCM-41a la cantidad de enzima inmovilizada fue semejante a la inmovilizada en Al-MCM-41h a pesar de que este material tiene menor área, diámetro y volumen de poro. Esto se debe a que la enzima tiene regiones con diámetro de 31 Å por lo cual podría penetrar en el poro o bien la enzima puede interactuar con la superficie del material^[8].

El contenido de proteína en el sobrenadante después de que CYP2B4 inmovilizada en Al-MCM-41h y Cu-MCM-41a fue agitada durante 30 min en buffer, muestra que la unión entre la enzima y ambos materiales es estable, ya que solo un 7% de proteína fue encontrada en dicho sobrenadante.

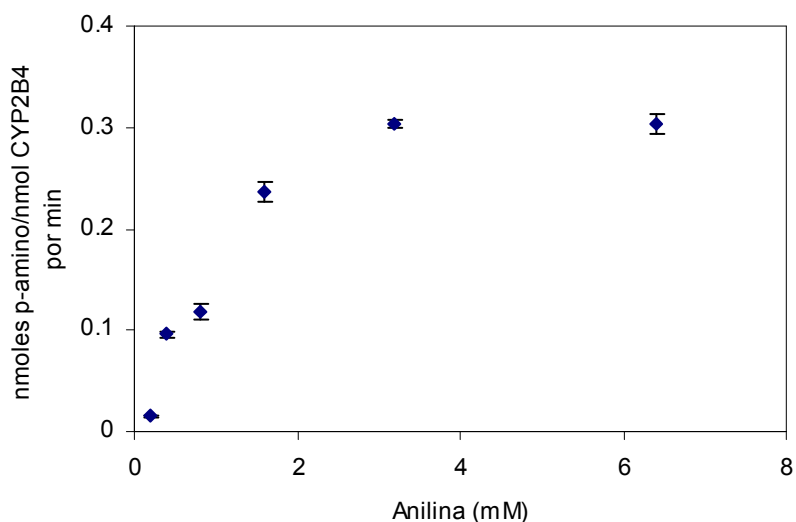
6.5. ACTIVIDAD CATALÍTICA DE CYP2B4 INMOVILIZADA EN MCM-41 MODIFICADA CON COBRE Y ALUMINIO

La actividad catalítica de CYP2B4 pura y CYP2B4 purificada sin inmovilizar, se determinó utilizando como oxidante peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a diferentes concentraciones. Como se muestra en la gráfica 1, la actividad de CYP2B4 sigma fue mayor con una concentración de 2 mM de H₂O₂, sin embargo, se puede observar que la actividad catalítica de la enzima utilizando 4 y 6 mM no es diferente, por esta razón y con base en experimentos ya reportados ^[113] se decidió emplear una concentración de H₂O₂ de 2mM. Esta concentración de H₂O₂

fue la que se empleo para realizar la cinética con el sustrato (anilina) del cual se emplearon concentraciones de 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 y 6.4 mM. La actividad catalítica de CYP2B4 sigma sin inmovilizar y empleando las concentraciones mencionadas de sustrato se muestra en la gráfica 2. Cabe mencionar que la actividad de CYP2B4 pura fue mayor empleando las mismas concentraciones de sustrato, como se observa en la grafica 3.

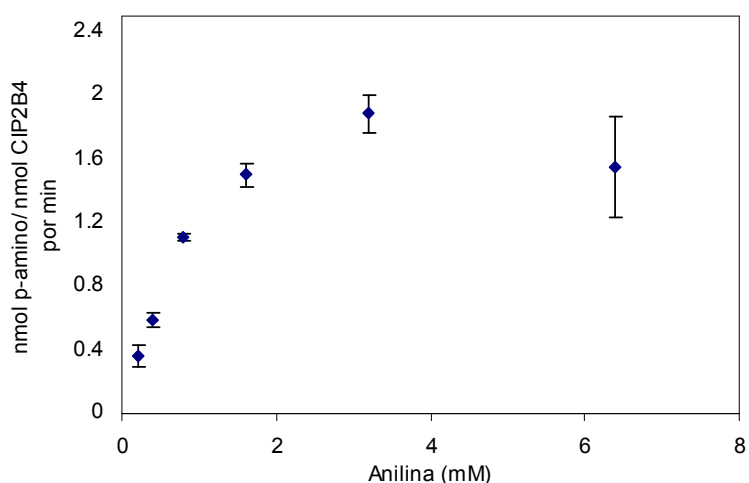


Gráfica 1. Actividad catalítica de CYP2B4 sigma a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno y anilina (5mM).



Gráfica 2. Actividad catalítica de CYP2B4 sigma (1nmol) a diferentes concentraciones de anilina.

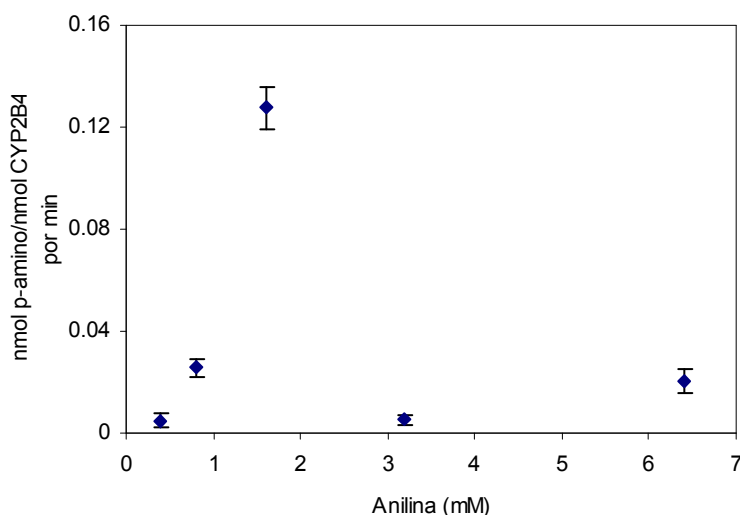
Posteriormente se determinó la actividad catalítica de CYP2B4 sigma inmovilizada en Al-MCM-41h, Al-MCM-41a y Cu-MCM-41a. CYP2B4 sigma inmovilizada en Al-MCM-41a y Cu-MCM-41a no tuvo actividad catalítica contrario a cuando fue inmovilizada en Al-MCM-41h. Como puede observarse en la grafica 4, la cinética para la enzima inmovilizada en Al-MCM-41h con relación de 0.01 no es semejante a la de la enzima libre; esto puede deberse a que la inmovilización en el material es muy heterogénea. Por esta razón, la actividad de la enzima inmovilizada fue comparada con la de la enzima libre solo a una concentración de sustrato y ésta fue aquella que esta por arriba del valor de Km para la enzima libre (1.6 mM).



Gráfica 3. Actividad catalítica de CYP2B4 purificada (1 nmol) con diferentes concentraciones de anilina.

La actividad de CYP2B4 sigma sin inmovilizar con una concentración de anilina 1.6 mM fué de 0.23 ± 0.009 nmoles de *p*-aminofenol/nmol de enzima por min y para CYP2B4 inmovilizada en Al-MCM-41h fue de 0.12 ± 0.008 nmol de *p*-aminofenol/nmol de enzima por min, lo que indica que el CYP2B4 inmovilizado mantiene cerca de la mitad de su actividad catalítica. Los mismos experimentos fueron realizados inmovilizando mayor cantidad de CYP2B4 en el material, con la finalidad de incrementar la conversión de anilina. Sin embargo, la actividad no se

incrementó sino por contrario se vio disminuida. Esto puede deberse a la formación de agregados de enzima en la superficie del material o a la formación de monocapas y por consiguiente poca difusión del sustrato a la enzima.



Gráfica 4. Actividad catalítica de CYP2B4 inmovilizada en Al-MCM-41h (1.5 nmol de enzima y diferentes concentraciones de anilina de 0.2 a 6.4 mM).

El CYP2B4 purificado tuvo el mismo comportamiento que el CYP2B4 sigma, es decir solo tuvo actividad catalítica inmovilizada en Al-MCM-41h. La actividad del CYP2B4 purificada inmovilizada en este material fue de 0.12 ± 0.007 nmol de *p*-aminofenol/nmol de enzima por min, muy semejante a la obtenida con CYP2B4 sigma inmovilizada. Sin embargo, comparada con el CYP2B4 purificada sin inmovilizar esta mantuvo solo una décima parte ya que la actividad de la enzima pura fue de 1.5 ± 0.07 nmol de *p*-aminofenol/nmol de enzima por min, lo cual podría indicar que se requiere mayor cantidad de aluminio en MCM-41 ya que no es suficiente cuando la actividad de la enzima es mayor.

El hecho de que CYP2B4 sigma y CYP2B4 purificada tengan actividad solo en el material Al-MCM-41h y no en Al-MCM-41a y Cu-MCM-41a a los cuales se les impregnó el metal, puede ser debido a la interacción entre el CYP2B4 y el metal en la superficie del material lo cual impide que el metal participe durante el

proceso catalítico. Por lo tanto, es importante que para la catálisis el metal no se una a la enzima para que este pueda participar en la transferencia de electrones como sucede durante la reducción del Cu^{+2} a Cu^{+} en reacciones con carotenoides^[9].

6.6. TRANSFERENCIA DE ELECTRONES DE CYP2B4 INMOVILIZADA EN MCM-41 MODIFICADA CON COBRE Y ALUMINIO

Con el objetivo de explorar si existe transferencia de electrones entre Al-MCM-41h y CYP2B4 durante la transformación de anilina a *p*-aminofenol se hicieron estudios de resonancia paramagnética electrónica (EPR). Primero se caracterizó CYP2B4, encontrando un espectro rómbico con valores de $g = 2.4205, 2.2442$ y 1.9165 el cual se muestra en la figura 21 y es característico de hierro en bajo espín para CYP2B4^[114].

La figura 22 muestra el espectro EPR de NADPH, a diferencia de Al-MCM-41h y anilina, éste fue el único componente de la reacción que mostró señal, la cual es un singulete, característico de un radical libre con valor $g = 2.0180$. El ancho de la señal $\Gamma 0.86$ mT es debido a la interacción hiperfina no resuelta, que se origina posiblemente por la interacción entre los electrones del anillo de isolliazida de las moléculas de NADPH.

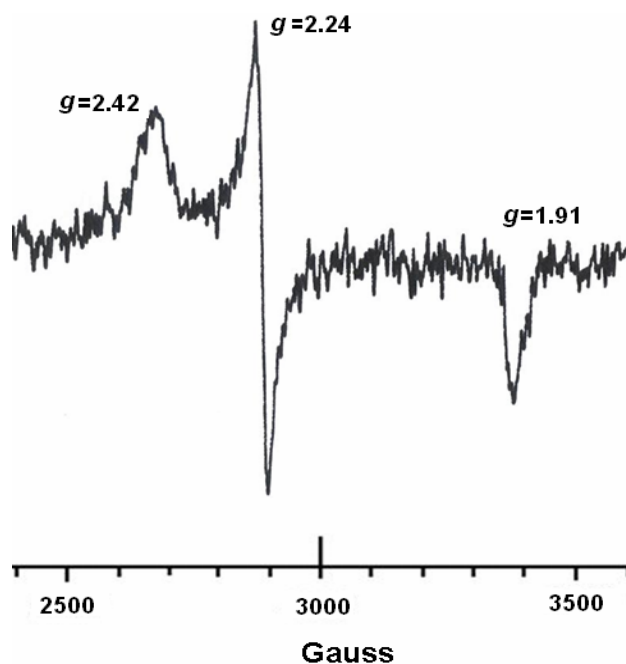


Figura 21. Espectro EPR de CYP2B4 (120 μ M) con valores de $g_x=2.4205$, $g_y=2.2442$, $g_z=1.9165$ característicos del átomo de hierro en bajo espín ($s = \frac{1}{2}$): el espectro fué obtenido a 77 K, frecuencia de microondas, 8.8582 GHz; potencia de microondas, 25 mW; frecuencia, 100 kHz; ganancia 2×1000 .

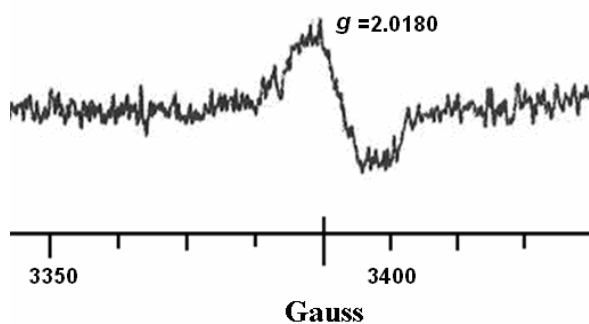


Figura 22. Espectro EPR de NADPH el cual muestra un singlete característico de un radical libre con un valor de $g=2.01$; el espectro fué obtenido a 77 K, frecuencia de microondas, 9.400 GHz; potencia de microondas, 1 mW; frecuencia, 100 kHz; ganancia 6.3×100 .

6.6.1. TRANSFERENCIA DE ELECTRONES DE CYP2B4 INMOVILIZADA EN MCM-41 MODIFICADA CON ALUMINIO

Cuando los experimentos EPR se hicieron con CYP2B4 inmovilizada en Al-MCM-41h, se observó en el espectro EPR una señal con valor de $g = 2.2442$, esta señal se debe a el rasgo principal del espectro EPR de CYP2B4; sin embargo debido a que la concentración de CYP2B4 es baja, los otros dos rasgos del espectro rómbico con valor de $g = 2.4205$ y 1.9165 no aparecen (Figura 23a). En este espectro podemos observar otra señal con $g = 1.98$, la cual es asignada a defectos puntuales en la estructura del material, dichos defectos son producidos por esfuerzo mecánico. Cabe mencionar que la señal con $g = 1.98$ ha sido identificada cuando Al-MCM-41 es irradiada (figura 24), por lo tanto Al-MCM-41h fue irradiada por 2 min con una lámpara tungsteno a 200 W y se obtuvo una señal con valor de g semejante debida a la formación de centros V (defectos puntuales), la señal con $g = 2.25$ en el mismo espectro, fue asignada a CYP2B4. Debido a que la enzima posee algunas regiones con un diámetro mayor que el diámetro del poro del material. Se pueden producir defectos en el material, sin embargo éstos no fueron observados mediante DRX ya que el patrón de DRX es el mismo antes y después del proceso de inmovilización ^[8].

Cuando a la misma muestra se le adicionó anilina (20 mM), en el espectro EPR aparece la señal correspondiente a CYP2B4 con valor de $g = 2.2442$, sin embargo, es importante mencionar que como se muestra en la figura 23b, la intensidad de esta señal se incrementa 1.5 veces. Esto se debe a que la anilina es un sustrato tipo II y causa un aumento en el contenido de hierro en bajo espín ^[115]. Por lo tanto, podemos observar que la anilina causa el mismo efecto en el hierro del grupo hemo a pesar de que CYP2B4 esta inmovilizada sobre Al-MCM-41h.

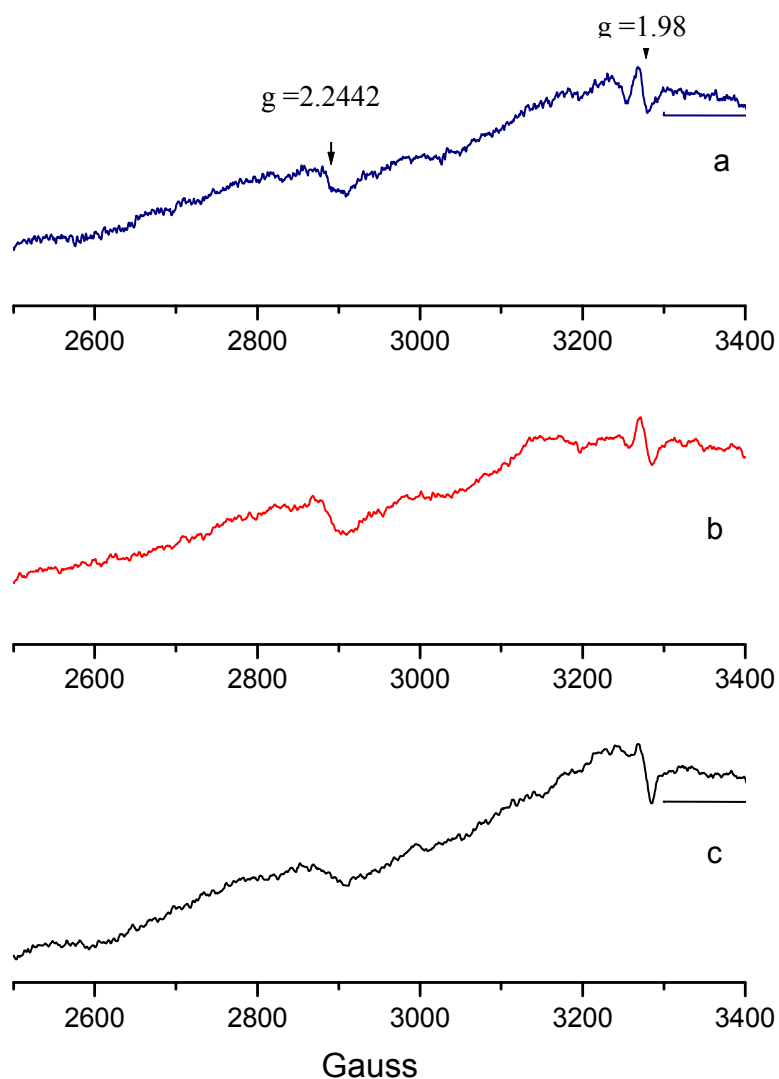


Figura 23. Espectros EPR de CYP2B4 a) CYP2B4 inmovilizada en Al-MCM-41h, b) CYP2B4 inmovilizada en Al-MCM-41h más anilina (20mM), c) CYP2B4 inmovilizada en Al-MCM-41h más anilina y NADPH. El espectro fue obtenido a 77 K, Frecuencia de microondas, 9.096 GHz; potencia de microondas, 20 mW; frecuencia, 100 kHz; ganancia 4×10^4 .

Finalmente, al añadir el NADPH a la misma muestra, se observó un incremento en la señal con valor de $g=1.98$, esto es debido a la transferencia de electrones en la reacción, ya que en la misma reacción fue posible observar disminución en la señal con $g = 2.2442$ correspondiente al hierro de CYP2B4 lo que corrobora que el Fe^{+3} se reduce a Fe^{+2} debido a la transferencia de electrones (figura 23c). En el

espectro de la figura 23c en $g=1.98$, es posible observar otra señal sobrepuesta, la cual es debida a NADPH remanente.

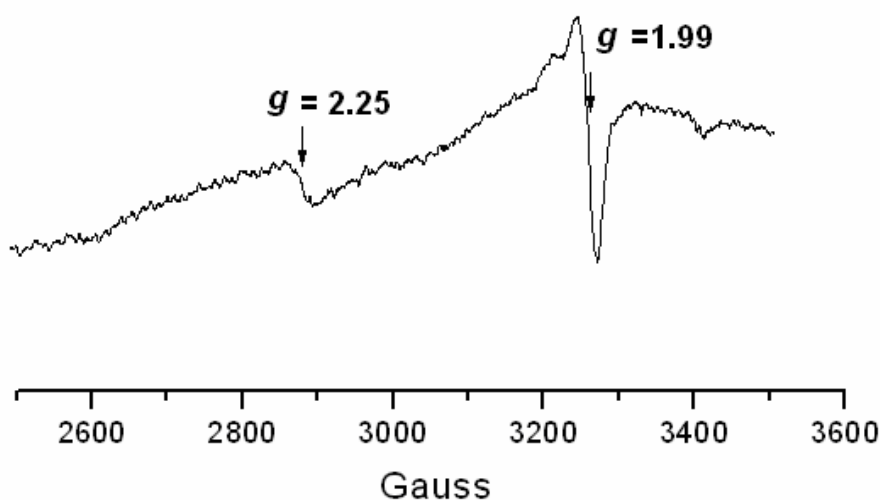


Figura 24. Al-MCM-41h irradiada por 2 min a 200 W con una lámpara tungsteno.

Utilizando temperatura variable durante los experimentos EPR y analizando la reacción después de 15 minutos de iniciada, fue posible observar a 120 K tres señales bien resueltas (figura 25). La primera, una señal con $g= 4.3$ que es característica de hierro con espín de $5/2$, esto se debe a que durante el ciclo catalítico de CYP2B4 el hierro del grupo hemo puede estar cambiando de bajo a alto espín ^[32-34].

En $g= 2.24$, se observó un conjunto de señales las cuales son asignadas a cambios en el ambiente químico de la porfirina durante la reacción. Por ultimo la tercer señal en este espectro, aparece en $g=2.03$, ésta fué asignada a hierro no hemo, ya que durante la inmovilización y la reacción parte del hierro del grupo hemo podría desprenderse de la porfirina debido a la tensión mecánica ^[111].

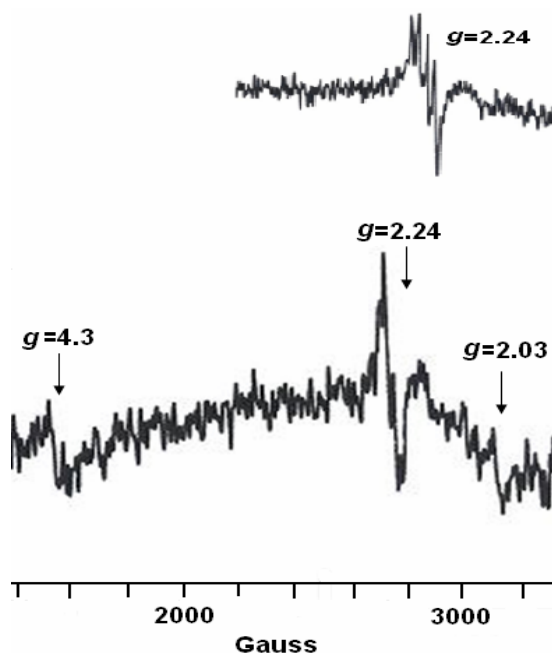


Figura 25. Espectro EPR de la reacción de CYP2B4 inmovilizada en Al-MCM-41h (3 nmol); NADPH y anilina. El espectro fue recorrido a 120 K, frecuencia de microondas, 8.8616 GHz; potencia de microondas, 25 mW; frecuencia, 100 kHz; ganancia 2 x 1000.

6.6.2. TRANSFERENCIA DE ELECTRONES DE CYP2B4 INMOVILIZADA EN MCM-41 MODIFICADA CON COBRE

Para estudiar la transferencia de electrones entre CYP2B4 y Cu-MCM-41a, se obtuvo el espectro EPR de Cu-MCM-41a el cual es mostrado en la figura 26a. Este espectro muestra una señal con valores de $g_{xx}= 2.07$, $g_{yy}=2.13$ y $g_{zz}=2.49$ las cuales son semejantes a los reportados para Cu (II) ortorómbico ^[116]. Posteriormente, se obtuvo el espectro para CYP2B4 inmovilizada en Cu-MCM-41a (figura 27a). En este espectro aparece una señal con valor de $g=1.99$ nuevamente. Esta señal indica la interacción entre cobre y NH_3 a partir de aminoácidos como lisina y arginina, los cuales se encuentran en la superficie de la enzima. Este tipo de interacción ha sido observada cuando el amoníaco es adsorbido sobre Cu-MCM-41 formando complejos tipo $[Cu(NH_3)]^{2+}$.

Esto indica que la unión entre Cu-MCM-41a y CYP2B4 se lleva a cabo mediante los residuos amino de las cadenas laterales de CYP2B4 al igual que sucede durante el reconocimiento entre CPR y CYP2B4. Esto puede ser importante para la transferencia de electrones ya que Tamburi ^[117] y Nadler ^[118] han reportado que la unión entre CPR y CYP-450 es a través de interacciones electrostáticas, entre los grupos carboxilos provenientes de ácido glutámico y aspártico de CPR, los cuales se unen a nitrógenos protonados como los de lisina y arginina que se encuentran en la superficie de CYP-450 y sirven para unir y orientar las dos proteínas, mientras que las interacciones hidrofóbicas entre los aminoácidos no polares, (leucina, triptofano, valina etc) sirven para mantener las dos proteínas lo suficientemente cerca para la transferencia de electrones.

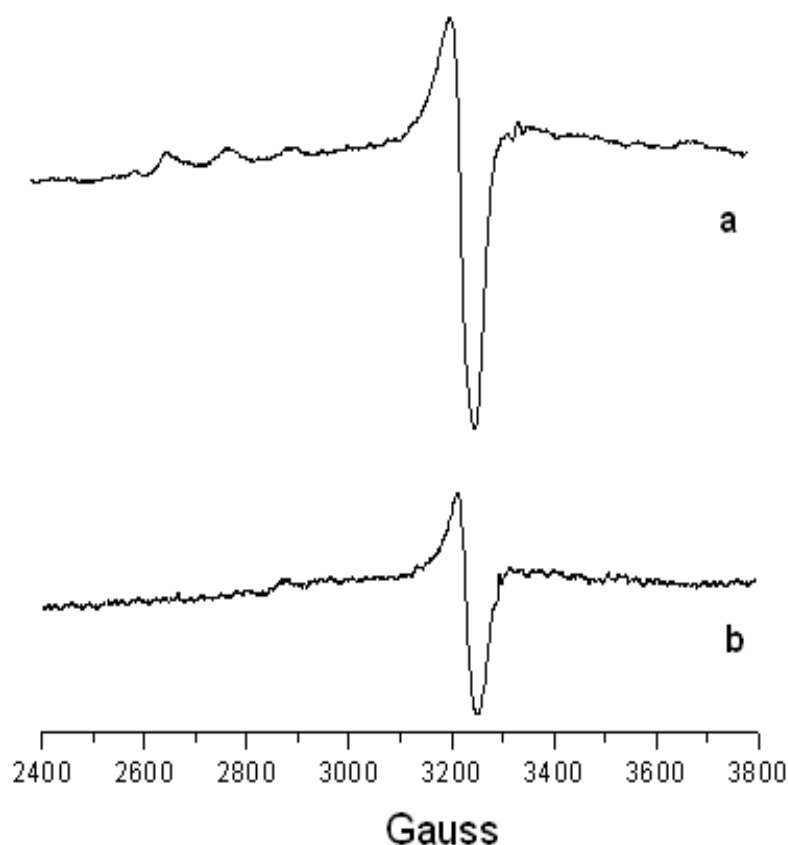


Figura 26. Espectro EPR de a) Cu-MCM-41a y b) Cu MCM-41a más NADPH.

Cuando a CYP2B4 inmovilizada en Cu-MCM-41a se le adiciono anilina (figura 27b), se mantuvo la misma señal. Cuando NADPH fue adicionado a la misma muestra (figura 27c) la señal disminuyo, lo cual indica que Cu^{+2} coordinado con grupos amino se redujo a Cu^{+} . La figura 26b muestra la reducción del cobre por NADPH. Durante estos experimentos no fue posible observar la señal correspondiente a CYP2B4, debido a que se encuentran a igual campo que la señal de cobre y esta última es muy intensa en comparación con la señal de CYP2B4.

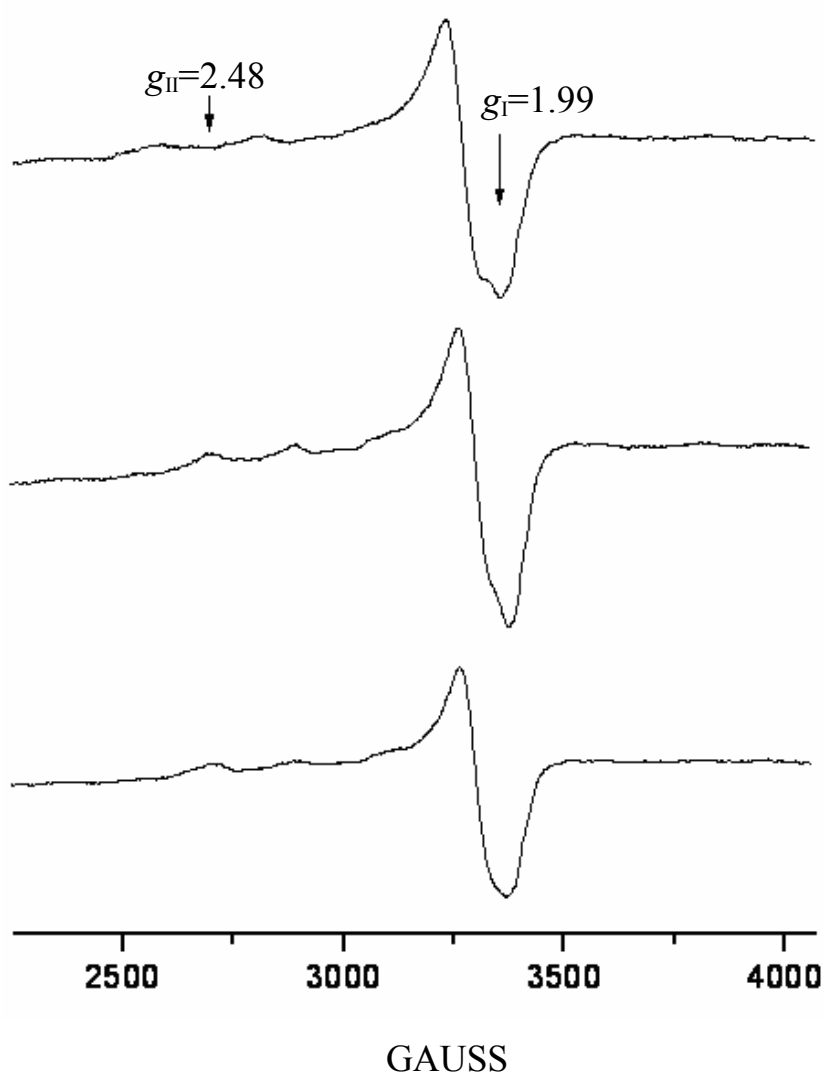


Figura 27. Espectro EPR de a) CYP2B4 inmovilizada en Cu-MCM-41a, b) CYP2B4 inmovilizada en Cu-MCM-41a más anilina, c) CYP2B4 inmovilizada en Cu-MCM-41a más anilina y NADPH.

Dado que no se observó actividad catalítica con CYP2B4 sigma y CYP2B4 purificada inmovilizadas en Cu-MCM-41a, es posible que no exista transferencia de electrones entre el material, el metal y CYP2B4. Esto es debido a que la interacción entre los grupos amino de CYP2B4 y el Cu^{+2} son más fuertes que la interacción entre el cobre y los grupos silanol (O-Si) del material, ya que ha sido reportado que el enlace entre el Cu^{+2} a MCM-41 es débil y que la adsorción de moléculas polares como los grupos amino rompen los cuatro sitios de coordinación entre el cobre y el material originando la coordinación sólo entre el cobre y la molécula adsorbida ^[116]. Por lo tanto, pueden existir interacciones entre la enzima y el material e interacciones entre el cobre y los grupos amino.

Para elucidar si la señal con valor de $g=1.99$ originada cuando CYP2B4 es inmovilizada en Cu-MCM-41a se debe a la interacción entre Cu y los residuos amino de los aminoácidos como arginina, lisina etc, se realizaron experimentos empleando 1,8 diaminooctano, el cual tiene en ambos extremos 2 grupos amino. Los espectros obtenidos muestran la misma señal que aquellos obtenidos cuando la enzima es inmovilizada en el material con cobre sugiriendo que la interacción es a través de los grupos amino (figura 28).

Dado que en el espectro se observan dos señales se realizaron experimentos con saturación de potencia para corroborar si son dos señales diferentes o solo una. Además, se realizaron experimentos utilizando ácido succínico el cual tiene 2 grupos carboxilo en sus extremos para descartar que la señal encontrada en el espectro EPR de la enzima inmovilizada en Cu-MCM-41a sea debida a interacciones entre el cobre y grupos carboxílicos de aminoácidos como aspártico y glutámico. Con estos experimentos no se observó ninguna señal (figura 29), lo cual confirma que la señal encontrada en el espectro EPR con 1,8 diaminooctano en Cu-MCM-41a se debe a interacciones entre el cobre y grupos amino y no a interacciones entre el cobre y grupos carboxilo.

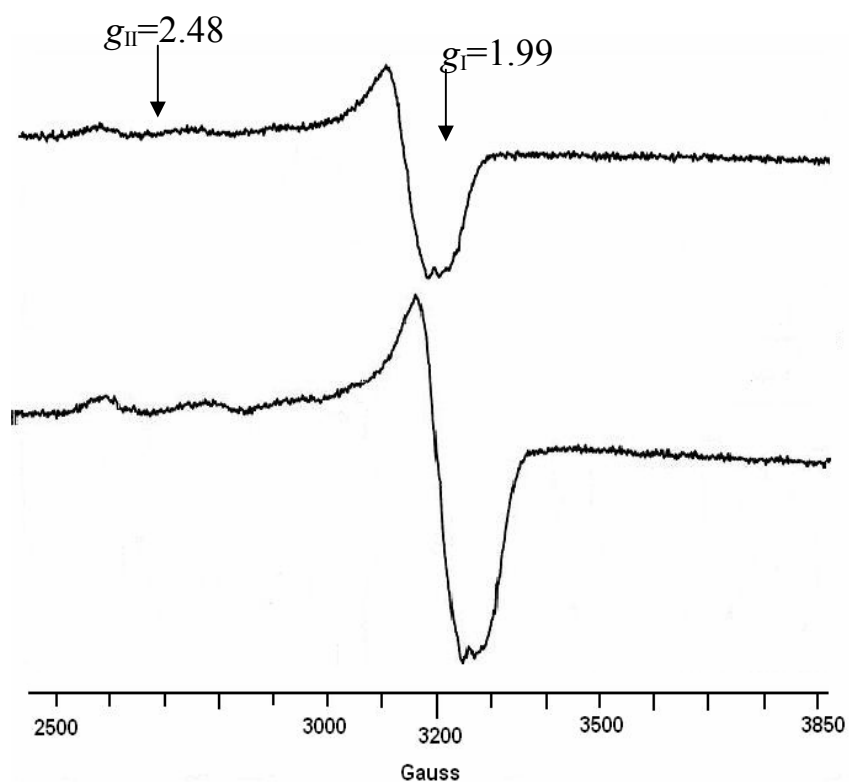


Figura 28. Espectro EPR de 1,8, diaminooctano inmovilizado en Cu-MCM-41a.

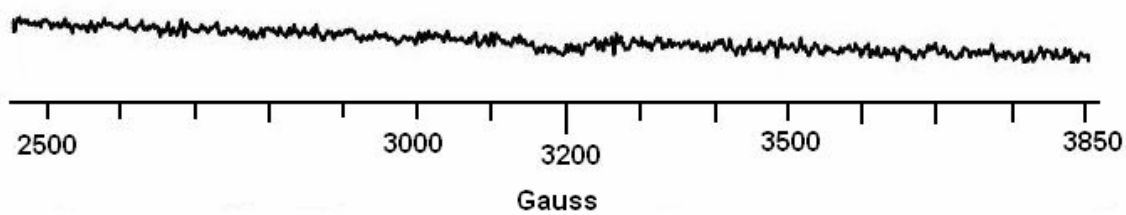


Figura 29. Espectro EPR del ácido succínico inmovilizado en Cu-MCM-41a.

6.7. ENERGIAS HOMO-LUMO DE HEMOS MODIFICADOS

Debido a que es importante estudiar tanto la geometría como las propiedades electrónicas de los grupos hemo, los cuales juegan un papel importante durante la catálisis de muchas hemoproteínas; en este trabajo se pretendía sintetizar dos derivados de hemos uno con electroattractores en los vinílicos y otro en los propiónicos, una vez sintetizados estos serían intercambiados en CYP2B4 por su grupo hemo. Sin embargo esto no nos fue posible debido a que la enzima dejó de ser comercializada un año y medio después de haberse iniciado este trabajo, y su purificación requirió de mucho tiempo, obteniéndose cantidades muy pequeñas (150 nmol) de enzima. Sin embargo, con la información recopilada y analizada, se desarrolló un trabajo teórico del cual los resultados obtenidos se describen a continuación.

Tomando en cuenta la importancia de las propiedades electrónicas de los grupos hemo, para este trabajo se decidió calcular la energía del orbital molecular ocupado de mayor energía (HOMO) y la energía del orbital molecular desocupado de menor energía (LUMO), de los derivados enlistados en la tabla 2. Los principales cambios consistieron en modificaciones en los grupos vinílicos originando los hemos **2,3,4** y propiónicos obteniéndose **5, 5-cis, 6, 6-cis** a partir de **1**. Primero se calculó la energía de HOMO-LUMO para **1**. Como puede observarse en la figura 30 (izquierda) el orbital HOMO es localizado principalmente en C-7 y C-4, como resultado de su efecto electroattractor sobre el átomo de hierro, lo cual a su vez causa un incremento en la energía LUMO en el átomo de hierro (Figura 30; derecha). Por lo tanto, este resultado puede explicar porqué el grupo hemo **1** puede llevar a cabo reacciones de oxido-reducción mediante un reconocimiento LUMO del átomo de hierro del grupo hemo, el cual es deficiente en electrones, con el HOMO del sustrato. Además, cuando la energía LUMO en el átomo de hierro es alta, su potencial redox se puede incrementar.

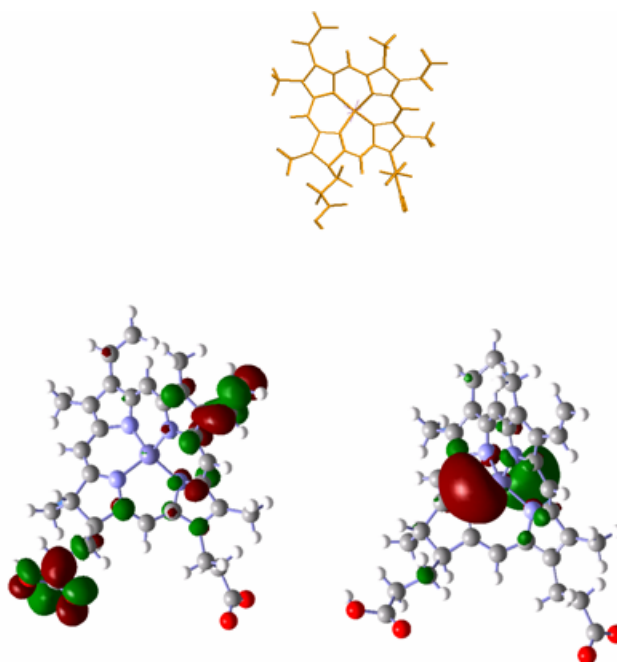


Figura 30. Estructuras en tercera dimensión de las energías HOMO (izquierda) y LUMO (derecha) de **1**.

Lee *et al.* ^[119] encontró que al modificar los grupos funcionales de **1** originándose **2** y **3** los potenciales redox cambiaban, concluyendo que el grupo vinilo de la posición 4 tiene una influencia electroattractora sobre la estructura de la porfirina, mientras que el mismo grupo en la posición 2 tiene un menor efecto juzgado, por sus potenciales de reducción, los cuales fueron de -38 ± 1.7 mV; -7.6 ± 2.7 mV y -1.9 ± 1.6 mV para **3**, **2** y **1** respectivamente. Como puede observarse en la figura 31, el derivado **3** tiene mayor energía HOMO en el átomo de hierro que **1** y **2**. En esta figura podemos observar que **2** tiene mayor densidad HOMO en la posición 4, lo cual es debido al efecto electroattractor del grupo vinilo un efecto que no fue observado para el mismo grupo en la posición 2 de **3** a pesar de que el grupo vinilo, en la posición 4 fue eliminado. Por lo tanto este resultado confirma que el vinilo localizado en la posición 4 juega un papel importante como un grupo electroattractor. Lo anterior nos permite concluir que el grupo vinilo localizado en la posición 2 tiene efectos electrónicos sobre la estructura de la porfirina, mientras que el grupo en la posición 4 tiene efectos electrónicos sobre el átomo de hierro a través de un fenómeno de resonancia.

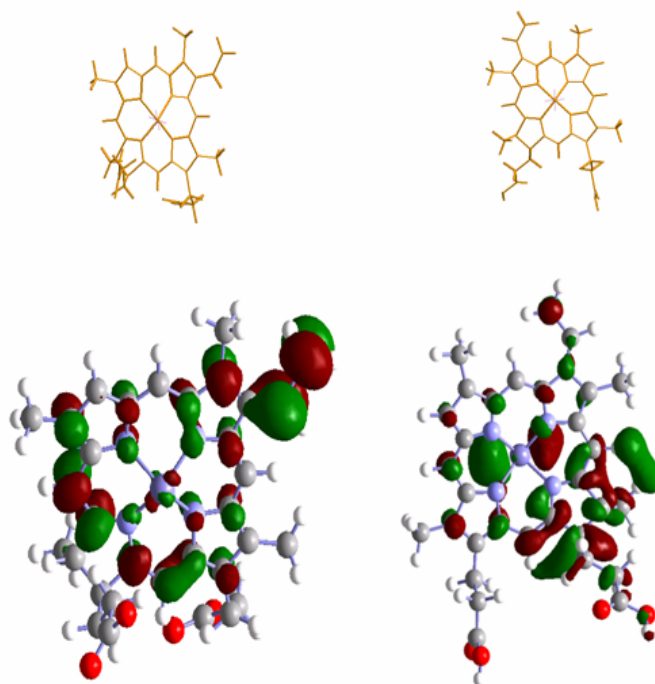


Figura 31. Estructuras en tercera dimensión de las energías HOMO de **2** (izquierda) y **3** (derecha).

Se realizaron modificaciones en los grupo propiónicos con base en lo reportado por Torres *et. al.* [100], quien modificó los grupos propiónicos de la hemoglobina mediante esterificaciones con *p*-aminofenol (electrodonador) y *p*-nitrofenol (electroatractor), los cuales fueron empleados en este trabajo obteniéndose los derivados **5** y **6**. Al realizar los cálculos con estos hemos modificados, la región que tiene el anillo de *p*-nitrofenol interacciona con el grupo vinílico localizado en la posición 2, por lo tanto a éstos derivados se les adicionó el residuo de cisteína (Cis) como quinto ligante para evitar la interacción. Como se muestra en la figura 32, una vez que el residuo de cisteína, se adiciono el grupo propionico esterificado ya no se plego sobre el grupo vinilo. Contrario a lo esperado, la sustitución con *p*-nitrofenol incremento la densidad LUMO sobre los enlaces sp^3 localizados en los grupos propiónicos en lugar de incrementarla en el átomo de hierro.

Otro hemo explorado fue **6** el derivado que tiene una esterificación con *p*-aminofenol. Con esta sustitución se observa un incremento en la densidad HOMO en las posiciones 2 y 6, con lo cual se evita que estas interactúen. Además esto permite que la mayor densidad esté alejada del átomo de hierro y por lo tanto su densidad LUMO sea mayor favoreciendo así la actividad catalítica al incrementar su potencial de reducción.

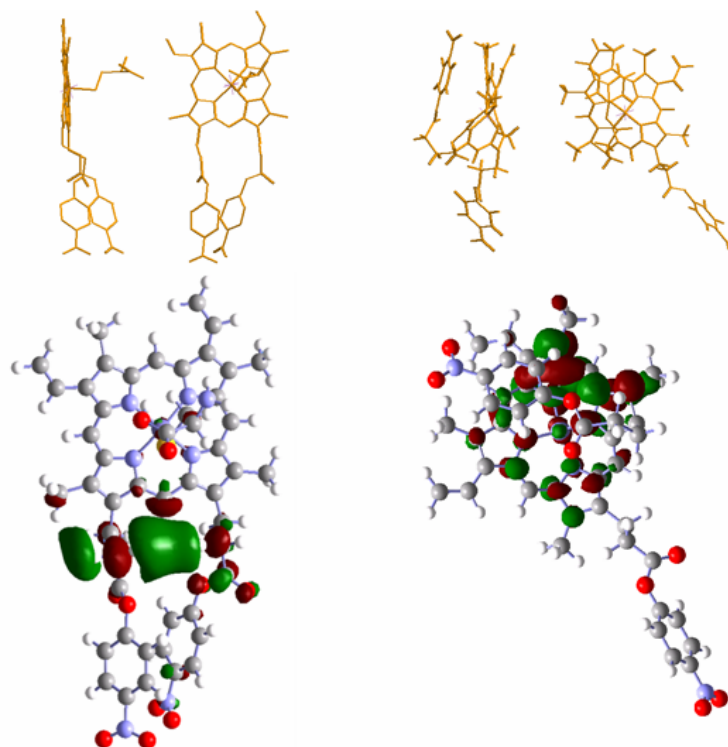


Figura 32. Energías de LUMO de **5** (derecha) y de **5-Cis** (izquierda)

Por lo tanto, los derivados los cuales han sido reportados que incrementan la actividad catalítica de algunas hemoproteínas, mostraron una mayor densidad LUMO en el átomo de hierro o en los carbonos sp^3 debido a que estos poseen grupos electroattractores. La modificación del grupo hemo con un grupo electrodonador o la sustitución de un grupo vinilo de la posición 4 por un H incrementan la densidad HOMO en el átomo de hierro, dando a estos derivados menor potencial de reducción y por lo tanto disminuyendo la actividad catalítica^[120].

Dado que existe correlación entre los cálculos teóricos obtenidos y la actividad reportada para algunas hemoproteínas con estos hemos modificados; los hemos con mayor densidad LUMO podrían dar una mayor actividad a las enzimas del CYP450, además otros sustituyentes podrían ser evaluados con el objetivo de incrementar la densidad LUMO.

7.- DISCUSIÓN

CYP2B4 una isoforma del complejo multienzimático citocromo P-450 fue inmovilizada en MCM-41, el cual ha tenido una gran aplicación para la inmovilización de enzimas. Primeramente MCM-41 fue modificado con aluminio (Al-MCM-41) y con cobre (Cu-MCM-41) obteniéndose un material con suficiente área específica (500-1000 m² /g) y diámetro de poro aceptable (34-51 Å) para la inmovilización de enzimas^[71-73] datos mostrados en la tabla 5. Por lo tanto, Al-MCM-41 y Cu-MCM-41 resultaron ser unos buenos materiales para la inmovilización de CYP2B4, como lo ha sido para la inmovilización de papaína, tripsina, citocromo c entre otras, ya que el 95% de CYP2B4 contenido en la solución inicial (9 µM) fue inmovilizado.

Dos rutas de síntesis para la obtención de MCM-41 fueron empleadas; la primera, mediante síntesis hidrotérmica se obtuvo Al-MCM-41h, en donde el metal se incorporó en la estructura del material. La segunda síntesis fue llevada a temperatura ambiente en donde el metal se une a la superficie del material una vez que éste ha sido sintetizado obteniéndose Al-MCM-41a y Cu-MCM-41a. La ruta de síntesis fue de gran importancia ya que tanto CYP2B4 sigma como CYP2B4 purificada sólo mostraron actividad catalítica cuando fueron inmovilizadas en el material obtenido mediante síntesis hidrotérmica y no cuando fueron inmovilizadas en los materiales obtenidos a temperatura ambiente. El hecho de que CYP2B4 sigma y CYP2B4 purificada tuvieran actividad catalítica sólo en el material obtenido por síntesis hidrotérmica se debe a que en el material obtenido a temperatura ambiente el metal queda en la superficie e interacciona con la enzima que va a ser inmovilizada y por lo tanto la enzima impide que el metal quede libre para participar durante el proceso catalítico. Para Cu-MCM-41a y Al-MCM-41a con el metal en la superficie ha sido reportada su participación en

procesos catalíticos con carotenoides, en donde el metal se encuentra en la superficie y entra en contacto con la molécula de carotenoide. Sin embargo no sucede lo mismo con el material de aluminio obtenido mediante síntesis hidrotérmica en donde el metal se encuentra incorporado en su estructura y no en la superficie. Por lo tanto, al igual que ha sido reportado para otros materiales la ruta de síntesis les confiere propiedades diferentes^[99].

Mediante los análisis de EPR se obtuvo el espectro que corresponde a CYP2B4 (Fig 21) en el cual se observó una señal rómbica con valores de $g = 2.4205$, 2.2442 y 1.9165 característica de hierro (+3) en bajo espín esta señal ha sido reportada también para otras isoformas del citocromo P-450 que tienen hierro (+3) en bajo espín como CYP3A4, la cual es una de las principales isoformas en el metabolismo de fármacos.

Cuando CYP2B4 fue inmovilizada en Al-MCM-41h en el espectro EPR se observaron 2 señales (Fig. 23a); la primera con un valor de $g = 2.2442$, la cual fue asignada a la señal principal de CYP2B4, las otras señales que conforman la señal rómbica no fueron observadas debido a que la cantidad de CYP2B4 inmovilizada es baja y por consiguiente la cantidad de hierro, sin embargo, esta señal mostró que la enzima se encuentra inmovilizada en el material ya que con el material sólo no fue observada. La segunda señal de este espectro tuvo una $g = 1.98$ como un singulete, esta señal fue asignada a cambios en la coordinación del hierro ya que ha sido reportada cuando el hierro pierde la molécula de agua que posee como sexto ligante y se une al sustrato^[114]. Además, una señal con valor de g semejante a sido asignada a centros V originados en el material cuando es irradiado, esta señal es generada ya que el átomo de oxígeno tiene un electrón libre^[121], por lo tanto, es posible también que centros de este tipo sean generados por esfuerzos mecánicos, lo cual nos indica que la interacción entre CYP2B4 y Al-MCM-41h produce cambios tanto en la enzima como en el material y que estos

cambios pueden contribuir a la catálisis durante la transformación de anilina a *p*-aminofenol.

Al adicionar anilina a la reacción con CYP2B4 inmovilizada la señal principal de CYP2B4 ($g=2.2442$) se incrementó indicando su unión al grupo hemo de CYP2B4 ya que ha sido reportado que cuando se adiciona anilina se incrementa el contenido de hierro en bajo espín y eso hace que la señal se incremente; por lo tanto anilina interacciona con el grupo hemo de CYP2B4 inmovilizada en Al-MCM-41h. (Fig. 23b) Al adicionar NADPH a la reacción se observó un incremento en la señal con $g= 1.98$, esto es debido a la transferencia de electrones durante la reacción, además la señal principal de CYP2B4 proveniente del hierro en bajo espín con $g= 2.2442$ disminuyó, indicando que el Fe^{+3} fue reducido a Fe^{+2} ya que el hierro en este último estado de oxidación no es una especie paramagnética y por lo tanto no origina una señal EPR. Aunque con estos experimentos fue posible determinar que existe transferencia de electrones entre CYP2B4, Al-MCM-41h y NADPH, no fue posible determinar si algún aminoácido participa en dicha transferencia.

Experimentos de EPR a temperatura variable también permitieron identificar cambios durante la reacción (Fig. 25), ya que en un espectro obtenido a 120 K se observó un cambio en el espín del átomo de hierro de CYP2B4 de bajo a alto espín, esto es importante ya que ha sido reportado que durante el ciclo catalítico de citocromo P450 se originan cambios en el estado del espín de hierro ^[34], además a esta temperatura (120K) se lograron observar cambios en la estructura de la porfirina ya que la señal con $g=2.2442$ se convirtió en un grupo de señales las cuales son debidas a cambios en el ambiente cristalino de la porfirina.

Los estudios de EPR empleando Cu-MCM-41a demostraron que parte del cobre que es impregnado en el material puede interactuar con grupos amino o guanidino de los residuos de aminoácidos como lisina, arginina etc, ya que se

observa una señal con $g=1.99$, la cual ha sido encontrada cuando amoníaco es adsorbido sobre Cu-MCM-41a^[116], esta interacción es muy importante ya que son los grupos amino de la superficie de CYP2B4 los que interaccionan con la superficie de CPR y por lo tanto se podría obtener una interacción semejante, sin embargo CYP2B4 inmovilizada sobre Cu-MCM-41a no tuvo actividad catalítica esto es debido a que el enlace entre el cobre y el material es debilitado debido a la interacción entre el cobre y los grupos amino de CYP2B4. Por lo tanto la señal obtenida mediante EPR y los datos de actividad, sugieren que el cobre se encuentra unido a los grupos amino de la enzima y no a la superficie del material evitando que se lleve a cabo la transferencia de electrones entre el material y la enzima, tal y como ha sido reportado para Cu-MCM-41a y carotenoides^[122].

Estos resultados muestran que Al-MCM-41h resultó ser el mejor material para inmovilizar CYP2B4 manteniendo su actividad catalítica en ausencia de CPR debido a que el material participa en la transferencia de electrones corroborado mediante estudios de EPR. CYP2B4 inmovilizada tendría aplicación en estudios de biotransformación de fármacos o de nuevos compuestos con actividad biológica ya que sería posible llevar a cabo estas reacciones a un menor costo.

Además este trabajo muestra que la actividad de CYP2B4 puede ser mejorada, mediante modificaciones en los grupos propiónicos y vinílicos del grupo hemo evaluado mediante estudios teóricos de orbitales frontera. Los resultados muestran que al sustituir el grupo vinílico de la posición 4 por un H, la densidad electrónica en el átomo de hierro se incrementa y esto ocasiona que su potencial redox disminuya. (Fig. 30) Esto no fue observado al sustituir el grupo vinílico de la posición 2 con el mismo grupo lo cual confirma que el grupo de la posición 4 ejerce un efecto electroattractor.

Modificaciones en los grupos propiónicos con moléculas electroattractoras y electrodonadoras muestran que la densidad LUMO en el átomo de hierro y en los carbonos sp^3 de los grupos propiónicos se incrementa con electroattractores (Fig. 32), esto significa que al modificar el grupo hemo con moléculas electroattractoras el potencial redox del hierro se incrementa y puede originar que la actividad catalítica mejore, al igual que ha sido reportado para otras hemoproteínas como la hemoglobina.

8. CONCLUSIONES

CYP2B4 puede ser inmovilizada sobre Al-MCM-41h y Cu-MCM-41a ya que el área específica de estos materiales es grande y logran inmovilizar cerca del 95% de la enzima contenida en la solución inicial (9 μ M).

CYP2B4 inmovilizada en Al-MCM-41h tuvo actividad catalítica contrario a lo observado con Al-MCM-41a y Cu-MCM-41a lo cual sugiere que la ruta de síntesis de los materiales es de gran importancia ya que el material en el cual la enzima tuvo actividad catalítica fue el que se obtuvo mediante síntesis hidrotérmica, en donde el metal es incorporado en la estructura del material, contrario a los materiales obtenidos a temperatura ambiente en donde el metal se encuentra en la superficie. Lo cual indica que en Al-MCM-41h la enzima entra en contacto con los defectos puntuales producidos, mientras que en los materiales Al-MCM-41a y Cu-MCM-41a la enzima interacciona con el metal en la superficie.

Existe transferencia de electrones entre CYP2B4, Al-MCM-41h y NADPH corroborado mediante estudios de EPR en donde fue posible observar el incremento en la señal a $g=1.99$ debido a la transferencia de electrones y la disminución de la señal $g=2.2442$ debido a la reducción del Fe^{+3} a Fe^{+2} , confirmando la participación del material en dicha transferencia.

A pesar de que existe entre CYP2B4 y el material con cobre una interacción semejante a la de CYP2B4 con CPR, CYP2B4 inmovilizada en Cu-MCM-41a no tuvo actividad catalítica, debido al rompimiento de enlaces entre el cobre y el material.

Las modificación del grupo hemo con sustituyentes electroattractores permite incrementar la densidad LUMO en el átomo de hierro, es decir, disminuir su densidad electrónica, incrementando así su potencial de reducción y por consiguiente su actividad catalítica.

9. PROPUESTAS

Sintetizar materiales con cobre incorporado en la estructura del material e inmovilizar y evaluar la actividad catalítica de CYP2B4.

Identificar nuevamente la señal entre la enzima y el material con cobre para estudiarla mediante técnicas de resonancia doble de electrón y núcleo (Electrón Nuclear Double Resonance: ENDOR)

Modificar los residuos de aminoácidos lisina, arginina, histidina de la superficie de CYP2B4 e inmovilizarla en Cu-MCM-41 para observar que sucede con la señal obtenida en EPR.

Modificar in vitro el grupo hemo de CYP2B4 purificada con el propósito de incrementar su actividad catalítica y correlacionar estos resultados con los estudios teóricos realizados en esta tesis.

10. REFERENCIAS

1. Guengerich FP. Cytochrome P-450 oxidations in the generation of reactive electrophiles: epoxidation and related reactions. *Arch. Biochem. Biophys.* 409 (2003) 59.
2. Devlin TM. *Textbook of biochemistry with clinical correlations*, Willey-Liss, (1997) 982
3. Nelson DR., Kamataki T, Waxman DJ., Guengerich FP., Estabrook RW., Feyereisen R., Gonzalez FJ., Coon MJ., Gunsales IC, Gotoh O., Okuda K., Nebert DW. The P-450 superfamily: update on new sequences, gene mapping accession numbers, early trivial names of enzymes and nomenclature DNA. *DNA Cell. Biol.* 12 (1993) 1
4. Scott EE., He YA., Wester MR., White MA., Chin CC., Halpert JR., Johnson EF., Stout CD., An open conformation of mammalian cytochrome P450 2B4 at 1.6-Å resolution. *PNAS.* 100 (2003) 13196
5. Guengerich FP. Cytochrome P-450 enzymes. *American Scientist.* 81 (1993) 440
6. Hlavica P., Schulze J., Lewis DFV., Functional interaction of cytochrome P450 with its redox partners: a critical assessment and update of the topology of predicted contact regions. *Journal of Inorganic Biochemistry* 96 (2003) 279
7. Guengerich FP., Common and Uncommon Cytochrome P450 Reactions Related to Metabolism and Chemical Toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* 14 (2001) 611
8. Rosales Hernández, MC., Mendieta Wejebe, JE., Vazquez Alcantara, JI., Miranda Ruvalcaba, R., Garcia Serrano, LA., Trujillo Ferrara, J., Immobilization of cytochrome P-450 on MCM-41 with different silicon/aluminum ratios. *Microporous and Mesoporous Materials* 80 (2005) 25

9. Gao Y., Konovalova TA., Xu T., Kispert LD., Electron transfer of carotenoids imbedded in MCM-41 and Ti-MCM-41: EPR, ENDOR, and UV-Vis studies. *J. Phys. Chem. B* 106 (2002) 10808.
10. Stucky GD., Monnier A., Schuth F., Hou Q., Margolese D., Kumar D., Kridhnamurty M., Petroff P., Firouzi A., Janicke M., Chmelka BF. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 240 (1994) 187.
11. Puppl A., Newhouse M., Kevan L. Electron Spin Resonance and Electron Spin Echo Modulation Studies of Cupric Ion Ion-Exchanged into Siliceous MCM-41. *J. Phys. Chem.* 99 (1995) 10019.
12. Sung-Suh HM., Luan Z., Kevan L., Photoionization of Porphyrins in Mesoporous Siliceous MCM-41, AlMCM-41, and TiMCM-41 Molecular Sieves. *J. Phys. Chem. B* 101 (1997) 10455.
13. Luan Z., Xu J., He H., Klinowski J., Kevan L., Synthesis and Spectroscopic Characterization of Vanadosilicate Mesoporous MCM-41 Molecular Sieves. *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 19595.
14. Konovalova TA., Gao Y., Schad R., Kispert LD., Saylor CA., Brunel LC., Photooxidation of Carotenoids in Mesoporous MCM-41, Ni-MCM-41 and Al-MCM-41 Molecular Sieves. *Phys. Chem. B.* 105 (2001) 7459.
15. Konovalova TA., Kispert LD., EPR and ENDOR studies of carotenoid-solid Lewis acid interactions. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 94 (1998) 1465.
16. Jeevarajan AS., Kispert LD., Sady LP. An ENDOR study of carotenoid cation radicals on silica-alumina solid supports. *Chem. Phys. Lett.* 209 (1993) 269.
17. Abragam A., *The principles of nuclear magnetism.* Oxford England, Clarendon Press (1961).
18. Bott, WA., Redox Properties of electron transfer metalloproteins, *Current Separations* 18 (1999) 47
19. Orton JW., *Electron paramagnetic resonance; An introduction to transition groups ions in crystals,* London Iliffe books (1968)

20. Hashimoto YC., Imai Y., Sato R. Multiple Forms of Cytochrome P-450 Purified from Liver Microsomes of Phenobarbital- and 3-Methylcholanthrene-Pretreated Rabbits II. Spectral Properties. *J. Biochem.* 88 (1980) 505
21. Singh UP., Obayashi E., Takahashi S., Iizuka T., Shoun H., Shiro Y., The effects of heme modification on reactivity, ligand binding properties and iron-coordination structures of cytochrome P450nor. *Biochim. Biophys. Acta* 1384 (1998) 103.
22. Chen Z., Ost TWB., JP. Schelvis. M. Phe393 mutants of cytochrome P450 BM3 with modified heme redox potentials have altered heme vinyl and propionate conformations. *Biochemistry* 43 (2004) 1798.
23. Modi S., Primrose WV., Lian LY., Roberts GCK. Effect of replacement of ferriprotoporphyrin IX in the haem domain of cytochrome P-450 BM-3 on substrate binding and catalytic activity. *Biochem. J.* 310 (1995) 939.
24. Reid L., Lim AR., Mauk AG. Role of heme vinyl groups in cytochrome b5 electron transfer. *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 8197.
25. Mie Y., Sonoda K., Neya S., Funasaki N., Taniguchi I. Electrochemistry of myoglobins reconstituted with azahemes and mesohemes. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 46 (1998)175.
26. Axelrod J. The enzymatic demethylation of ephedrine. *J. Pharma.* 114, (1955) 430
27. Brodie B., Axelrod J., Copper JR., Gaudette L. Detoxycation of drugs and other foreign compounds by liver microsomes. *Science* 21 (1955) 603
28. Klingenberg M., Pigments of rat liver microsomes, *Arch. Biochem. Biophys.* 75 (1958) 376
29. Omura T., Sato R. The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* 239 (1964) 2370

30. Omura T., Sato R. The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes II. Solubilization, purification and properties. *J. Biol. Chem.* 239 (1964) 2379
31. Bayer E., Hill HAO., Roder A., Williams RJP. The interaction between heme- iron and thiols. *Chem. Comm.* 109 (1969).
32. Poulos TL., Finzel BC., Howard AJ. Crystal structure of substrate free pseudomonas putida cytochrome. *Biochemistry* 25 (1986) 5314
33. McMurry TJ., Groves JT., Montellano O. Cytochrome P-450. 217 (1986)1
34. Groves JT., Watanabe Y. Reactive iron porphyrin derivatives related the catalytic cycles of cytochrome P-450 and peroxidase studies of oxygen activation. *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 8433
35. White RE., Coon MJ., Oxigen Activation by cytochrome P-450. *Annu. Rev. Biochem.* 49 (1980) 315
36. Lilienblum W., Platt KL., Schirmer G., Oesch F., Bock KW. Regioselectivity of rat liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities toward phenols of benzo(a)pyrene and dibenz(a) anthracene. *Mol. Pharmacol.* 32 (1987) 173
37. Guengerich FP., Enzymatic oxidations of xenobiotic chemicals. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 25 (1990) 97
38. Egawa T., Ogura T., Makino R., Kitagawa T. Observation of O-O stretching raman band for cytochrome P-450 cam under catalytic conditions. *J. Biol. Chem.* 266 (1991)10246
39. Hintz MJ., Peterson JA. The kinetics of reduction of cytochrome P-450cam by reduced putidaredoxin. *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 6721
40. Bernhard R., Makower A., Janig GR. & Ruckpaul K. Selective chemical modification of a functionally linked lysine in cytochrome P-450 LM2. *Biochim. Biophys Acta* 785 (1984)186
41. Nadler SG., Strobel HW. Role of electrostatic interactions in the reaction of NADPH cytochrome P-450 reductase with cytochromes P-450. *Arch. Biochem. Biophys.* 261 (1988) 418

42. Stayton PS., Fisher MT., Sligar SG. Determination of cytochrome b5 association reactions. Characterization of metmyoglobin and cytochrome P-450cam binding to genetically engineered cytochrome b5. *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 13544
43. Voznesensky AI., Schenkman JB. The cytochrome P450 2B4-NADPH cytochrome P450 reductase electron transfer complex is not formed by charge-pairing. *J. Biol. Chem.* 267 (1992)14669
44. Shen S., Strobel HW. Role of lysine and arginine residues of cytochrome P450 in the interaction between cytochrome P4502B1 and NADPH-cytochrome P450 reductase. *Arch. Biochem. Biophys.* 304 (1993) 257
45. Tamburini PP., and Gibson GG. Thermodynamic studies of the protein-protein interactions between cytochrome P-450 and cytochrome b5. Evidence for a central role of the cytochrome P-450 spin state in the coupling of substrate and cytochrome b5 binding to the terminal hemoprotein. *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 13444
46. Honkakoski P., Linnala-Kankkunen A., Usanov S.A., Lang M.A. Highly homologous cytochromes P-450 and b5: a model to study protein-protein interactions in a reconstituted monooxygenase system. *Biochim. Biophys. Acta.* 1122 (1992) 6
47. Mayuzumi H., Sambongi C., Hiroya K., Shimizu T., Tateishi T., Hatano M. Effect of mutations of ionic amino acids of cytochrome P450 1A2 on catalytic activities toward 7-Ethoxycoumarin and methanol. *Biochemistry* 32 (1993) 5622
48. Tamburini PP., White RE., Schenkman, JB. Chemical characterization of protein-protein interactions between cytochrome P-450 and cytochrome b5. *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 4007
49. Nisimoto Y., and Otsuka–Murakami H. Cytochrome b5, cytochrome c, and cytochrome P-450 interactions with NADPH-cytochrome P-450 reductase in phospholipid vesicles. *Biochemistry* 27 (1988) 5869

50. Tamburini PP., and Schenkman JB. Purification to Homogeneity and Enzymological Characterization of a Functional Covalent Complex Composed of Cytochromes P-450 Isozyme 2 and b₅ from Rabbit Liver. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84 (1987) 11
51. Omata Y., Sakamoto H., Robinson R.C. Pincus M. R., and Friedman F. K., Interaction between cytochrome P450 2B1 and cytochrome bs: inhibition by synthetic peptides indicates a role for P450 residues Lys-122 and Arg-125. Biochem. Biophys. Res. Commun. 201 (1994) 1090
52. Wang M., Roberts DL., Paschke R., Shea TM., Masters BS., Kim JJP. Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: Prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94 (1997) 8411
53. Sevriouka IF., Li HY., Zhang H., Peterson JA., Poulos TL. Structure of a cytochrome P450-redox partner electron-transfer complex (cytochrome P450 reductase, flavodoxin / protein-protein interaction). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (1999) 1863
54. Davydov DR., Kariankin AA., Petushkova NA., Peterson JA. Association of Cytochromes P450 with Their Reductases: Opposite Sign of the Electrostatic Interactions in P450BM-3 As Compared with the Microsomal 2B4 System. Biochemistry 39 (2000) 6489
55. Estabrook RW., Werringloer J. Microsomes and Drug Oxidations, V. Ullrich, a. Hildebrandt, R.W. Estabrook, A.H. Conney, Pergamon Press, Oxford (1977).
56. Goepfert AR., Scheerens H., Vermeulen NPE. Oxygen and xenobiotics reductase activities of cytochrome P-450. *Int. Rev. Toxicol.* 25 (1995) 25
57. Sundberg M., Hagbjork AL. On the significance of cytochrome P-450 dependent hydroxyl radical mediated oxygenation mechanism. *Xenobiotica* 12 (1982)
58. Lefaux R. Practical Toxicology of Plastics, 1st ed. London: Liffé Books Ltd, 1968: 105-6

59. Priority Substances Lists Assessment report – aniline. In: Canadian Environmental Protection Act. Ottawa: Environmental Health Centre, 1994
60. Occupational Health Guidelines for chemical Hazards. National Institute For Occupational Safety and Health (NIOSH) and Occupational Safety and Health Administration (OSHA) 1982
61. Lauwerys RR, Hoet P. Industrial Chemical Exposure. Guidelines for biological monitoring, 2nd ed. Boca Raton , FL: Lewis Publishers, 1993:201
62. Garrod J, Manson D. The metabolism of aromatic amines, *Xenobiotica* 16 (1986) 933
63. Brega A., Prandini P., Amaglio C., Pafumi E. Determination of phenol, m-, o- and p-cresol, p-aminophenol and p-nitrophenol in urine by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* 535 (1990) 311
64. Biological exposure indices. In: Threshold limit values for chemical substances in the world environment. Cincinnati, OH American Conference of Governmental Industria Hygienits, 1986 – 1987: 51
65. Diseases caused by toxic nitro and amino derivates of benzene and its homologes. In: Early detection of occupational diseases Geneva : World Health Organization, 1986: 134
66. Yan AX., Li XW., Ye YH. Recent progress on immobilization of enzymes on molecular sieves for reactions in organic solvents. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 101 (2002)113
67. Kim J., Grate JW., Wang P., Nanostructures for enzyme stabilization, *Chemical Engineering Science.* 61 (2006) 1017
68. Arroyo M., Immobilized enzymes: theory methods of study and applications, *Ars. Pharma.* 39 (1998) 23
69. Izquierdo Barba I., Ruiz González L., Doadrio J.C., González- Calbet J.M., Vallet-Regí M., Tissue regeneration: A new property of mesoporous materials. *Solid State Sciences* 7 (2005) 983

70. Beck J.S., Vartuli J.C., Roth W.J., Leonowicz M.E., Kresge C.T. Schmitt K.D., Chu C.T.W., Olson D.H., Sheppard E.W., Mccullen S.B., Higgins J.B., Schlenker J.L. A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid-crystal templates. *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 10834
71. Díaz JF., Balkus KJ. Jr. Enzyme immobilization in MCM-41 molecular sieves. *J. Mol.Catal.B: Enzymatic* 2 (1996) 115
72. Takahashi H., Li B., Sasaki T., Miyazaki C., Kajino T., Inagaki S. Catalytic activity in organic solvents and stability of immobilized enzyme depend on the pore size and surface characteristics of mesoporous silica. *Chemistry of Materials* 12 (2000) 3301
73. Yiu H.H.P., Wright P.A., Botting N.P. Enzyme immobilization using siliceous mesoporous molecular sieves. *Microporous and mesoporous materials* 44 (2001) 763
74. Vinu A., Murugesan V., Hartmann M. Adsorption of lysozyme over mesoporous molecular sieves MCM-41 and SBA-15: influence of pH and aluminum incorporation. *Am chemistry B* 108 (2004) 7323
75. Vinu A., Murugesan V., Tangermann O., Hartmann M. Adsorption of cytochrome c on mesoporous molecular sieves: influence of pH, pore diameter, and aluminum incorporation. *Chemistry of materials* 16 (2004) 3056.
76. Blanco R.M., Terreros P., Fernández-Pérez M., Otero C., Díaz González G., Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization-characterization of the support and the catalysts. *J. Mol. Catal B* 30 (2004) 83
77. He J., Li X., Evans D.G., Duan X., Li C., *J. Mol Catal. B* 11 (2000) 45
78. Ma H., He J., Evans D.G., Duan Xue. Immobilization of lipase in a mesoporous reactor based on MCM-41. *J. Mol. Catal. B.* 30 (2004) 209

79. Fadnavis N.M., Bhaskar V., Kantam M.L., Choundary B.M. Highly efficient “tight fit” immobilization of alpha-chymotrypsin in mesoporous MCM-41: a novel approach using precursor immobilization and activation. *Biotechnol Prog.* 19 (2003) 346
80. Corma A. Microporous and mesoporous molecular sieves materials and their use in catalysis. *Chem. Rev.*, 97 (1997)2373
81. Kresge C.T., Leonowicz M. E., Roth W.J., Vartuli J.C., Beck J.S. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid template mechanism. *Nature*, 359 (1992) 710
82. Delannay F., Delmon B. *Methods of catalyst characterization and overview*, New York and Basel, (1995) cap 1.
83. Gregg S.J., Sing K.S.W. *Adsorption, Surface Area and Porosity*, 2nd edn, Academic Press, London, (1995).
84. Wheeler A., *Catalysis. Vol. II.* Rheinhold, New York (1955).
85. Langmuir L. The constitution and fundamental properties of solids and liquids part I. Solids. *J. Am. Chem. Soc.*, 38 (1916) 2221
86. Ciesla U., Scuth F., *Ordered mesoporous materials, Microp and Mesop. Mater.* 27 (1999) 131
87. Grun M., Unger K., Matsumoto A., Tsutsumi K. Novel pathways for the preparation of mesoporous MCM-41 materials control of porosity and morphology. *Microp. and Mesop. Mater.*, 27 (1999) 207
88. Jentys A., Kleestorfer K., Vienek H. Concentration of surface hydroxyl groups on MCM-41. *Microp. and Mesop. Matter.* 27 (1999) 321
89. Hunger M., Schenk U., Breuninger M., Glaser R., Weitkamp J. Characterization of the acid sites in MCM-41 type materials by spectroscopic and catalytic techniques. *Microp. and Mesop. Mater.* 27 (1999) 261
90. Carey F.A., and Sundberg R.J., *Advanced organic chemistry*, fourth edition, kluwer academic/plenum publisher. 2001

91. Orton JW., Electron Paramagnetic resonance: An introduction to transition group ions in crystals. Pitman Press London 1968. pág. 1-7
92. Feher G. Electron Paramagnetic Resonance with applications to selected problems in biology, Gordon and Breach science publishers London 1969. 2-40
93. Rosales Hernández MC., Ortiz Pérez S., Correa-Basurto J., Ramirez Rosales D., Zamorano Ulloa R and Trujillo Ferrara J. Catalytic activity of Cytochrome P-450 using NADP reduced by silica hydride, Sometido Biocatalysis and Biotransformation
94. Lehman JP., Ferrin L., Fenselau C., Yost GS. Simultaneous immobilization of cytochrome P-450 and glucoronyltransferase for synthesis of drugs metabolites. Drug Metab. Dispos. 9 (1980) 15
95. Salguero PF., Merino CG., Bunch AW. Effects of immobilization on the activity of rat hepatic microsomal cytochrome P-450 enzymes. Enzyme Microb. Technol. 15 (1993) 100
96. Lamb S.B., Lamb D.C., Kelly S.L., Stuckey D.C. Cytochrome P-450 immobilization as a route to bioremediation/biocatalysis. FEBS Letters, 431 (1998) 343
97. Taylor M., Lamb DC., Cannell RJP., Dawson MJ., Kelly SL. Cofactor recycling with immobilized heterologous cytochrome P-450 105D1 (CYP105D1). Biochem. Biophys. Res. Commun. 279 (2000) 708.
98. Wang, Y., Zheng, X., Jiang, Z. Ordered mesoporous materials for biology and medicine. Progress in Chemistry 18 (2006) 1345
99. Rosales-Hernández MC., Mendieta-Wejebe JE. Correa-Basurto J., Vázquez-Alcántara JI., Terres-Rojas E. and Trujillo-Ferrara J. Catalytic activity of acetylcholinesterase immobilized on mesoporous molecular sieves. Internacional Journal of Biological Macromolecules 2006 en prensa
100. Torres E., Baeza A., Vazquez-Duhalt R., Chemical modification of heme group improves hemoglobin affinity for hydrophobic substrates in organic media. J. Mol. Catal. B: Enzymatic. 19-20 (2002) 437

101. Imai Y., Hashimoto-Yutsudo C., Satake H., Girardin A, Sato R. Multiple forms of cytochrome P-450 purified from liver microsomes of Phenobarbital and 3-methylcholanthrene pretreated rabbits. *J. Biochem.* 88 (1980) 489
102. Manno, M., Cazzaro, S., Rezzadore, M. The mechanism of the suicidal reductive inactivation of microsomal cytochrome P-450 by halothane. *Arch of Toxicol.* 65 (1991) 191
103. Kamath SA., Kummerow FA., Nayaran KA. A simple procedure for the isolation of rat liver microsomes. *Febs Letters* 17 (1971) 90
104. Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr AL., Randal RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265
105. Cesteros Y., Haller GL. Several factor affecting Al-MCM-41 synthesis, *Microp. and Mesop. Mater.*, 43 (2001) 171
106. Eimer G., Pierella L., Monti G., Anunziata O. Preparation and characterization of aluminum containing MCM-41. *Catal. Commun.* 4 (2003) 118
107. Cheng LY., Ping Z., Chuah GK., Jaenicke S., Simon G. A comparison of post-synthesis alumination and sol gel synthesis of MCM-41 with high framework aluminum content. *Microp. and Mesop. Mater.* 27 (1999) 231
108. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GI, Mallia AK. Garther FH., Provenzano MD, Fujimoto EK. Goecke NM., Olso BJ., Klenk DC. Measuremet of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150(1985) 76.
109. Wiechelman KJ. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* 175 (1988) 231
110. Hildebrandt P., Garda H., Stier A., Bachmanova G., Kanaeva I., Archakov I. Protein-protein interactions in microsomal cytochrome P-450 isozyme LM2 and their effect on substrate binding. *Eur. J. Biochem* 186 (1989) 383

111. Kanaeva IP., Dedinskii IR., Skotselyas ED., Krainev AG., Guleva IV., Sevryukova IF., Koen YM., Kuznetsova GP., Bachmanova GI., Archakov AI. Comparative study of monomeric reconstituted and membrane microsomal monooxygenase systems of the rabbit liver. I. Properties of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P450 LM2 (2B4) monomers. *Arch. Biochem. Biophys* 298(1992) 395
112. Imai Y., Sato R. An affinity method for partial purification of cytochrome P-450 from Phenobarbital-induced rabbit liver microsomes. *J. Biochem.* 75 (1974) 689
113. Zhan Z., Li Y., Stearns RA., Ortiz de Montellano PR. Baillie TA. Tang W. Cytochrome P-450 3A4 mediated oxidative conversion of a cyano to an amide group in the metabolism of Pinacidil. *Biochemistry* 41 (2002) 2712
114. LeLean JE., Moon N., Dunham WR., Coon MJ. EPR spectrometry of cytochrome P450 2B4: effects of mutations and substrate binding. *Biochem. Biophys. Res. Comm* 276 (2000) 762
115. Rein H., Ristau O., Friedrich J., Jaing GR., Ruckpaul K. Evidence for the existence of a high spin-low spin equilibrium in liver microsomal cytochrome P-450. *FEBS Letters* 75 (1977) 19
116. Poppl A., Newhouse M., Kevan L. Electron spin resonance and electron spin echo modulation studies of cupric ion ion-exchanged into siliceous MCM-41. *J. Phys. Chem.* 99 (1995)10019
117. Tamburini PP., Schenkman JB. Differences in the mechanism of functional interaction between NADPH-cytochrome P-450 reductase and its redox partners. *Mol. Pharmacol.* 30 (1986) 178
118. Nadler SG., Strobel HW. Identification and characterization of an NADPH-cytochrome P450 reductase derived peptide involved in binding to cytochrome P450. *Arch. Biochem. Biophys.* 290 (1991) 277

119. Kang-Bong Lee, Jun E., La Mar G.N., Rezzano IN., Pandey RK., Smith KM., Walker FA., Buttlair DH. Influence of heme vinyl-and carboxylate-protein contacts on structure and redox properties of bovine cytochrome b₅. J. Am. Chem. Soc. 113 (1991) 3576
120. Rosales Hernández MC., Correa-Basurto J., Flores Sandoval C., Marín Cruz J., Torres E., Trujillo Ferrara J. Theoretical study of heme derivatives under DFT calculations. Journal of Molecular Structure: TEOCHEM 804 (2006) 81
121. Prakash AM, Sung-Suh HM, Kevan L. Electron spin resonance evidence for isomorphous substitution of titanium into titanosilicate TiMCM-41 mesoporous molecular sieves, J. Phys. Chem. B 102 (1998) 857
122. Gao Y., Konovalova T., Lawrence J., Smitha M., Nunley R., Kispert L. Interaction of carotenoids and Cu⁺² in Cu-MCM-41: Distance-dependent reversible electron transfer. J. Phys. Chem. B 107 (2003) 2459

Electron paramagnetic resonance analyses of biotransformation reactions with cytochrome P-450 immobilized on mesoporous molecular sieves

Martha Rosales-Hernández · Lowell Kispert · Eduardo Torres-Ramírez · Daniel Ramírez-Rosales · Rafael Zamorano-Ulloa · Jose Trujillo-Ferrara

Received: 29 September 2006 / Revised: 10 January 2007 / Accepted: 15 January 2007
© Springer Science+Business Media B.V. 2007

Abstract Mobil Crystalline Material (MCM-41) can be used for the immobilization of enzymes and the investigation of electron transfer in biological systems. Electron transfer between MCM-41 with aluminum (Al-MCM-41) and cytochrome P-450 (CYP2B4) was observed using electron paramagnetic resonance (EPR). When CYP2B4 was immobilized by adsorption, it catalyzed the conversion of aniline to *p*-aminophenol. The electron transfer was evidenced when the signal with a *g* value (also called *g*-factor or spectroscopic manifestation of the magnetic moment) of 1.98 increased at the same time that the signal with a *g* value 2.24 decreased due to the

addition of NADPH to CYP2B4 immobilized on Al-MCM-41, indicating that Fe^{III} was reduced to Fe^{II}. Therefore, it is possible that Al-MCM-41 participates in the electron transfer process in biological systems.

Keywords Cytochrome P-450 · Electron transfer · Electron paramagnetic resonance · Mesoporous materials

Introduction

The cytochrome P-450 (CYP450) enzyme family encompasses heme proteins that catalyze monooxygenation, epoxidation and heteroatom oxidation of a wide variety of organic molecules (Seurioukova et al. 1999).

Electron transfer from a redox partner to the CYP450 is an important step during its catalysis (Guengerich and Johnson 1997; Lu and Coon 1968; Morgan and Coon 1984). Interest has been focused on the molecular basis of functional complex formation between CYP450 and its redox partners such as cytochrome P-450 reductase (CPR) (Tamburini and Schenkman 1986). In this complex, both electrostatic and hydrophobic forces in protein-protein interactions are involved (Shen and Strobel 1992).

Most of the studies on the biotransformation of drugs with CYP450 enzymes have been carried

M. Rosales-Hernández · J. Trujillo-Ferrara (✉)
Sección de Estudios de Posgrado e Investigación y
Departamento de Bioquímica de la, Escuela Superior
de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, Plan
de San Luis y Díaz Mirón s/n, 11340 Mexico, D.F.,
Mexico
e-mail: jtrujillo@ipn.mx

L. Kispert
Department of Chemistry, University of Alabama,
Box 870336, Tuscaloosa, AL 35487-0336, USA

E. Torres-Ramírez
Instituto Mexicano del Petróleo, Eje Central L.
Cárdenas 152, 07730 Mexico, D.F., Mexico

D. Ramírez-Rosales · R. Zamorano-Ulloa
Departamento de Física, ESFM, IPN, Ave. Instituto
Politécnico Nacional S/N, Edif. 9 U.P. Zacatenco, Col.
San Pedro Zacatenco, Mexico, D.F. 07738, Mexico

out by using reconstituted systems based on a redox partner such as CPR. Recently, we reported that cytochrome P-450 2B4 (CYP2B4) still has catalytic activity when immobilized on a mesoporous material, Mobil Crystalline Material with aluminum (Al-MCM-41), in the absence of the CYP P450 reductase using NADPH as an electron source (Rosales et al. 2005). This system could be useful for determining how electron transfer occurs between CYP450 and its redox partner, as well as for biotransformation studies *in vitro*.

MCM-41 has a uniform hexagonal arrangement, a pore diameter of 2–10 nm and a surface area of about 1,000 m²/g (Kresge et al. 1992). This material can be modified with different metals such as Cu^{II}, Ti^{IV}, Al^{III}, etc., which give to it additional properties during the process of electron transfer (Jeevarajan et al. 1993; Konvalova and Kispert 1998).

Although it has been proposed that the acidic sites of the MCM-41 framework act as an electron acceptor, the nature of electron acceptor centers is still unclear.

In the present work, we have examined the electron transfer between Al-MCM-41 and immobilized CYP2B4 by using EPR analysis and employing aniline as a substrate. The results showed that the electron transfer occurs when NADPH is added to CYP2B4 immobilized on Al-MCM-41, since the reduction of Fe^{III} to Fe^{II} from CYP2B4 was observed by EPR measurements.

Methods

Synthesis and characterization of Al-MCM-41

MCM-41 was obtained as previously reported (Rosales et al. 2005). The MCM-41 obtained was used to prepare the Al-MCM-41 (Si/Al = 100).

Identification of the phases was determined by X-ray diffraction with a Siemens D-5005 X-ray diffractometer using nickel-filtered CuK_α ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) radiation. The scanning range was from $2\theta = 1.5\text{--}20^\circ$ and the step size was 0.02° . The nitrogen adsorption isotherms at 77 K were measured on a Micrometrics ASAP 2405

instrument. The specific surface area was calculated by the Brunauer–Emmett–Teller (BET) method using the adsorption data from $P/P_0 = 0.06$ to 0.2. The pore size was calculated by the Barrett–Joyner–Halenda (BJH) method. The morphology of MCM-41 particles was determined on a Jeol 100CX-II electron microscopy.

Immobilization of CYP2B4

CYP2B4 from rabbit liver was purchased from Sigma-Aldrich and was used as received without further purification. The enzyme immobilization was based on the Díaz and Balkus (1996) method. The solid support (0.025 g) was suspended in 0.5 ml 9 μM CYP2B4 solution at pH 7.4 in a 0.1 M KH₂PO₄/K₂HPO₄ buffer for 2 h at 4°C under constant stirring. The supernatant was separated from the solid materials by filtration. The amount of enzyme immobilized on the solid supports was determined by using the bicinchoninic acid protein assay (BCA) measuring the protein concentration.

Enzymatic activity measurement

The oxidation of aniline to *p*-aminophenol was used to assess the activity of the immobilized and free enzymes. The reaction was carried out for 30 min at 37°C in 0.5 ml containing 100 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ buffer pH 7.4, 1 mM NADPH and aniline from 0.2 mM to 6.4 mM. When the reaction was done with the free enzyme, 1 nmol CYP2B4 and 2 mM H₂O₂ were used. The same amount of the enzyme was used when it was immobilized. The reaction was stopped by the addition of trichloroacetic acid to give 7.5% (w/v). The reaction mixture was centrifuged at 1840g. Afterwards, the *p*-aminophenol determination was carried out according to the method reported by Kanaeva et al. (1992).

EPR measurements

EPR measurements were carried out at X-Band frequency (9.2 GHz) with a Varian E-12 EPR spectrometer (University of Alabama, USA) and a JEOL JES-RES 3X spectrometer (Mexico) operating at 100 kHz field modulation. The

magnetic field was measured with a Bruker (Billerica, MA) EPR 035 M gaussmeter and the microwave frequency was measured with an HP-5245L model frequency counter (both done at the University of Alabama). The EPR X-band spectra were recorded at variable temperatures from room temperature to 77 K. Variable temperature EPR measurements were recorded employing a home-made device using liquid nitrogen. The g values were calculated from measurements of the magnetic field with a resolution of ± 0.01 mT by using microwave frequency parameters and a DPPH marker.

Results and discussion

Characterization of MCM-41

The X-ray diffraction patterns of Al-MCM-41 are depicted in Fig. 1. The patterns of MCM-41 with a Si/Al ratio of 100 and without aluminum are typical of well-ordered specimens. Al-MCM-41 displayed an intense (100) diffraction peak and two higher ordered (110) (200) hexagonal structured peaks. Al-MCM-41 has a BET surface area

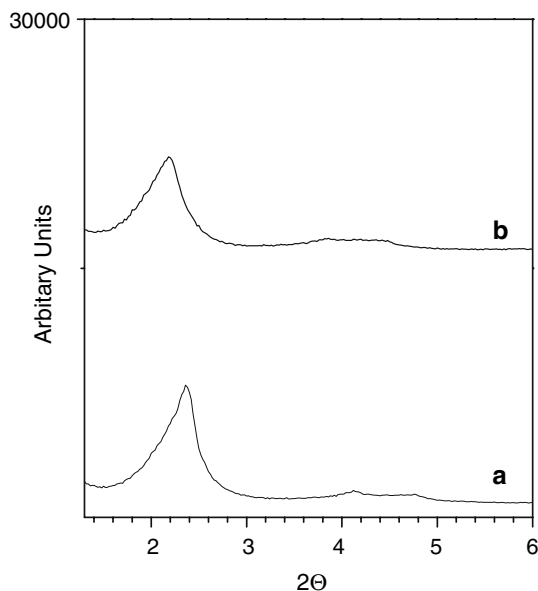


Fig. 1 X ray diffraction pattern of: (a) MCM-41 without aluminum and (b) MCM-41 with Si/Al = 100

of $1056 \text{ m}^2/\text{g}$, a diameter of 54 \AA , and a pore volume $1.47 \text{ cm}^3/\text{g}$.

Enzyme adsorption and catalytic activity of immobilized CYP2B4

According to the BCA assay, the amount of immobilized CYP2B4 was 90%, due to the fact that Al-MCM-41 has a sufficiently large area where the enzyme can be adsorbed. The catalytic activity of the free enzyme was $0.23 \text{ nmol } p\text{-aminophenol formed/nmol enzyme per min}$, using H_2O_2 as an oxidant agent and 1.6 mM aniline ($K_m = 1 \text{ mM}$). For the immobilized enzyme on Al-MCM-41 (1.5 nmol) the catalytic activity was $0.13 \text{ nmol } p\text{-aminophenol/nmol enzyme per min}$ using the same concentration of aniline. Further experiments were carried out by immobilizing 3 nmol enzyme on the material to achieve a more extensive transformation of aniline to p -aminophenol; however, the enzyme converted $0.07 \text{ nmol } p\text{-aminophenol/nmol enzyme per min}$, indicating a decrease rather than an increase in the catalytic activity.

EPR spectroscopy

EPR studies were carried out in order to know whether an electron transfer occurs between Al-MCM-41 and CYP2B4 during the transformation of aniline to p -aminophenol. For each of the reaction components EPR measurements were recorded with the aim of checking for the presence of EPR signals before the reaction. The free enzyme spectrum shows a single rhombic line with g tensor values of $g_x = 2.4205$, $g_y = 2.2442$, $g_z = 1.9165$, shown in Fig. 2, characteristic of low spin iron ($s = 1/2$) in CYP2B4 (LeLean et al. 2000). NADPH showed a singlet signal characteristic of a free radical with $g = 2.01$ and $\Gamma = 0.86 \text{ mT}$ (Fig. 3). The linewidth of this signal is due to unresolved hyperfine interactions with the isoalloxazine ring of the NADPH molecules. Neither Al-MCM-41 nor aniline showed an EPR signal, even under extreme conditions of potency and temperature.

In the EPR experiments employing immobilized CYP2B4 on Al-MCM-41 with Si/Al 100, an EPR signal appeared at $g = 2.25$ (Fig. 4a) from

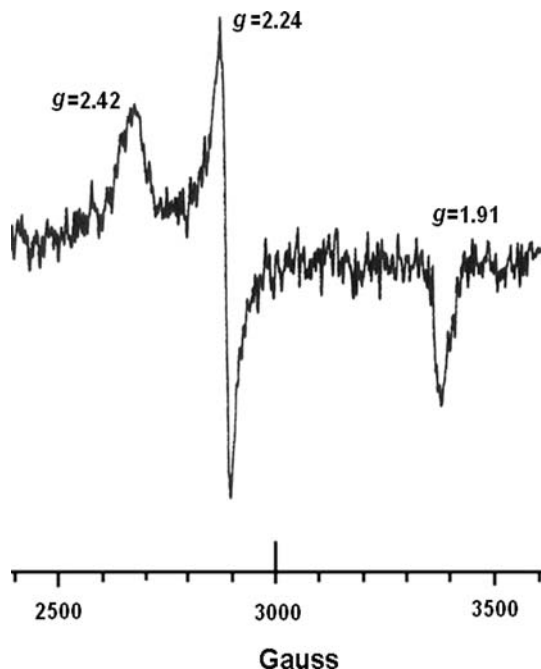


Fig. 2 EPR spectra of CYP2B4 (120 μ M) with g tensor values of $g_x = 2.42$, $g_y = 2.24$, $g_z = 1.91$ characteristic of low spin iron ($s = 1/2$). The spectra was obtained at 77 K, microwave frequency, 8.8582 GHz; microwave power, 25 mW; modulation frequency, 100 kHz; gain, $2 \times 1,000$

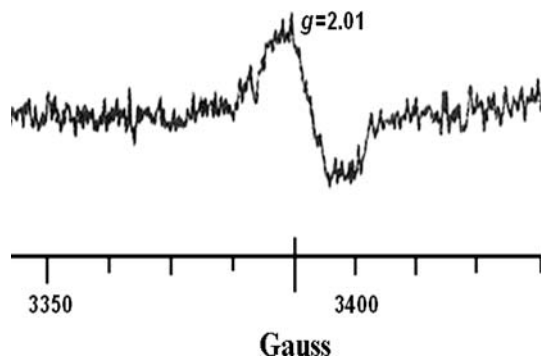


Fig. 3 EPR spectra of NADPH shows a singlet signal characteristic of a free radical with $g = 2.01$. The spectra was carried out at 77 K, microwave frequency, 9.400 GHz; microwave power, 1 mW; modulation frequency, 100 kHz; gain, 6.3×100

CYP2B4. The g_x and g_z values were not well defined due to the low concentration of CYP2B4. In the same spectrum, there was a signal at $g = 1.98$, which could be due to the formation of point defects in the structure of Al-MCM-41, as a similar signal has been observed in irradiated

Al-MCM-41. Due to the fact that this signal was assigned by Prakash et al. (1998) to V centers, in this work a 200 W Hg lamp at a distance of 20 cm was used to irradiate Al-MCM-41. In the EPR spectrum a strong signal appeared at $g = 1.99$, similar to that obtained with CYP2B4 immobilized on Al-MCM-41 (data not shown).

The point defects in Al-MCM-41 could be produced by mechanical stress because the enzyme has some areas where its average diameter is larger than the pore diameter of Al-MCM-41 (Kittel 1996). By X-ray diffraction (XRD) it was not possible to detect changes in the structure of the Al-MCM-41, given that the spectrum was the same before and after the immobilization process (Rosales et al. 2005). However, structural changes in Al-MCM were found by using EPR.

In addition, the signal at $g = 1.98$ could be attributed to a removal of the sixth coordination of the iron atom, originally occupied by a water molecule. This allows for the relaxation of the iron atom, thus lowering the rhombic distortion to the octahedral field (LeLean et al. 2000). Since the signal at $g = 1.91$ was shifted to 1.98 during the experiments with immobilized CYP2B4, we can infer that the immobilization process causes great changes in the electronic environment of porphyrin. Also, during the immobilization the enzyme could take on a different conformation.

Aniline in buffer was added to CYP2B4 immobilized on MCM-41 as a substrate (Fig. 4b) in order to assess the catalytic activity. The EPR spectrum with aniline showed the same signal at $g = 2.25$ as for CYP2B4 without aniline, but with a 1.5-fold greater intensity, due to a well known property that aniline is a substrate type II and thus causes an increase in the low-spin iron content (Rein et al. 1977). Thus, we can conclude that aniline produces the same effects on the heme group, even though CYP2B4 is immobilized on Al-MCM-41. Then, NADPH was added to the same sample (Fig. 4c), which produced the reduction of Fe^{III} to Fe^{II} atom from CYP2B4, as shown by the decrease in the intensity of the EPR signal at $g = 2.25$. In addition, the EPR signal at $g = 1.98$ increased (Fig. 4c), indicating that an electron transfer took place; also, an overlapping signal appeared due to residual NADPH. Therefore, the electron transfer occurs from NADPH

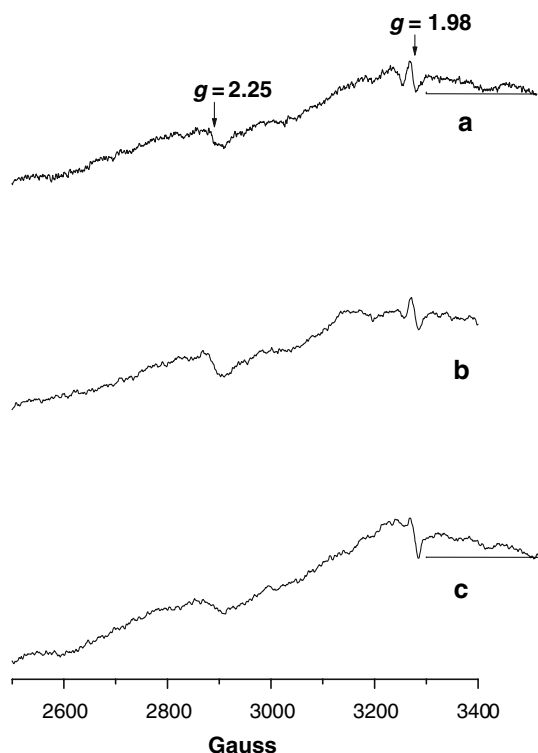


Fig. 4 EPR spectrum of (a) CYP2B4 immobilized on Al-MCM-41 showed two signal, one at $g = 2.25$ which corresponds to the iron from CYP2B4 and the other one signal at $g = 1.98$ which could be due to either removal the Fe^{III} atom sixth coordination or the formation of point defects in the Al-MCM-41 structure, (b) CYP2B4 immobilized on Al-MCM-41 using aniline as substrate, the signal at $g = 2.25$ increase due to that aniline produce a change in the heme group, (c) CYP2B4 immobilized on Al-MCM-41 using aniline as substrate and NADPH as cofactor, the signal at $g = 2.25$ decrease due to the reduction of Fe^{III} to Fe^{II} atom from CYP2B4; the spectrum were recorded at 77 K, microwave frequency, 9.096 GHz; microwave power, 20 mW; modulation frequency, 100 kHz; gain, 4×10^4

to the iron atom through Al-MCM41. However, it is not possible to identify which aminoacids are involved in the electron transfer because signals from these were not observed.

Given that EPR experiments at 77 K did not show changes in the signal from iron, EPR measurements were carried out at a higher temperature 15 min after the reaction was started. The components of the reaction were the same as the experiments measured at 77 K (NADPH, aniline and 3 nmol of CYP2B4 immo-

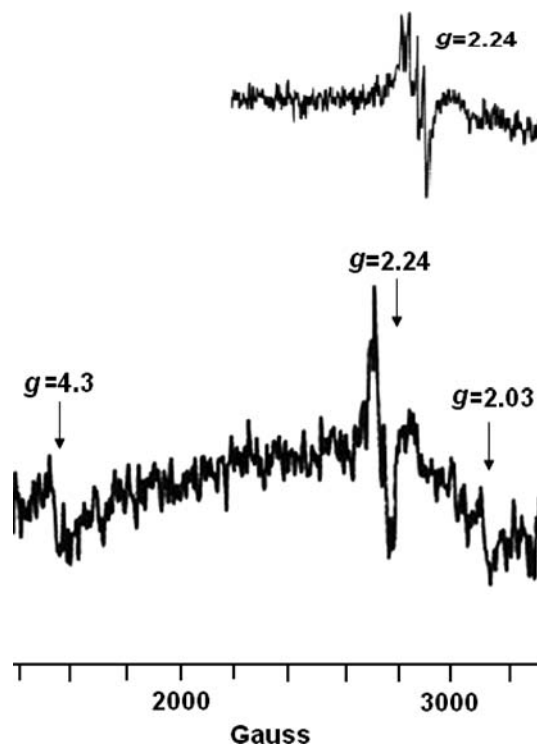


Fig. 5 EPR spectra of reaction contained NADPH, aniline and 3 nmol of CYP2B4 immobilized on Al-MCM-41. The spectra was recorder at 120 K, the signal at $g = 4.3$ is due to iron with spin 5/2, the group of signals at $g = 2.24$ could be due to structural changes in the porphyrin and the signal at $g = 2.03$ corresponds to iron non heme; microwave frequency, 8.8616 GHz; microwave power, 25 mW; modulation frequency, 100 kHz; gain, $2 \times 1,000$

bilized on Al-MCM-41). Various signals appeared in the EPR spectrum recorded at 120 K (Fig. 5): one at $g = 4.3$ which is characteristic of iron with a spin of 5/2, a group of signals at $g = 2.25$ which was caused by structural changes in the porphyrin during the catalytic transformation, and one at $g = 2.032$ which was assigned to the non-heme iron (Peisach and Blumberg 1970).

Acknowledgements The authors thank CONACYT and COFAA-SIP/IPN for financial support and the Chemical Sciences, Geosciences and Biosciences Division, Office of Basic Energy Sciences, US Department of Energy for operational support at the University of Alabama and the National Science Foundation for EPR Instrument Grants CHE-0342921 and CHE-0079498 at the same place. We thank Ignacio Colin and Rogelio Ruiz for technical support in the EPR measurements.

References

- Díaz JF, Balkus Jr KJ (1996) Enzyme immobilization in MCM-41 molecular sieve. *J Mol Catal B: Enzym* 2:115–126
- Guengerich FP, Johnson WW (1997) Kinetics of ferric cytochrome P-450 reduction by NADPH cytochrome P-450 reductase. Rapid reduction in absence of substrate: a variation among cytochrome P-450 system. *Biochemistry* 36:14741–14750
- Jeevarajan AS, Kispert LD, Piekara-Sady L (1993) An ENDOR study of carotenoid cation radicals on silica alumina. *Chem Phys Lett* 209:269–274
- Kanaeva IP, Dedinskii IR, Skotselyas ED, Krainev AG, Guleva IV, Sevryukova IF, Koen YM, Kuznetsova GP, Bachmanova GI, Archakov AI. (1992) Comparative study of Monomeric Reconstituted and Membrane Microsomal Monooxygenase systems of the rabbit Liver. *Arch Biochem Biophys* 298:395–402
- Kittel C (1996) Introduction to solid state physics. John Wiley, New York, pp 540–553
- Kononova TA, Kispert LD (1998) EPR and ENDOR studies of carotenoid solid Lewis acid interactions. *J Chem Soc Faraday Trans* 94:1465–1468
- Kresge CT, Leonowicz ME, Roth WJ, Vartuli JC, Beck JS (1992) Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Nature* 359:710–712
- LeLean JE, Moon N, Dunham WR, Coon MJ (2000) EPR spectrometry of cytochrome P-450 2B4: effects of mutations and substrate binding. *Biochem Biophys Res Comm* 276:762–766
- Lu AYH, Coon MJ (1968) Role of hemoprotein P-450 in fatty acid ω -hydroxylation in a soluble system from liver microsomes. *J Biol Chem* 243:1331–1332
- Morgan ET, Coon MJ (1984) Effects of cytochrome b₅ on cytochrome P-450 catalyzed reactions. Studies with manganese-substituted cytochrome b₅. *Drug Metab Dispos* 12:358–364
- Peisach J, Blumberg WE (1970) Electron paramagnetic resonance study of the high and low spin forms of cytochrome P-450 in liver and liver microsomes from a methylcholanthrene treated rabbit. *Proc Natl Acad Sci* 67:172–179
- Prakash AM, Sung-Suh HM, Kevan L (1998) Electron spin resonance evidence for isomorphous substitution of Titanium into titanosilicate Ti-MCM41 mesoporous molecular sieve. *J Phys Chem B* 102:857–864
- Rein H, Ristau O, Friedrich J, Jaing GR, Ruckpaul K (1977) Evidence for the existence of a high spin-low spin equilibrium in liver microsomal cytochrome P-450. *FEBS Lett* 75:19–22
- Rosales MC, Mendieta JE, Vazquez JI, Miranda R, García LA, Trujillo FJ (2005) Immobilization of cytochrome P-450 on MCM-41 with different silicon/aluminum ratios. *Microporous Mesoporous Mater* 80:25–31
- Seurioukova IF, Li H, Zhang H, Peterson JA, Poulos TL (1999) Structure of a cytochrome P-450 redox partner electron transfer complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:863–1868
- Shen S, Strobel HW (1992) The role of cytochrome P450 lysine residues in the interaction between cytochrome P450IA1 and NADPH cytochrome P450 reductase. *Arch Biochem Biophys* 294:83–90
- Tamburini PP, Schenkman JB (1986) Differences in the mechanism of functional interaction between NADPH-cytochrome P-450 reductase and its redox partners. *Mol Pharmacol* 30:178–185