

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 795 844**

21 Número de solicitud: 201930459

51 Int. Cl.:

**C12N 9/20** (2006.01)

**B01J 37/00** (2006.01)

**B01J 23/72** (2006.01)

**C12Q 1/34** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

**24.05.2019**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**24.11.2020**

Fecha de concesión:

**24.06.2021**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**01.07.2021**

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (50.0%)  
C/ Serrano, 117  
28006 Madrid (Madrid) ES y  
SAMSUNG ELECTRONICS CO., LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PALOMO CARMONA, José Miguel;  
LOSADA GARCÍA, Noelia y  
RODRÍGUEZ OTERO, Alba**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **Material híbrido que comprende una matriz proteínica y nanopartículas de cobre en la misma, proceso de preparación de la misma y uso de la misma**

57 Resumen:

Material híbrido que comprende una matriz proteínica y nanopartículas de cobre en la misma, proceso de preparación de la misma y uso de la misma.

La presente invención se refiere un material híbrido que comprende: una matriz proteica que comprende la lipasa B de la *Cándida antártica* y nanopartículas de especies de cobre seleccionadas de entre: Cu(0), Cu<sub>2</sub>O, Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> o cualquier de sus combinaciones teniendo su mayor dimensión entre 3 y 15 nm. El material se preparó mediante el uso de una enzima en una solución tampón y una sal de cobre a temperatura ambiente. El material presenta una excelente actividad tipo catalasa, una excelente capacidad catalítica en la degradación de contaminantes orgánicos, como el Bisfenol A, y en la reducción del 4-nitrofenol a 4-aminofenol.

ES 2 795 844 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

## DESCRIPCIÓN

### **Material híbrido que comprende una matriz proteínica y nanopartículas de cobre en la misma, proceso de preparación de la misma y uso de la misma**

5

La invención se refiere a un material híbrido que comprende una matriz proteica y nanopartículas de cobre. La presente invención también describe su síntesis por medio de una tecnología única y verde. El material híbrido puede utilizarse como catalizador, ya que muestra una excelente actividad catalítica, un excelente rendimiento catalítico en la degradación del contaminante orgánico Bisfenol A y en la reducción de 4-nitrofenol (pNP) a 4-aminofenol (pAP).

10

### **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

15

El cobre es un metal abundante en tierra y de bajo costo, que ha sido descrito como muy útil para diferentes aplicaciones, como agente antimicrobiano, remediación ambiental<sup>[1]</sup>, electrónica y especialmente en catálisis. De hecho, se ha llevado a cabo un trabajo muy extenso en los últimos años en el área de aplicación de catalizadores de cobre en reacciones químicas, especialmente en enlaces C-C (química clic, activación C-H, etc.), oxidación selectiva, reducciones.

20

En particular, las nanopartículas de Cu han generado un gran interés en los últimos años<sup>[2]</sup>. La alta relación superficie/volumen de los nanomateriales en comparación con los materiales a granel los hace generalmente candidatos atractivos para su aplicación como catalizadores.

25

En realidad, se han descrito diferentes formas prácticas y directas de preparar nanomateriales de Cu<sup>[3]</sup>.

30

Sin embargo, el uso de nanopartículas de Cu (NPs) está restringido por la inestabilidad inherente del Cu en condiciones atmosféricas, lo que lo hace propenso a la oxidación. Los esfuerzos para desarrollar los métodos y materiales de apoyo que aumentan la estabilidad de las NPs de Cu al alterar su sensibilidad al oxígeno, al agua y a otras entidades químicas ha alentado la exploración de nanopartículas alternativas basados en Cu con estructuras más complejas, tales como las NPs de Cu de núcleo/cáscara

35

(*core/shell*) o los sistemas basados en óxidos de cobre.

La síntesis de las NPs de Cu y óxido de cobre se centra esencialmente en cuatro tipos de reacciones químicas: reducción, oxidación, hidrólisis o condensación. Dependiendo  
5 de la elección de los productos finales, se puede aplicar uno o una combinación de los productos químicos mencionados anteriormente. La síntesis de NPs de Cu a menudo implica la reducción de fuentes de Cu(I) o Cu(II). La síntesis de los NPs de óxido de cobre, por otro lado, requiere básicamente la hidrólisis de los precursores seguida de un proceso de deshidratación que conduce a los productos finales. Además, puede  
10 desplegarse un proceso de oxidación (a veces inevitable para los NPs basados en Cu) para la preparación de NPs basados en Cu con números de oxidación más altos de sus respectivos precursores de estados de oxidación más bajos. En los procesos sintéticos, las técnicas que se aplican proporcionan un entorno y una energía adecuados para facilitar el proceso de elección, mientras que se imponen restricciones  
15 adicionales para modular la estabilidad, las propiedades y la morfología de las NPs finales.

Por lo tanto, el desarrollo de metodologías para preparar nanopartículas de cobre altamente activas, selectivas, estables y robustas es obligado<sup>[4]</sup>. También son deseables desde un punto de vista más aplicable los sistemas sostenibles, los CuNPs  
20 baratos y de alta cantidad.

La especie de cobre en términos de catálisis es uno de los aspectos importantes en las propiedades finales de los nanocatalizadores en una reacción particular. Por lo  
25 tanto, el desarrollo de tecnologías que permitan controlar específicamente la síntesis de una especie de cobre representa un reto importante.

Una aplicación importante en la que se han utilizado catalizadores de cobre en los últimos años se ha centrado en la degradación de contaminantes orgánicos, y  
30 específicamente en el Bisfenol A (BPA).

El BPA es un monómero importante en la fabricación de plásticos de policarbonato, latas para alimentos y otros productos químicos de uso diario. El uso diario y mundial de BPA y productos con BPA condujo a su distribución ubicua en agua,  
35 sedimentos/suelo y atmósfera. Además, el BPA ha sido identificado como un disruptor

endocrino ambiental por su actividad estrogénica y genotóxica<sup>[5]</sup>. Por lo tanto, la contaminación por BPA en el medio ambiente es una preocupación cada vez mayor en todo el mundo, y se recomiendan con urgencia métodos para eliminar eficazmente el BPA del medio ambiente. En 2018, la Comisión Europea adoptó una propuesta para reforzar el reglamento sobre el uso de BPA en materiales en contacto con alimentos, el nuevo reglamento introduce un nuevo límite de migración específica (LME) de 0,05 ppm de BPA.

Por lo tanto, una metodología para obtener una estrategia muy rápida, eficiente y verde para eliminar el BPA es obligada. En realidad, sólo se han aplicado unos pocos ejemplos utilizando Cu o materiales a base de Cu a esta reacción en muchos casos utilizando catalizadores homogéneos<sup>[6]</sup>.

En esta invención se han logrado excelentes resultados en la degradación completa de BPA en el agua con los bionanohíbridos de Cu heterogéneos, que fueron reutilizados varias veces sin perder la actividad, un papel crítico para la aplicación industrial.

La degradación del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en el agua y el oxígeno tiene una reacción importante en los sistemas biológicos. De hecho, la formación de  $H_2O_2$  debido a la fuga de superóxido mitocondrial perpetúa el estrés oxidativo en las lesiones neuronales. El catalizador biológico que interviene en la eliminación es la catalasa, una metaloenzima de cobre.

La aplicación de esta enzima podría ser el objetivo de la terapia antioxidante, sin embargo, esto está restringido por su liberación de naturaleza lábil e inadecuada.

Por lo tanto, el desarrollo de sistemas artificiales estables y bien distribuidos que imiten esta actividad biológica representan un desafío.

30

## Referencias

- [1] Singh, J., Dutta, T., Kim, K.-H., Rawat, M., Samddar, P., Kumar, P. 'Green' synthesis of metals and their oxide nanoparticles: Applications for environmental remediation. *J. Nanobiotechnol.*, **2018**, *16*, art. no. 84.
- [2] Gawande, A.Goswami, M.B., Felpin F.-X., Asefa, T. , Huang, X., Silva, R., Zou, X., Zboril, R., Varma, R.S. Cu and Cu-Based Nanoparticles: Synthesis and Applications in Catalysis. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 3722–3811.
- [3] Zaera, F. Nanostructured Materials for Applications in Heterogeneous Catalysis. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 2746–2762.
- [4] Ben Aissa, M. A., Tremblay, B., Andrieux-Ledier, A., Maisonhaute, E., Raouafi, N., Courty, A. Copper Nanoparticles of Well-Controlled Size and Shape: A New Advance in Synthesis and Self-Organization. *Nanoscale* **2015**, *7*, 3189–3195.
- [5] Ulutao, O.K., Yildiz N, Durmaz, E, Ahbab M.A., Barlas N, Çok Ā. An in vivo assessment of the genotoxic potential of bisphenol A and 4-tert-octylphenol in rats. *Arch Toxicol* **2011**, *85*, 995-1001.
- [6] Pachamuthu, M.P., Karthikeyan, S., Maheswari, R., Lee, A.F., Ramanathan, A. Fenton-like degradation of Bisphenol A catalyzed by mesoporous Cu/TUD-1. *Appl. Surf. Sci.*, **2017**, *393*, 67-73.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención describe un material híbrido que comprende una matriz proteica y nanopartículas (NPs) de una especie de Cu así como el proceso para su preparación. El material presenta una excelente actividad catalítica, una excelente capacidad catalítica en la degradación de contaminantes orgánicos, como el Bisfenol A (BPA) y en la reducción de 4-nitrofenol (pNP) a 4-aminofenol (pAP).

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un material híbrido que comprende:

- una matriz proteica que comprende la lipasa B de la *Cándida antártica* y
- nanopartículas de especies de cobre seleccionadas de entre: Cu (0), Cu<sub>2</sub>O, Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> o cualquiera de sus combinaciones,

donde las nanopartículas tienen un diámetro medio de entre 3 y 15 nm y están distribuidas homogéneamente dentro de la matriz.

La lipasa B de la *Cándida Antártica* (CALB) (número de referencia GenBank: CAA83122.1) es una lipasa no específica de la *Cándida Antártica*. CALB es estable en un amplio rango de pH, especialmente en el rango de pH alcalino. Esta enzima exhibe un alto grado de especificidad del sustrato, permitiendo grandes grupos sobre el ácido carboxílico y resultando en conversiones altamente regio y enantioselectivas.

La lipasa B de la *Cándida Antártica* está disponible en el mercado, por ejemplo, a través de Novozymes bajo el nombre de Lipozyme® CALB.

10 Las interacciones entre la matriz y las nanopartículas no son covalentes.

La matriz está formada por la lipasa B de la *Cándida Antártica* en forma de agregado. El término "agregado" es una multiplicidad de moléculas de proteínas que se han agrupado a través de la interacción estérica o de otro modo entre sí.

15

En una realización preferida de la invención, la matriz consiste en la lipasa B de *Cándida Antártica*.

En una realización preferida, el material híbrido tiene entre el 22 y el 94% por peso en Cu, obtenido por análisis elemental ICP-OES (espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente).

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un proceso para preparar el material híbrido descrito en el primer aspecto de la presente invención. El proceso comprende las siguientes etapas:

- a) adición en agitación de la lipasa B de la *Cándida Antártica* a una solución tampón, en la que el pH de la solución tampón oscila entre 7 y 10
- b) adición de una sal de cobre a la solución obtenida en la etapa a) a temperatura ambiente (20-25°C)
- 30 c) incubación de la solución obtenida en la etapa b) durante un tiempo comprendido entre 16h y 3 días,
- d) recoger, lavar y secar el material híbrido obtenido en la etapa anterior.

En una realización preferida, el material híbrido recogido (que se ha formado como un sólido en la solución) es lavado con agua y/o secado por liofilización en la etapa d).

35

En una realización preferida, el proceso incluye una etapa adicional c)' (después de la etapa c) y antes de la etapa d)) que puede ser:

- una etapa de reducción que comprenda la adición de un agente reductor, preferiblemente borohidruro sódico, a la mezcla obtenida en la etapa c) o
- 5 - una etapa de oxidación que comprenda la adición de un agente oxidante, preferiblemente peróxido de hidrógeno o NaOH, a la mezcla obtenida en la etapa c).

En una realización preferida, la etapa de reducción o de oxidación se lleva a cabo para durante aproximadamente 30 min.

10

Preferiblemente, la solución tampón (es decir, una solución acuosa) de la etapa a) es una solución tampón de fosfato de sodio o una solución tampón de bicarbonato de sodio; más preferiblemente, una solución tampón de fosfato de 0,1 M (pH 7) o una solución tampón de bicarbonato de sodio de 0,1 M (pH 10).

15

En una realización preferida, se añaden entre 0,3 y 3 mg de lipasa B de la *Cándida antártica* por ml de solución tampón, más preferiblemente 18 mg por cada 60 mL de solución tampón en la etapa a).

20

Preferiblemente, la sal de cobre es  $\text{Cu}_2\text{SO}_4$ , más preferible  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .

En una realización preferida, se añaden 10 mg de sal de cobre en la etapa b) por ml de solución tampón.

25

Preferiblemente, el tiempo de incubación en la etapa c) oscila entre 16 h y 24 h, más preferiblemente 16 h. La incubación significa que la mezcla se deja bajo agitación durante el tiempo especificado.

30

En una realización preferida, en la etapa c') el agente de reducción, preferentemente borohidruro de sodio, está añadido a una concentración final de al menos 0,012 M en la mezcla, más preferentemente, entre 0,012 y 0,12 M, incluso más preferentemente a una concentración final de 0,12.

En una realización, el proceso para preparar el material híbrido comprende:

35

- a) adición en agitación de la lipasa B de la *Cándida antártica* a una solución tampón

de bicarbonato de sodio de 0,1 M (pH 10), en la que se añade la proteína en una proporción de 0,3 mg por ml de solución tampón,

b) adición de una sal de cobre, preferiblemente  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , a la solución obtenida en la etapa anterior a temperatura ambiente (20-25°C), donde se añade la sal de cobre en una proporción de 10 mg por ml de solución tampón,

c) incubación de la solución obtenida en la etapa b) durante 16 h.

c') adición de borohidruro sódico a una concentración final de 0,12 M,

d) recoger, lavar con agua y secar por liofilización el material híbrido obtenido en la etapa anterior.

10

Esta realización proporciona un material híbrido que tiene Cu(0) como la especie de cobre principal y contiene alrededor del 20% por peso de Cu(I) en forma de  $\text{Cu}_2\text{O}$ . Las nanopartículas tienen un tamaño de alrededor de 9 nm (en la invención presente, el término "tamaño" se refiere a diámetro medio). El contenido de Cu en el material es de alrededor del 84% en peso.

15

En otra realización, el proceso para preparar el material híbrido comprende:

a) adición en agitación de la lipasa B de la *Cándida antártica* a una solución tampón de fosfato de sodio de 0,1 M (pH 7), en la que se añade la proteína en una proporción de 0,3 mg por ml de solución tampón,

20

b) adición de una sal de cobre, preferiblemente  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , a la solución obtenida en la etapa anterior a temperatura ambiente (20-25°C), donde se añade la sal de cobre en una proporción de 10 mg por ml de solución tampón,

c) incubación de la solución obtenida en la etapa b) durante 16 h.

25

c') adición de borohidruro sódico a una concentración final de 0,12 M,

d) recoger, lavar con agua y secar por liofilización el material híbrido obtenido en la etapa anterior.

30

En este caso, la principal especie de Cu es el Cu(I) en forma de  $\text{Cu}_2\text{O}$  en torno al 70% en peso y que también contiene alrededor del 30% en peso de Cu(0). Este material híbrido presenta un 81% en peso de Cu y las nanopartículas son de 15 nm.

En otra realización, el proceso para preparar el material híbrido comprende:

a) adición en agitación de la lipasa B de la *Cándida antártica* a una solución tampón de bicarbonato de sodio de 0,1 M (pH 10), en la que se añade la proteína en una

35

proporción de 0,6 mg por ml de solución tampón,

b) adición de una sal de cobre, preferiblemente  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , a la solución obtenida en la etapa anterior a temperatura ambiente (20-25°C), donde se añade la sal de cobre en una proporción de 10 mg por ml de solución tampón,

5 c) incubación de la solución obtenida en la etapa b) durante 16 h.

c') adición de borohidruro sódico a una concentración final de 0,12 M,

d) recoger, lavar con agua y secar por liofilización el material híbrido obtenido en la etapa anterior.

10 En este caso, también se obtiene un material híbrido que tiene Cu(0) como principal especie de cobre. Las nanopartículas tienen un tamaño aproximado de 6 nm. El contenido de Cu en el material es de alrededor del 94% en peso.

En otra realización, el proceso para preparar el material híbrido comprende:

15 a) adición en agitación de la lipasa B de la *Cándida antártica* a una solución tampón de fosfato de sodio de 0,1 M (pH 7), en la que se añade la proteína en una proporción de 0,6 mg por ml de solución tampón,

b) adición de una sal de cobre, preferiblemente  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , a la solución obtenida en la etapa anterior a temperatura ambiente (20-25°C), donde se añade la sal de

20 cobre en una proporción de 10 mg por ml de solución tampón,

c) incubación de la solución obtenida en la etapa b) durante 16 h.

c') adición de borohidruro sódico a una concentración final de 0,12 M,

d) recoger, lavar con agua y secar por liofilización el material híbrido obtenido en la etapa anterior.

25

En esta realización, se observaron diferencias en las especies de Cu y en el tamaño de las nanopartículas. En este caso, el material híbrido comprende exclusivamente especies de  $\text{Cu}_2\text{O}$ , sin rastros de Cu(0). Las nanopartículas son cristalinas y tienen un tamaño aproximado de 10 nm. El contenido de Cu en el material es de

30 aproximadamente 61% en peso.

En otra realización, el proceso para preparar el material híbrido comprende:

a) adición en agitación de la lipasa B de la *Cándida antártica* a una solución tampón de fosfato de sodio de 0,1 M (pH 7), en la que se añade la proteína en una

35 proporción de 0,3 mg por ml de solución tampón,

- b) adición de una sal de cobre, preferiblemente  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , a la solución obtenida en la etapa anterior a temperatura ambiente (20-25°C), donde se añade la sal de cobre en una proporción de 10 mg por ml de solución tampón,
- c) incubación de la solución obtenida en la etapa b) durante 16 h.
- 5 d) recoger, lavar con agua y secar por liofilización el material híbrido obtenido en la etapa anterior.

En este caso la especie de cobre obtenida es  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ . Las nanopartículas tienen un tamaño aproximado de 3-5 nm. El contenido de Cu en el material es de alrededor del  
10 32% en peso.

En otra realización, el proceso para preparar el material híbrido comprende:

- a) adición en agitación de la lipasa B de la *Cándida antártica* a una solución tampón de fosfato de sodio de 0,1 M (pH 7), en la que se añade la proteína en una  
15 proporción de 0,3 mg por ml de solución tampón,
- b) adición de una sal de cobre, preferiblemente  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , a la solución obtenida en la etapa anterior a temperatura ambiente (20-25°C), donde se añade la sal de cobre en una proporción de 10 mg por ml de solución tampón,
- c) incubación de la solución obtenida en la etapa b) durante 16 h.
- 20 c') adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a una concentración final de 0,1 M,
- d) recoger, lavar con agua y secar por liofilización el material híbrido obtenido en la etapa anterior.

En este caso la especie de cobre obtenida es  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ . Las nanopartículas tienen un  
25 tamaño aproximado de 5 nm. El contenido de Cu en el material es de alrededor del 22% en peso.

En otra realización, el proceso para preparar el material híbrido comprende:

- a) adición en agitación de la lipasa B de la *Cándida antártica* a una solución tampón de fosfato de sodio de 0,1 M (pH 7), en la que se añade la proteína en una  
30 proporción de 0,3 mg por ml de solución tampón,
- b) adición de una sal de cobre, preferiblemente  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , a la solución obtenida en la etapa anterior a temperatura ambiente (20-25°C), donde se añade la sal de cobre en una proporción de 10 mg por ml de solución tampón,
- 35 c) incubación de la solución obtenida en la etapa b) durante 16 h.

- c') adición de NaOH a una concentración final de 0,5 M,
- d) recoger, lavar con agua y secar por liofilización el material híbrido obtenido en la etapa anterior.

5 En este caso la especie de cobre obtenida es  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ . Las nanopartículas tienen un tamaño aproximado de 6 nm. El contenido de Cu en el material es de alrededor del 35% en peso.

En otra realización, el proceso para preparar el material híbrido comprende:

- 10 a) adición en agitación de la lipasa B de la *Cándida antártica* a una solución tampón de fosfato de sodio de 0,1 M (pH 7), en la que se añade la proteína en una proporción de 0,3 mg por ml de solución tampón,
- b) adición de una sal de cobre, preferiblemente  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , a la solución obtenida en la etapa anterior a temperatura ambiente (20-25°C), donde se añade la sal de
- 15 cobre en una proporción de 10 mg por ml de solución tampón,
- c) incubación de la solución obtenida en la etapa b) durante 16 h.
- c') adición de borohidruro sódico a una concentración final de 0,012 M,
- d) recoger, lavar con agua y secar por liofilización el material híbrido obtenido en la
- 20 etapa anterior.

En estas condiciones sintéticas, el material híbrido está compuesto por nanopartículas de  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  extremadamente cristalinas (tamaño aprox. 10 nm). Además, el contenido de Cu en este caso es de alrededor del 48% en peso.

- 25 En otra realización, el proceso para preparar el material híbrido comprende:
  - a) adición en agitación de la lipasa B de la *Cándida antártica* a una solución tampón de fosfato de sodio de 0,1 M (pH 7), en la que se añade la proteína en una proporción de 3 mg por ml de solución tampón,
  - b) adición de una sal de cobre, preferiblemente  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , a la solución obtenida
  - 30 en la etapa anterior a temperatura ambiente (20-25°C), donde se añade la sal de cobre en una proporción de 10 mg por ml de solución tampón,
  - c) incubación de la solución obtenida en la etapa b) durante 3 días.
  - c') la adición opcional de borohidruro sódico a una concentración final de 0,12 M,
  - d) recoger, lavar con agua y secar por liofilización el material híbrido obtenido la
  - 35 etapa anterior.

En estos casos, el  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  es la principal especie de cobre, conteniendo también  $\text{Cu}_2\text{O}$ , especialmente en los casos en que se llevó a cabo el paso de reducción. Se obtiene un contenido de Cu de alrededor del 50% en peso.

5 La invención presente también relaciona al material híbrido obtenido por el proceso descrito en el segundo aspecto de la invención. El material híbrido obtenido por el proceso de la invención tiene las características del material híbrido descrito en el primer aspecto de la invención presente.

10 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del material híbrido descrito en la invención presente como catalizador.

En una realización preferida, el material híbrido descrito en la presente invención se usa como catalizador para degradar contaminantes orgánicos, preferentemente  
15 compuestos fenólicos; más preferentemente para degradar Bisphenol-A, formando  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ .

En otra realización preferida, el material híbrido descrito en la presente invención se usa para la reducción de 4-nitrofenol (pNP) a 4-aminophenol (pAP).

20 En otra realización preferida, el material híbrido descrito en la presente invención se usa para la degradación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , formando  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$ , ya que el material híbrido tiene actividad tipo catalasa.

25 En la presente invención, los términos "material híbrido", "material biohíbrido", "material bionanohíbrido" o simplemente "biohíbrido" o "bionanohíbrido" o "material híbrido que comprende una matriz proteica y nanopartículas de cobre" se utilizan como sinónimos y se refieren a un material que comprende una matriz de lipasa B de la *Cándida antártica*, (compuesto orgánico) y especies de Cu (compuesto inorgánico)  
30 seleccionadas de entre: Cu (0),  $\text{Cu}_2\text{O}$ ,  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  o cualquiera de sus combinaciones, en forma de nanopartículas con un diámetro medio de entre 3 y 15 nm.

El término "promedio" de una dimensión de una pluralidad de partículas significa el promedio de esa dimensión para la pluralidad. Por ejemplo, el término "diámetro  
35 medio" de una pluralidad de nanopartículas significa el promedio de los diámetros de

las nanopartículas, donde el diámetro de una sola nanopartícula es el promedio de los diámetros de esa nanopartícula. Las nanopartículas son esféricas o sustancialmente esféricas. El diámetro medio se obtiene por microscopía electrónica de transmisión (MET).

5

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente se entiende por uno de los expertos ordinarios en la materia a la que pertenece esta invención. Métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos aquí pueden ser utilizados en la práctica de la presente invención. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

10  
15

#### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

**FIG. 1:** Caracterización del biohíbrido **Cu-CALB-BIC** preparado en el ejemplo 1 de la presente invención. A) Espectro XRD, B) Imágenes TEM.

20

**FIG. 2:** Caracterización del biohíbrido **Cu-CALB-PHOS** preparado en el ejemplo 1 de la presente invención. A) Espectro XRD, B) Imágenes TEM.

**FIG. 3:** Caracterización del biohíbrido **Cu-CALB-BIC2** preparado en el ejemplo 1 de la presente invención. A) Espectro XRD, B) Imágenes TEM.

25

**FIG. 4:** Caracterización del biohíbrido **Cu-CALB-PHOS2** preparado en el ejemplo 1 de la presente invención. A) Espectro XRD, B) Imágenes TEM.

30

**FIG. 5:** Caracterización del biohíbrido **Cu-CALB-PHOS-NR** preparado en el ejemplo 1 de la presente invención. A) Espectro XRD, B) Imágenes TEM.

**FIG. 6:** Caracterización del biohíbrido **Cu-CALB-PHOS-NRNaOH** preparado en el ejemplo 1 de la invención presente. A) Espectro XRD, B) Imágenes TEM. C) C)

35

Imágenes HTEM.

**FIG. 7:** Caracterización del biohíbrido **Cu-CALB-PHOS-NRH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** preparado en el ejemplo 1 de la presente invención. A) Espectro XRD, B) Imágenes TEM. C) Imágenes HTEM.

**FIG. 8:** Caracterización del biohíbrido **Cu-CALB-PHOS10%**. A) Espectro XRD, B) Imágenes TEM.

**FIG. 9:** Caracterización del biohíbrido **Cu-CALB-PHOS-10**. A) Espectro XRD, B) Imagen SEM.

**FIG10:** Caracterización del biohíbrido **Cu-CALB-PHOS-NR-10**. A) Espectro XRD, B) Imagen SEM.

**FIG. 11:** Representación del porcentaje degradado de BPA catalizado por diferentes nanohíbridos Cu-CALB a 100 mM tampón fosfato pH 8 en presencia de 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**FIG. 12:** Representación del porcentaje degradado de BPA catalizado por diferentes híbridos en presencia de 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a diferentes pHs. A) **Cu-CALB-PHOS2** y B) **Cu-CALB-PHOS**.

**FIG. 13:** Degradación de BPA por **Cu-CALB-PHOS2** a 100 mM tampón fosfato pH 8 en presencia de diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**FIG. 14:** Reciclaje de **Cu-CALB-PHOS2** en la degradación oxidativa de BPA a 100 mM tampón fosfato pH 8 en presencia de 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**FIG. 15:** A. Representación del porcentaje degradado de BPA (4,6 ppm) catalizado por diferentes **Cu-CALB-PHOS2** a 100 mM tampón fosfato pH 8 en presencia de 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. B. Mecanismo propuesto para la degradación del BPA.

**FIG. 16:** Actividad catalasa de **Cu-CALB-PHOS2**. A) degradación de 50 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en agua destilada ajustada a diferentes pHs. B) degradación de 50 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a

diferentes concentraciones de tampón fosfato a pH 6.

**FIG. 17:** Esquema de preparación de los bionanohíbridos que comprenden las NPs de las especies de cobre y una matriz proteica.

5

## EJEMPLOS

Algunos ejemplos llevados a cabo por los inventores están proporcionados abajo para ilustrar la presente invención:

10

### Sección Experimental

#### General

La lipasa B de la solución de *Cándida antártica* (CAL-B) (Lipozyme®CALB) (10 mg/mL) se compró a Novozymes (Copenhague, Dinamarca). El sulfato de cobre (II) pentahidratado [Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O] y el peróxido de hidrógeno (33%) son de Panreac (Barcelona, España). P-nitrofenol, p-nitrofenil propionato, bicarbonato de sodio, fosfato de sodio, borohidruro de sodio y bisfenol A (BPA) fueron comprados a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). El acetonitrilo de grado HPLC se compró a Scharlab (Barcelona, España). En un instrumento OPTIMA 2100 DV (PerkinElmer, Waltham, MA, EE.UU.) se realizó la espectrometría de emisión óptica por plasma acoplado inductivamente (ICP-OES). Los patrones de difracción de rayos X (XRD) se obtuvieron utilizando un Difractómetro de Análisis de Textura D8 Advance (Bruker, Billerica, MA, EUA) con radiación Cu K $\alpha$ . Se obtuvieron imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) y de microscopía TEM de alta resolución (HRTEM) en un microscopio 2100F (JEOL, Tokio, Japón) equipado con un detector EDX INCA x-sight (Oxford Instruments, Abingdon, Reino Unido). El espaciamiento interplanar en las nanoestructuras se calculó utilizando la transformación inversa de Fourier con el programa de micrografía digital GATAN (Corporate Headquarters, Pleasanton, CA, USA). Se realizaron imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) en un microscopio TM-1000 (Hitachi, Tokio, Japón). Para la recuperación de los biohíbridos se utilizó una centrífuga refrigerada Biocen 22 R (Orto-Alresa, Ajalvir, España). Los análisis espectrofotométricos se realizaron con un espectrofotómetro V-730 (JASCO, Tokio, Japón). Se utilizó un sistema de HPLC de espectro P100 (Thermo Scientifics, Waltham, MA, USA). Los análisis se realizaron en 25 °C utilizando un horno de

35

columna L-7300 (Hitachi, Tokio, Japón) y un detector UV6000LP (Thermo Scientifics, Waltham, MA, EE.UU.).

### **Ejemplo 1: Síntesis general de bionanohíbridos Cu-CALB-BIC y Cu-CALB-PHOS.**

5

Se agregó 1.8 mL (18 mg de proteína) de solución comercial de lipasa de *Cándida antártica* a un tampón de 60 mL 0,1M (bicarbonato de sodio pH =10 o fosfato de sodio pH 7) en una botella de vidrio de 250 mL que contenía un pequeño agitador magnético de barra. Después, se agregaron 600 mg de  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  (10 mg/ml) a la solución proteica y se mantuvo durante 16 horas. Después de los primeros 30 minutos de incubación, la solución se volvió turbia (turquesa) y se midió la solución de pH, lo que indica una disminución de 8 a 6, dependiendo del tampón utilizado. Después de 16 h, se añadieron 6 mL de solución acuosa de  $\text{NaBH}_4$  (300 mg) (1,2 M) a la solución turbia (en dos veces de 3 mL) obteniendo una concentración final de 0,12 M de borohidruro sódico en la mezcla. La solución se volvió rápidamente negra y la mezcla se redujo durante 30 minutos. Después de la incubación, en todos los casos, la mezcla fue centrifugada a 8000 rpm durante 5 min, (10 mL por tubo tipo halcón). El pélet generado fue re-suspendido en 15 mL de agua. El pH de la solución sobrenadante se midió en aproximadamente 7 o 9. Se centrifugó de nuevo a 8000 r.p.m. durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. El pH de la solución sobrenadante se midió de nuevo, con un valor de pH de 7. El proceso se repitió dos veces más. Finalmente, se retiró el sobrenadante y se volvió a suspender el precipitado de cada halcón en 2 mL de agua, se recogieron todas las soluciones en un matraz de fondo redondo, se congelaron con nitrógeno líquido y se liofilizaron durante 16 horas. Después se obtuvieron 150 mg de los llamados **Cu-CALB-BIC** y **Cu-CALB-PHOS**, respectivamente.

Se hicieron diferentes modificaciones del protocolo para obtener diferentes especies. Inicialmente, se preparó un catalizador utilizando doble cantidad de enzima (3,6 mL de solución CALB en lugar de 1,8 mL), obteniendo **Cu-CALB-PHOS-2** y **Cu-CALB-BIC-2**.

Se utilizó otra variación del protocolo, en la que no se realizó el paso de reducción, obteniéndose **Cu-CALB-PHOS-NR**. Además de la última variación, también se realizó un paso de oxidación en lugar de un paso de reducción mediante la adición de 6 ml de una solución de hidróxido de sodio (NaOH) de 500 mM durante 30 minutos o 6 ml de

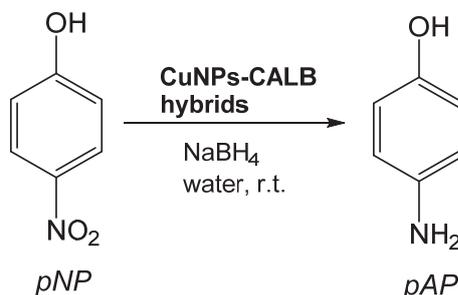
una solución de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) de 0,1 M durante 30 minutos (60  $\mu$ L de la solución madre de  $H_2O_2$  en 6 mL de agua destilada), obteniéndose **Cu-CALB-PHOS-NRNaOH** y **Cu-CALB-PHOS-NRH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**, respectivamente. Otra de las variaciones fue la reducción del borohidruro sódico al 10%, añadiendo 6 mL de agua con  $NaBH_4$  (30 mg), obteniendo **Cu-CAL-B-PHOS10%R**.

La última variación se refirió tanto a la cantidad de enzimas como al tiempo de incubación, aumentándolas de 1,8 mL a 18 mL en volumen enzimático y de 16 h a 72 h; los catalizadores obtenidos fueron **Cu-CALB-PHOS-10** y **Cu-CALB-PHOS-NR-10**.

La caracterización de los diferentes bionanohíbridos de Cu se realizó mediante análisis XRD, ICP-OES, TEM y SEM.

#### **Ejemplo 2: Reducción catalítica de 4-nitrofenol (pNP) a 4-aminofenol (pAP)**

A una solución acuosa de p-nitrofenol (pNP) (1 mM; 2 mL), se añadió  $NaBH_4$  sólido (3 mg) para alcanzar una concentración final de 0,04 M (La reacción catalítica típica se realizó añadiendo un exceso de  $NaBH_4$  (0,04 M) para asegurar su concentración constante a lo largo de toda la reacción y, por lo tanto, para aplicar una cinética pseudo-primer orden con respecto al pNP a una solución acuosa del sustrato en presencia de catalizadores). En estas condiciones, ante la adicción de  $NaBH_4$ , la banda de absorbancia inicial de la solución de pNP pasa a un cambio inmediato de 317 a 400 nm debido a la formación de iones de 4-nitrofenolatos. Inmediatamente después, se añadieron 3 mg de los diferentes bionanohíbridos de Cu-CALB, agitando suavemente a 25°C en un agitador orbital. El progreso de la reacción se monitorizó tomando una alícuota de la solución (0,1 mL) en diferentes momentos, diluyéndola con agua destilada (2 mL) y midiendo el espectro de absorción entre 500 y 300 nm en una cubeta de PMMA (Tabla 1).

**Table 1.** Degradación de pNP por todos los bionanohíbridos.

Bionanohíbrido	Degradación pNP Rendimiento (%)	Tiempo (min)
<b>Cu-CALB-PHOS</b>	100	1.5
<b>Cu-CALB-BIC</b>	100	0.5
<b>Cu-CALB-PHOS-2</b>	100	3
<b>Cu-CALB-BIC-2</b>	100	0.5
<b>Cu-CALB-PHOS-NR</b>	100	4
<b>Cu-CALB-PHOS-NR-NaOH</b>	100	3
<b>Cu-CALB-PHOS-NR-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	100	3
<b>Cu-CALB-PHOS10%R</b>	100	1.5
<b>Cu-CALB-PHOS-10</b>	100	12.5
<b>Cu-CALB-PHOS-NR-10</b>	100	15

**Ejemplo 3: Degradación catalítica del Bisfenol-A (BPA)**

- 5 Se preparó una solución de 10 mM de BPA en acetonitrilo puro. 0,2 ml de esta solución se disolvieron en 10 ml de solución tampón de fosfato de sodio de 100 mM o 5 mM de pH 6, pH 7 o pH 8 para lograr una concentración de BPA de 0,2 mM. El pH de la solución se ajustó utilizando HCl o NaOH 1 M. A esta solución de BPA se le añadió peróxido de hidrógeno para obtener diferentes concentraciones (12, 25, 50,
- 10 100 o 150 mM). Para inicializar la reacción, se añadieron 3 mg del nanohíbrido a 2 mL de esta solución (BPA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en un frasco de vidrio de 7 mL. Un rodillo agitaba suavemente a temperatura ambiente. Se tomaron muestras (30 µl) en diferentes momentos y la reacción fue seguida por HPLC. Las muestras se diluyeron 5 veces en una mezcla de agua destilada/acetonitrilo 50/50 antes de la inyección. La columna
- 15 HPLC era C8 Kromasil 150x4,6 mm AV-2059. Las condiciones de HPLC utilizadas fueron: una mezcla isocrática de 50% de acetonitrilo y 50% de agua bidestilada, detección UV a 225 nm usando un detector de arreglo de diodos, y una tasa de flujo

de 1 mL/min. En estas condiciones, el tiempo de retención de BPA fue de 4,90 minutos, y para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue de 1,57 minutos.

5 **Ejemplo 4: Reutilización del nanohíbrido Cu-CALB-PHOS2 en la degradación del Bisfenol-A (BPA)**

El nanohíbrido **Cu-CALB-PHOS2** fue reutilizado en cinco ciclos para la degradación de BPA utilizando las condiciones descritas anteriormente. El catalizador se lavó varias veces con agua y se centrifugó antes de la siguiente reacción.

10 **Ejemplo 5: Actividad catalítica de los nanohíbridos de Cu**

Se preparó una solución de sustrato añadiendo 52 µL de peróxido de hidrógeno a 9,8 mL de tampón fosfato de 100 mM o 5 mM (pH 6, pH 7 y pH 8) o agua destilada para obtener una concentración final de 50 mM. El pH de la solución se ajustó con HCl o NaOH 1 M. Para iniciar la reacción, se añadieron 4,5 mg del nanohíbrido de Cu o 50 µL de Catazyme® 25L (1 mg/mL en agua destilada) a 3 mL de la solución anterior a temperatura ambiente. La reacción fue seguida por la medición de la degradación del peróxido de hidrógeno, registrando la disminución de la absorbancia por espectrofotometría a 240 nm en cubetas de cuarzo de 1 cm de longitud de trayecto, añadiendo 2 mL de esta solución en diferentes momentos. Después de cada medición, el volumen añadido se recuperaba y se vertía a la solución de reacción.

Para determinar la actividad catalasa para cada catalizador, se calculó el valor de  $\Delta\text{Abs}/\text{min}$  utilizando la parte lineal de la curva ( $\Delta\text{AbsS}$ ).

25 La actividad específica (U/mg) se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$U(\mu\text{mol}/\text{min}) = \frac{\Delta\text{Abs}}{t(\text{min})} \cdot \frac{V_f(\text{mL})}{\varepsilon\left(\frac{\text{mL}}{\mu\text{mol} \cdot \text{cm}}\right) \cdot b(\text{cm})}$$

donde el coeficiente de extinción molar ( $\varepsilon$ ) utilizado fue de 43,6 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>

30 **Resultados y discusión:**

**1) Preparación y caracterización de diferentes bionanohíbridos que comprenden la proteína lipasa B de la *Cándida antártica* (CAL-B) y NPs de diferentes especies de Cu:**

La síntesis de estos bionanohíbridos que contienen nanopartículas de cobre se ha realizado en medio acuoso añadiendo la lipasa comercial B de la *Cándida antártica* (CAL-B, 33 kDa, enzima monomérica, suministrada por Novozymes) a una solución acuosa de sal de cobre totalmente soluble en agua a temperatura ambiente y bajo  
5 agitación suave (Figura 14). El sulfato de cobre (II) pentahidratado [ $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ] se utilizó como sal de cobre con una concentración de 10 mg/mL. 1,8 mL de CAL-B fue añadido a 60 mL de solución salina de cobre a temperatura ambiente. Se probaron diferentes tampones y diferentes concentraciones y el uso de 100 mM de bicarbonato de sodio (pH 10) y 100 mM de fosfato de sodio (pH 7) fueron las mejores opciones.

10

Después de 16 horas de incubación, el sólido fue reducido usando borohidruro de sodio, lavado varias veces con agua destilada, centrifugado y liofilizado durante la noche para obtener los dos biohíbridos heterogéneos **Cu-CALB-BIC** y **Cu-CALB-PHOS**, respectivamente. Ambos catalizadores se caracterizaron por diferentes  
15 técnicas de análisis como XRD, ICP-OES, TEM y SEM. Se obtuvieron diferentes especies dependiendo del tampón utilizado en la síntesis.

El análisis DRX demostró que la principal especie de cobre en el híbrido **Cu-CALB-BIC** era Cu(0), que contenía alrededor del 20% en peso de Cu(I) en forma de  $\text{Cu}_2\text{O}$   
20 (Figura 1). El análisis TEM mostró la formación de nanopartículas de alrededor de 9 nm de tamaño (Figura 1B). El ICP-OES mostró que el contenido de Cu en el Cu biohíbrido **Cu-CALB-BIC** era del 84% (Los porcentajes de Cu en el material híbrido que se indican en la presente invención se refieren a porcentajes por peso). Usando calefacción a 100°C para secar en lugar de liofilización, el  $\text{Cu}_2\text{O}$  aumentó hasta ser de  
25 alrededor del 60% de las especies de Cu, el resto fue Cu (0) (no se muestran datos).

En el caso del híbrido **Cu-CALB-PHOS**, el DRX mostró que la principal especie de Cu era Cu(I) en forma de  $\text{Cu}_2\text{O}$  alrededor del 70% y que también contenía alrededor del 30% de Cu (0) (Figura 2). Este biohíbrido presentó 81% de Cu calculado por análisis  
30 de ICP. Los experimentos de TEM revelaron la formación de nanopartículas de 15 nm (Figura 2B), ligeramente mayores que con el uso de bicarbonato como tampón de la síntesis (Figura 1). Además, este método se modificó utilizando acetona en el paso de lavado en lugar de agua, o calentando a 80°C en lugar de liofilización para obtener el sólido. En todas estas condiciones el nanohíbrido presentaba una mezcla de las  
35 diferentes especies de Cu y las propiedades catalíticas y la estabilidad mecánica del

sólido eran peores.

Una modificación en los protocolos anteriores fue añadir la doble cantidad de enzima en la preparación, manteniendo los pasos restantes iguales. Esta modificación no  
5 afectó a la especie de cobre en el método que utiliza carbonato como tampón, donde el patrón DRX del llamado nanohíbrido **Cu-CALB-BIC2** mostró los picos característicos de Cu (0) y una minoría a 37° del Cu<sub>2</sub>O (por lo que fue ligeramente inferior al del **Cu-CALB-BIC**) (Figura 3). Sin embargo, el contenido de Cu en esta muestra fue de 94%, alrededor de 10% más que usando la mitad de la cantidad de  
10 proteína (**Cu-CALB-BIC**). El análisis TEM reveló la formación de Cu(0)NPs como un núcleo de 6 nm (Figura 3B), tamaño más pequeño que el observado en **Cu-CALB-BIC**.

En el caso de utilizar fosfato como tampón, se observaron diferencias en el tamaño de  
15 las especies de Cu y de las nanopartículas. En este caso, el patrón XRD determinó que el biohíbrido **Cu-CALB-PHOS2** mostró picos correspondientes exclusivamente a especies de Cu<sub>2</sub>O, sin rastros de Cu (0) (Figura 4). También se observaron cambios en la cantidad de Cu, siendo para este híbrido 61% determinado por ICP-OES, 20% menos que en **Cu-CALB-PHOS**. El análisis TEM también mostró la formación de  
20 nanopartículas cristalinas con un diámetro de 10 nm (Figura 4).

Por lo tanto, utilizando esta última metodología, se sintetizó un nuevo Cu bionanohíbrido de morfología controlada, tamaño y especies metálicas. Esto podría explicarse por el concepto de que una mayor cantidad de proteína influye en el control  
25 de la reducción de las especies de óxido de cobre y también influye en el paso de coalescencia, controlando el crecimiento de las nanopartículas.

Además, al seleccionar la metodología utilizando tampón fosfato, se sintetizaron otros tipos de bionanohíbridos de Cu evitando el paso reductor (**Cu-CALB-NR**) o  
30 cambiándolo por incubación en presencia de peróxido de hidrógeno (paso oxidativo) (**Cu-CALB-NRH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**) o NaOH (**Cu-CALB-NRNaOH**) en la metodología. En los tres casos, se obtuvo un sólido azul claro en lugar del típico color negro para los otros biohíbridos. El XRD mostró que en este caso las especies de cobre fueron Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> en todos los casos (Figura 5-7) y el contenido de Cu fue 32%, 22% y 35%,  
35 respectivamente.

El análisis TEM reveló las ligeras diferencias en el tamaño del diámetro de las nanopartículas. En todos los casos se formaron nanopartículas esféricas cristalinas, de 3-5 nm en **Cu-CALB-NR** (Figura 5), 5,8 nm en **Cu-CALB-NRNaOH** (Figura 6) y 5 nm para **Cu-CALB-NRH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** (Figura 7).

5

Finalmente, se realizó una disminución en la cantidad de borohidruro de sodio utilizado en el paso de reducción. El 10% (p/v) de NaBH<sub>4</sub> utilizado en el método anterior se añadió en este caso manteniendo intactos el resto de los pasos sintéticos en el método de síntesis de **Cu-CALB-PHOS**, en este caso el biohíbrido llamado **Cu-CALB-PHOS10%R**.

10

En estas condiciones sintéticas, se obtuvo un biohíbrido compuesto de nanopartículas de Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> extremadamente cristalinas (diámetro aprox. 10 nm) (Figura 8) en lugar del biohíbrido Cu/Cu<sub>2</sub>O NPs sintetizado en **Cu-CALB-PHOS** (Figura 2). Además, el contenido de Cu en este caso fue del 48% en lugar del 81% con la reducción total.

15

Se realizó una prueba final utilizando 10 veces más cantidad de proteína y aumentando el tiempo de incubación de 1 día a 3 días. Estas variaciones se utilizaron en dos protocolos, utilizando tampón fosfato y con o sin paso de reducción, siendo los bionanohíbridos **Cu-CALB-PHOS-10** y **Cu-CALB-PHOS-NR-10**, respectivamente. En este caso, el análisis SEM reveló la formación de nanoflores bien formadas en ambos casos (Figura 9-10). El patrón XRD mostró la presencia de Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> como principal especie de cobre, conteniendo también Cu<sub>2</sub>O especialmente en **Cu-CALB-PHOS-10** donde se utilizó el paso de reducción (Figura 9). El ICP-OES determinó un contenido de Cu de alrededor del 50% en cada caso.

20

25

En todos los casos, los bionanohíbridos fueron sintetizados de una manera muy efectiva, simple y sostenible a escala multigramo, fácilmente escalable a gramos.

## 30 **2) Determinación de la actividad catalítica reductora de pNP**

Para evaluar la actividad metálica de los nuevos bionanohíbridos preparados en el ejemplo 1, se realizó la actividad de los mismos en la reducción de p-nitrofenol (pNP) a p-aminofenol (pAP) en medio acuoso y a temperatura ambiente (t.a.) (Tabla 1). Las diferencias en la tasa de degradación del pNP que existe entre los diferentes catalizadores se debe a la especie de Cu obtenida.

35

**Cu-CALB-BIC** y **Cu-CALB-BIC2** (principalmente Cu (0)) fueron los nanocatalizadores más rápidos con una transformación completa de pNP a pAP (150 ppm) en 30 segundos. Sin embargo, los nanohíbridos de Cu que contienen especies de Cu(I) mostraron una menor eficiencia catalítica, el **Cu-CALB-PHOS2** fue más activo que el **Cu-CALB-PHOS**, que necesita el doble de tiempo para completar la transformación, 3 minutos en lugar de 1,5 minutos (Tabla 1).

El catalizador preparado sin pasos de reducción o con una cantidad muy alta de proteínas mostró una menor actividad catalítica, siendo necesario entre 3 y 15 minutos para la degradación completa (Tabla 1).

### 3) Degradación del bisfenol A por Bionanohíbridos

La capacidad catalítica de los bionanohíbridos preparados en el ejemplo 1 se evaluó en la degradación del Bisfenol A (BPA) en medio acuoso a temperatura ambiente. Las condiciones experimentales seleccionadas fueron 100 mM de fosfato tampón en el rango de pH 6-8 y la cantidad de BPA fue de 46 ppm utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como oxidante. Todos los nanocatalizadores de Cu fueron probados inicialmente utilizando 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un tampón de fosfato de 100 mM a pH 8. De ellos, los resultados obtenidos para los cuatro mejores se representan en la Figura 11. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando **Cu-CALB-PHOS** y **Cu-CALB-PHOS2** donde >95% de BPA fue degradado en 20 minutos. Esto representa, por lo que sabemos, el proceso de degradación más rápido para eliminar el BPA en medios acuosos. El híbrido **Cu-CALB-BIC** degradó 68% de BPA, mientras que el **Cu-CALB-NR** sólo eliminó 47% a los 20 minutos alcanzando >90% de BPA degradado después de 4 horas de incubación (Figura 11). Estos resultados demostraron que las especies de Cu<sub>2</sub>O NPs mostraron mejor actividad catalítica que las de Cu(0).

La reacción también fue probada con estos dos excelentes catalizadores a diferentes pHs (de 6 a 8) (Figura 12). En ambos casos, los nanohíbridos de Cu fueron mejores catalizadores a pH 8, aunque sorprendentemente la eficiencia del **Cu-CALB-PHOS2** disminuyó a pH 7 más que a pH 6 en comparación con el **Cu-CALB-PHOS** donde los resultados fueron bastante similares a estos dos pHs.

También se evaluó la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La reacción se realizó utilizando **Cu-CALB-**

**PHOS2** como catalizador a 100 mM de fosfato pH 8 en presencia de diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 12 a 150 mM (Figura 13). Los resultados demostraron que 100 mM parece ser la cantidad óptima para realizar la reacción, porque el uso de una cantidad mayor no aceleró la reacción y, sin embargo, la adición de menos cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ralentizó la reacción.

Una vez obtenidas las condiciones óptimas, se realizó un experimento de reciclaje utilizando el mejor bionanohíbrido de Cu, **Cu-CALB-PHOS2** (Figura 14). Los catalizadores mostraron una excelente estabilidad manteniendo el 95% de la eficiencia catalítica después de seis ciclos de uso.

Considerando el muy rápido proceso de degradación por este catalizador y con el fin de dilucidar un posible mecanismo de degradación de BPA, la reacción se realizó reduciendo la proporción mg catalizador/mL de volumen de reacción de 1,5 (el resultado anterior) a 0,3. En estas condiciones, el catalizador aún funcionaba bien, degradando más del 95% de BPA en 60 minutos (Figura 15A). Evaluando los puntos intermedios, se pudo observar la formación de un pico principalmente en HPLC correspondiente a la benzoquinona. Así, un posible mecanismo del proceso puede ser la formación de un radical hidroxilo que se transforma rápidamente principalmente en benzoquinona que, al abrir el anillo, sigue una vía de degradación común a otros picos intermedios para finalmente degradarse en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O (Figura 15B), mecanismo también descrito por Giu y otros Giu *et al.* (Gui, L., Jin, H., Zheng, Y., Peng, R., Luo, Y., Yu, P. Electrochemical Degradation of Bisphenol A Using Different Modified Anodes Based on Titanium in Aqueous Solution. *Int. J. Electrochem. Sci.*, **2018**, 13, 7141-7156).

#### 4) Actividad catalítica de los biohíbridos de Cu-nanopartículas

Se evaluó la actividad catalasa (degradación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de los diferentes bionanohíbridos de Cu sintetizados en agua, tampón de 5 mM y tampón de 100 mM a diferentes pHs (Tabla 2). Se encontraron diferencias interesantes entre los diferentes bionanohíbridos de Cu y especialmente en comparación con la catalasa nativa de Novozymes (Catzyme).

35

Tabla 2. Actividades catalasa de los diferentes bionanohíbridos de Cu (catalizadores).

Catalizador	Solución de Reacción	Actividad específica (U/mg)			
		pH no ajustado	pH 6	pH 7	pH 8
<b>Cu-CAL-B-PHOS</b>	Agua destilada	0,43	0,92	0,37	0,37
	5 mM tampón fosfato		0,23	0,43	1,29
	100 mM tampón fosfato		0,32	0,14	0,57
<b>Cu-CAL-B-PHOS2</b>	Agua destilada	2,49	2,11	0,65	1,46
	5 mM tampón fosfato		0,08	0,46	0,19
	100 mM tampón fosfato		0,38	0,35	0,08
<b>Cu-CAL-B-BIC</b>	Agua destilada	1,19	0,36	1,02	0,20
	5 mM tampón fosfato		0,08	0,50	0,28
	100 mM tampón fosfato		0,17	0,19	0,06
<b>Cu-CAL-B-BIC2</b>	Agua destilada	0,65	0,65	0,79	0,79
	5 mM tampón fosfato		0,10	0,57	0,17
	100 mM tampón fosfato		0,02	0,17	0,10
Catzyme	Agua destilada	2,79	11,16	6,98	46,05
	5 mM tampón fosfato		58,60	103,26	78,14
	100 mM tampón fosfato		26,51	36,28	9,77

El biohíbrido **Cu-CALB-PHOS2** exhibió la mayor actividad catalítica en la degradación del peróxido de hidrógeno, mostrando 2,49 U/mg de actividad específica en agua destilada y 2,11 U/mg en agua ajustada a pH 6. En esta última condición este catalizador mostró una actividad 6 veces mayor en comparación con el **Cu-CALB-BIC**, 4 veces más que el **Cu-CALB-BIC2** y 2 veces más que el **Cu-CALB-PHOS** (Tabla 2). En agua simplemente destilada, el **Cu-CALB-PHOS2** mostró casi seis veces más

actividad que el **Cu-CALB-PHOS**, 2 veces más que el **Cu-CALB-BIC** y 4 veces más que el **Cu-CALB-BIC2**.

5 En particular, para **Cu-CALB-PHOS2**, la evaluación de la actividad de la catalasa se midió en agua destilada en un rango de pH de 4 a 9 (Figura 16, Tabla 2). El mejor resultado se obtuvo a pH 6, y se obtuvieron buenos valores también a pH 4 o pH 9 (Figura 16A) aunque el catalizador era inestable en estas condiciones. También la Figura 13B mostró la influencia negativa de la presencia de tampón en la solución, disminuyendo claramente la actividad catalasa de este biohíbrido Cu en estas  
10 condiciones.

En el caso de los otros bionanohíbridos de Cu, por ejemplo, el **Cu-CALB-PHOS** mostró el mayor valor de actividad en agua destilada ajustado a pH 6, mientras que la mejor actividad catalítica a pH más altos se logró en presencia de un tampón de 5 mM  
15 (Tabla 2).

Para el **Cu-CALB-BIC**, los mejores resultados se obtuvieron en agua destilada, también ajustada a pH 6 y 7, mientras que para el **Cu-CALB-BIC2** se obtuvieron en agua destilada a pH 7 y 8.  
20

En comparación con la catalasa natural, los resultados más interesantes se encontraron en las condiciones del agua destilada (sin ajustar el pH) donde el **Cu-CALB-PHOS2** mostró una actividad similar a la de la enzima natural.

## 25 **Conclusiones de los ejemplos**

Se han sintetizado nuevos biohíbridos de nanopartículas de Cu, donde el control de la especie de Cu, tamaño, cristalinidad y morfología de las nanopartículas es posible dependiendo de la metodología utilizada, por ejemplo, siendo posible obtener bionanohíbridos que contienen nanopartículas de Cu(0) de muy pequeño tamaño,  
30 exclusivamente NPs de Cu<sub>2</sub>O o NPs de Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> cristalinas.

Los bionanohíbridos de cobre mostraron una excelente actividad catalítica en la reducción del p-nitrofenol. Estos nuevos catalizadores mostraron un excelente desempeño catalítico en la degradación de un compuesto tóxico y contaminante como el BPA, donde el mejor, el biohíbrido **Cu-CALB-PHOS2**, fue capaz de eliminar más del  
35

95% de BPA (46 ppm) en 20 minutos en presencia de peróxido de hidrógeno a pH 8 utilizando 1,5 g/L de catalizador.

5 Además, aquí se ha demostrado por primera vez que estos novedosos bionanohíbridos de Cu mostraron actividad catalasa, incluso en un caso valores similares de actividad específica a la Catalasa natural (Catazyme de Novozymes) en agua destilada, lo que demuestra que son metalo-enzimas artificiales estables con posibles aplicaciones interesantes. Esto también puede extenderse a la comparación con otras catalasas de diferentes fuentes o incluso pseudocatalasas.

10

## REIVINDICACIONES

1. Un material híbrido que comprende:
- una matriz proteica que comprende la lipasa B de la *Cándida antártica* y
  - nanopartículas de especies de cobre seleccionadas de entre: Cu (0), Cu<sub>2</sub>O, Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> o cualquiera de sus combinaciones,
- donde las nanopartículas tienen un diámetro medio de entre 3 y 15 nm y están distribuidas homogéneamente dentro de la matriz.
2. Material híbrido según la reivindicación 1, en el que la matriz de proteínas está formada por lipasa B de la *Cándida Antártica*.
3. Un material híbrido según la reivindicación 1 o 2, en el que el material híbrido tiene entre el 22 y el 94% en peso en Cu.
4. Un proceso para preparar el material híbrido descrito en las reclamaciones 1-3, el proceso comprende las siguientes etapas:
- a) adición en agitación de la lipasa B de la *Cándida Antártica* a una solución tampón, en la que el pH de la solución tampón oscila entre 7 y 10
  - b) adición de una sal de cobre a la solución obtenida en la etapa a) a temperatura ambiente (20-25°C)
  - c) incubación de la solución obtenida en la etapa b) durante un tiempo comprendido entre 16h y 3 días,
  - d) recoger, lavar y secar el material híbrido obtenido en la etapa anterior.
5. Un proceso según la reivindicación 4, en el que el material híbrido recolectado se lava con agua y/o se seca por liofilización en la etapa d).
6. Un proceso según cualquiera de las reclamaciones 4-5, donde el proceso incluye una etapa adicional c)', después de la etapa c y antes de la etapa d), que ser:
- una etapa de reducción que comprende la adición de un agente reductor a la mezcla obtenida en la etapa c) o
  - una etapa de oxidación que comprende la adición de un agente oxidante a la mezcla obtenida en la etapa c).

7. Un proceso según cualquiera de las reivindicaciones 4-6, donde la solución tampón de la etapa a) es un tampón de fosfato de sodio o un tampón de bicarbonato de sodio.
8. Un proceso según cualquiera de las reivindicaciones 4-7, en el que se añaden entre  
5 0,3 y 3 mg de lipasa B de la *Cándida antártica* por ml de solución tampón en la etapa a).
9. Un proceso según cualquiera de las reivindicaciones 4-8, donde la sal de cobre es  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .
- 10
10. Un proceso según cualquiera de las reivindicaciones 4-9, en el que se añaden 10 mg de sal de cobre en la etapa b) por ml de solución tampón.
11. Un proceso según cualquiera de las reivindicaciones 4-10, donde el tiempo de  
15 incubación en la etapa c) oscila entre 16 h y 24 h.
12. Un proceso según la reivindicación 4 en donde el proceso comprende los siguientes pasos:
- a) adición en agitación de la lipasa B de la *Cándida antártica* a una solución tampón de  
20 bicarbonato de sodio 0,1 M, en la que se añade la proteína en una proporción de 0,3 mg por ml de solución tampón,
- b) adición de  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  a la solución obtenida en la etapa anterior a 20-25°C, en el que se añade el  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en una proporción de 10 mg por ml de solución tampón,
- c) incubación de la solución obtenida en la etapa b) durante 16 h.
- 25 c') adición de borohidruro sódico a su concentración final de 0,12 M,
- d) Recoger, lavar con agua y secar por liofilización el material híbrido obtenido en la etapa anterior.
13. Un proceso según la reivindicación 4 en donde el proceso comprende los  
30 siguientes pasos:
- a) adición en agitación de la lipasa B de la *Cándida antártica* a una solución tampón de fosfato de sodio de 0,1 M, en la que se añade la proteína en una proporción de 0,3 mg por ml de solución tampón,
- b) adición de  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  a la solución obtenida en la etapa anterior a 20-25°C, en el  
35 que se añade el  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en una proporción de 10 mg por ml de solución tampón,

- c) incubación de la solución obtenida en la etapa b) durante 16 h.
- c') adición de borohidruro sódico a su concentración final de 0,12 M,
- d) Recoger, lavar con agua y secar por liofilización el material híbrido obtenido en la etapa anterior.

5

14. Un proceso según la reivindicación 4 en donde el proceso comprende los siguientes pasos:

- a) adición en agitación de la lipasa B de la *Cándida antártica* a una solución tampón de bicarbonato de sodio 0,1 M, en la que se añade la proteína en una proporción de 0,6 mg por ml de solución tampón,
- b) adición de  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  a la solución obtenida en la etapa anterior a 20-25°C, en el que se añade el  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en una proporción de 10 mg por ml de solución tampón,
- c) incubación de la solución obtenida en la etapa b) durante 16 h.
- c') adición de borohidruro sódico a su concentración final de 0,12 M,
- d) Recoger, lavar con agua y secar por liofilización el material híbrido obtenido en la etapa anterior.

15

15. Un proceso según la reivindicación 4 en donde el proceso comprende los siguientes pasos:

- a) adición en agitación de la lipasa B de la *Cándida antártica* a una solución tampón de fosfato de sodio de 0,1 M, en la que se añade la proteína en una proporción de 0,6 mg por ml de solución tampón,
- b) adición de  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  a la solución obtenida en la etapa anterior a 20-25°C, en el que se añade el  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en una proporción de 10 mg por ml de solución tampón,
- c) incubación de la solución obtenida en la etapa b) durante 16 h.
- c') adición de borohidruro sódico a su concentración final de 0,12 M,
- d) Recoger, lavar con agua y secar por liofilización el material híbrido obtenido en la etapa anterior.

25

16. Un proceso según la reivindicación 4 en donde el proceso comprende los siguientes pasos:

- a) adición en agitación de la lipasa B de la *Cándida antártica* a una solución tampón de fosfato de sodio de 0,1 M, en la que se añade la proteína en una proporción de 0,3 mg por ml de solución tampón,
- b) adición de  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  a la solución obtenida en la etapa anterior a 20-25°C, en el

35

que se añade el  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en una proporción de 10 mg por ml de solución tampón,  
c) incubación de la solución obtenida en la etapa b) durante 16 h.  
d) Recoger, lavar con agua y secar por liofilización el material híbrido obtenido en la  
etapa anterior.

5

17. Un proceso según la reivindicación 4 en donde el proceso comprende los siguientes pasos:

a) adición en agitación de la lipasa B de la *Cándida antártica* a una solución tampón de fosfato de sodio de 0,1 M, en la que se añade la proteína en una proporción de 0,3 mg por ml de solución tampón,

10

b) adición de  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  a la solución obtenida en la etapa anterior a 20-25°C, en el que se añade el  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en una proporción de 10 mg por ml de solución tampón,

c) incubación de la solución obtenida en la etapa b) durante 16 h.

c') adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a su concentración final de 0,1 M,

15

d) Recoger, lavar con agua y secar por liofilización el material híbrido obtenido en la etapa anterior.

18. Un proceso según la reivindicación 4 en donde el proceso comprende los siguientes pasos:

a) adición, agitando la lipasa B de la *Cándida antártica*, a una solución tampón de fosfato de sodio de 0,1 M, en la que se añade la proteína en una proporción de 0,3 mg por ml de solución tampón,

20

b) adición de  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  a la solución obtenida en la etapa anterior a 20-25°C, en el que se añade el  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en una proporción de 10 mg por ml de solución tampón,

25

c) incubación de la solución obtenida en la etapa b) durante 16 h.

c') adición de NaOH a una concentración final de 0,5 M,

d) Recoger, lavar con agua y secar por liofilización el material híbrido obtenido en la etapa anterior.

19. Un proceso según la reivindicación 4 en donde el proceso comprende los siguientes pasos:

30

a) adición, agitando la lipasa B de la *Cándida antártica*, a una solución tampón de fosfato de sodio de 0,1 M, en la que se añade la proteína en una proporción de 0,3 mg por ml de solución tampón,

35

b) adición del  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  a la solución obtenida en la etapa anterior a 20-25°C, en

el que se añade el  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en una proporción de 10 mg por ml de solución tampón,

c) incubación de la solución obtenida en la etapa b) durante 16 h.

c') adición de borohidruro sódico a su concentración final de 0,012 M,

5 d) Recoger, lavar con agua y secar por liofilización el material híbrido obtenido en la etapa anterior.

20. Un proceso según la reivindicación 4 en donde el proceso comprende los siguientes pasos:

10 a) adición en agitación de la lipasa B de la *Cándida antártica* a una solución tampón de fosfato de sodio de 0,1 M (pH 7), en la que se añade la proteína en una proporción de 3 mg por ml de solución tampón,

b) adición de  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  a la solución obtenida en la etapa anterior a 20-25°C, en el que se añade el  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en una proporción de 10 mg por ml de solución tampón,

15 c) incubación de la solución obtenida en la etapa b) durante 3 días.

c') la adición opcional de borohidruro sódico a una concentración final de 0,12 M,

d) Recoger, lavar con agua y secar por liofilización el material híbrido obtenido en la etapa anterior.

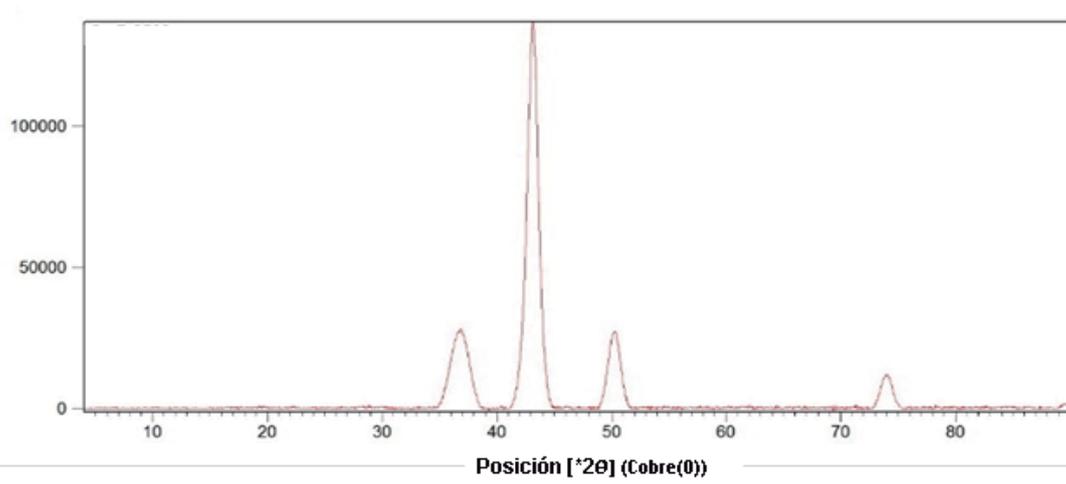
20 21. Uso del material descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1-3 como catalizador.

22. Uso según la reivindicación 21 para degradar Bisfenol-A.

25 23. Uso según la reivindicación 21 para la reducción de 4-nitrofenol a 4-aminofenol.

24. Uso según la reivindicación 21 para la degradación del  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

A



B

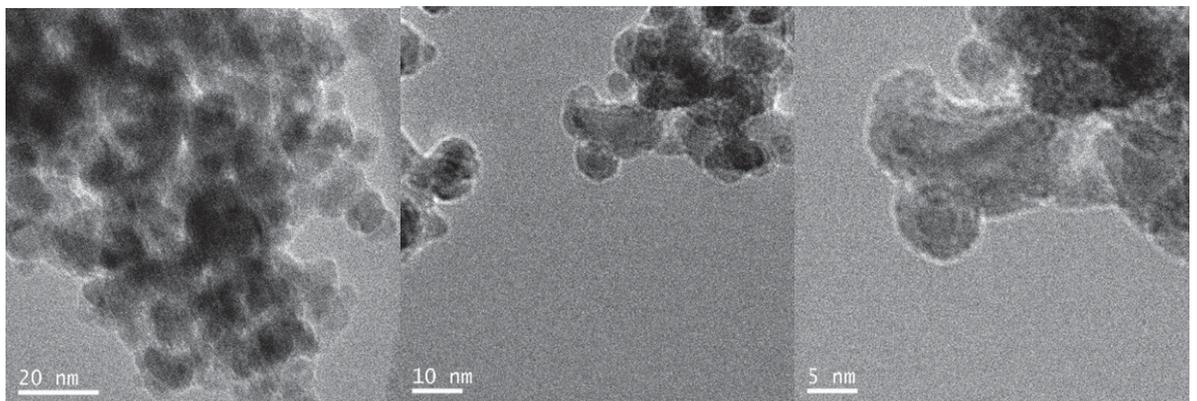
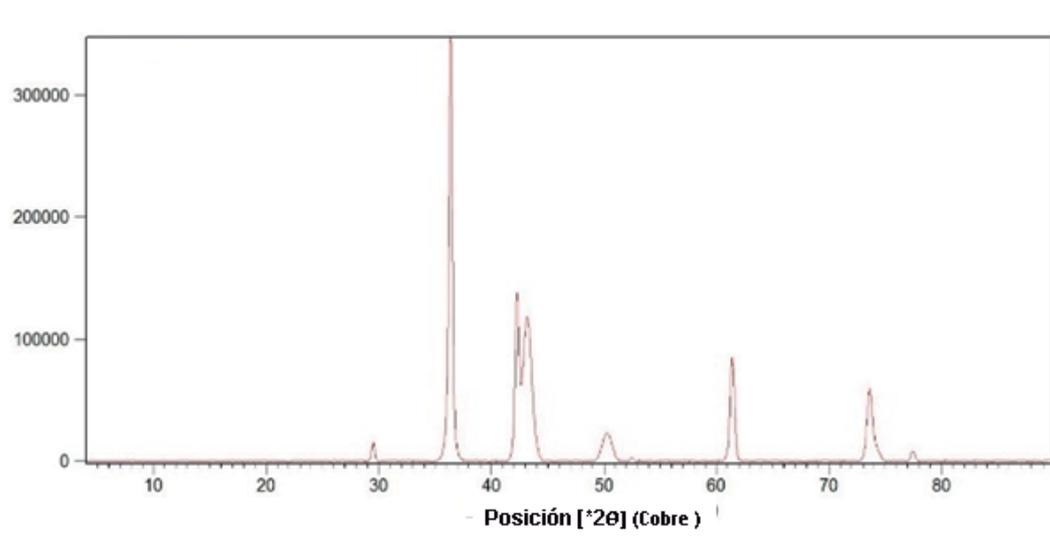


FIG. 1

A



B

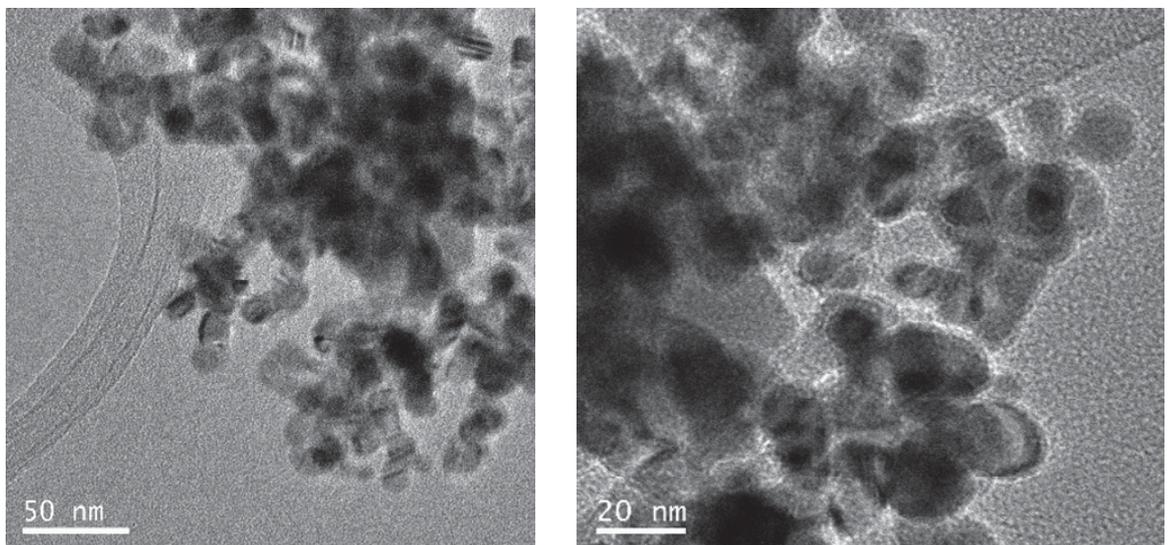


FIG. 2

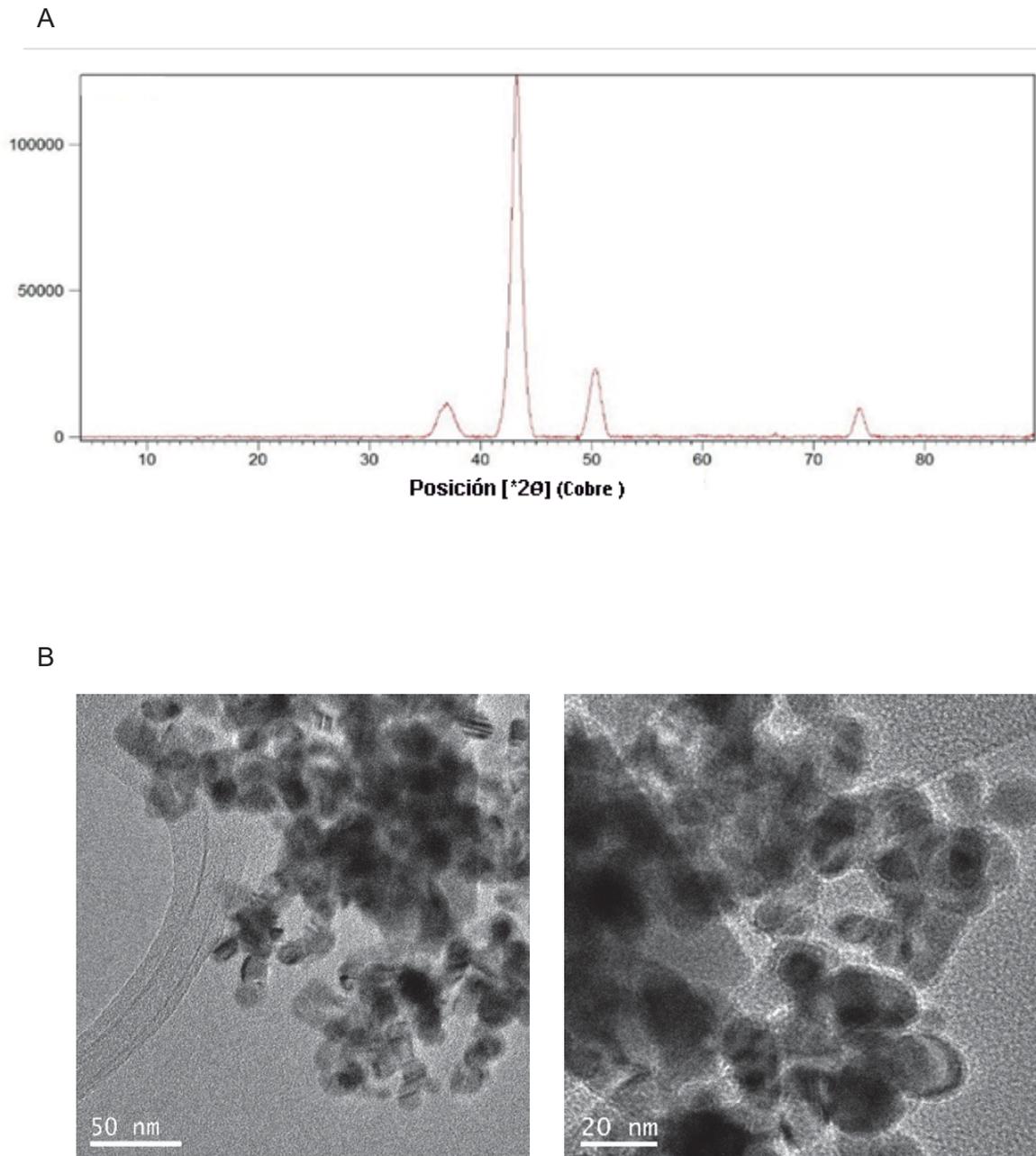
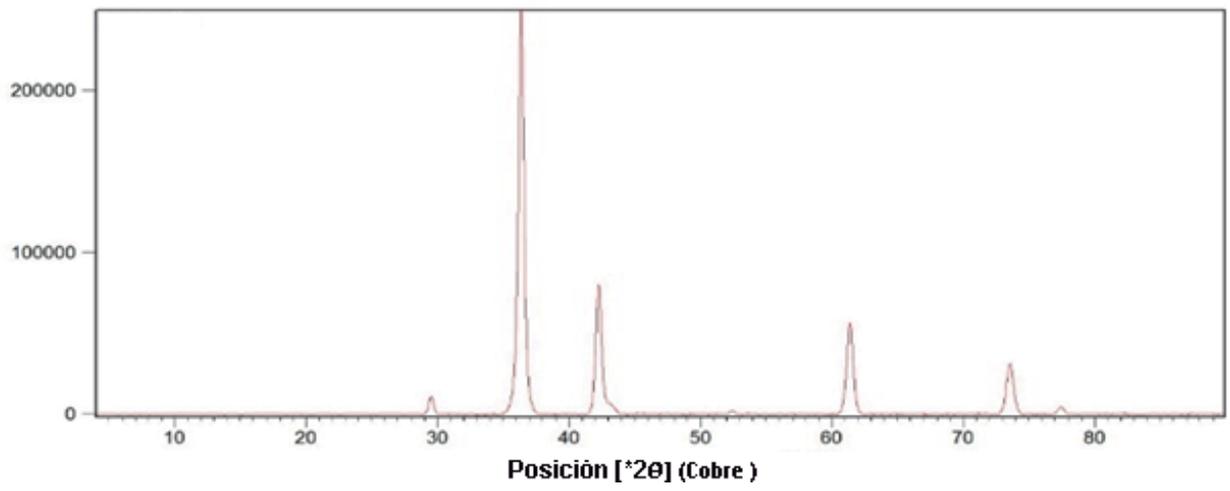


FIG. 3

A



B

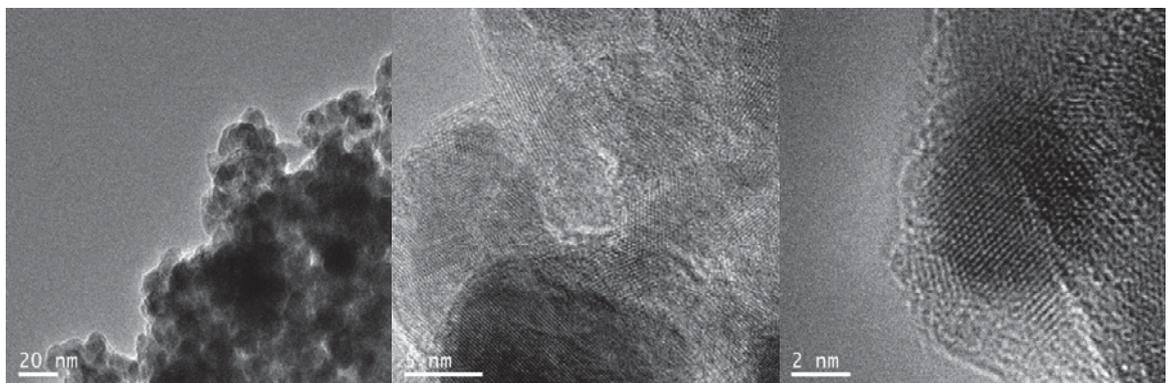
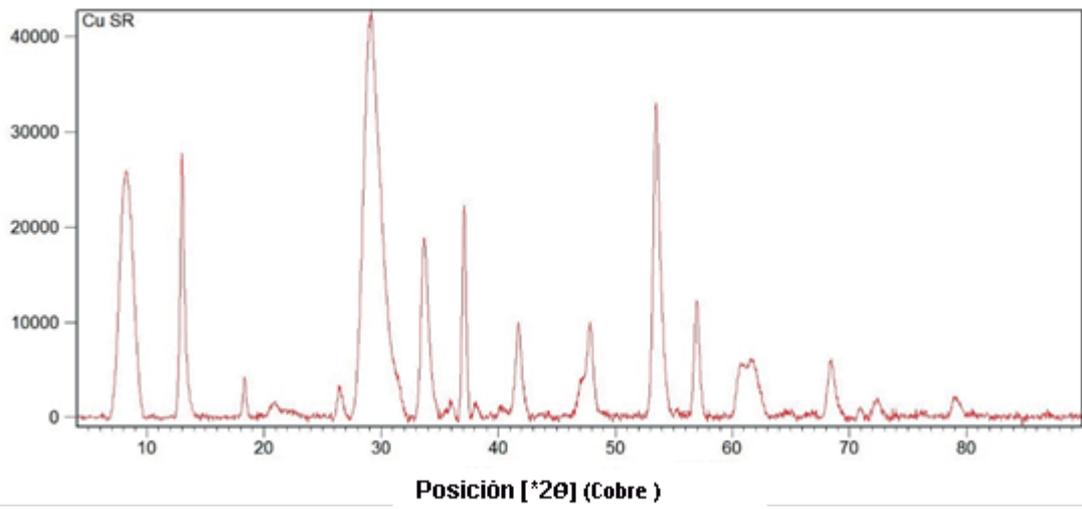


FIG. 4

A



B

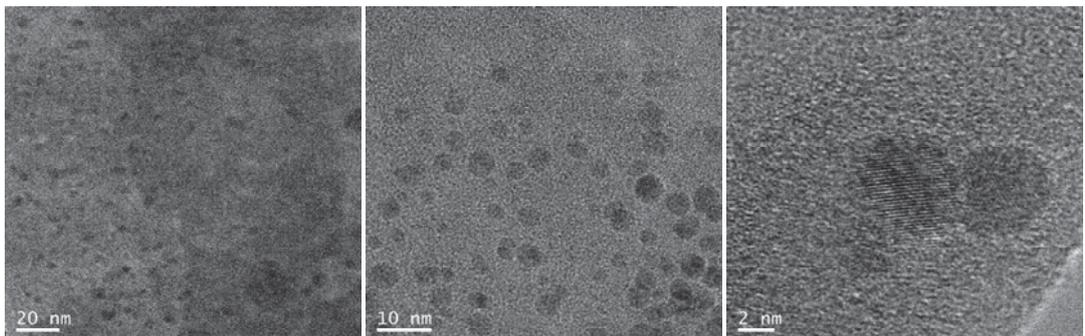
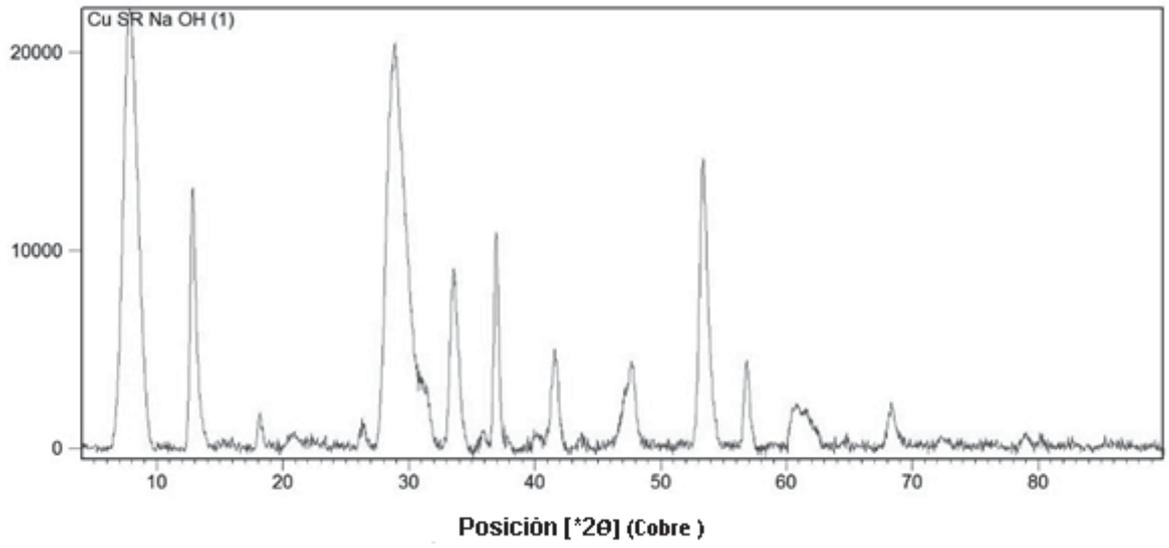
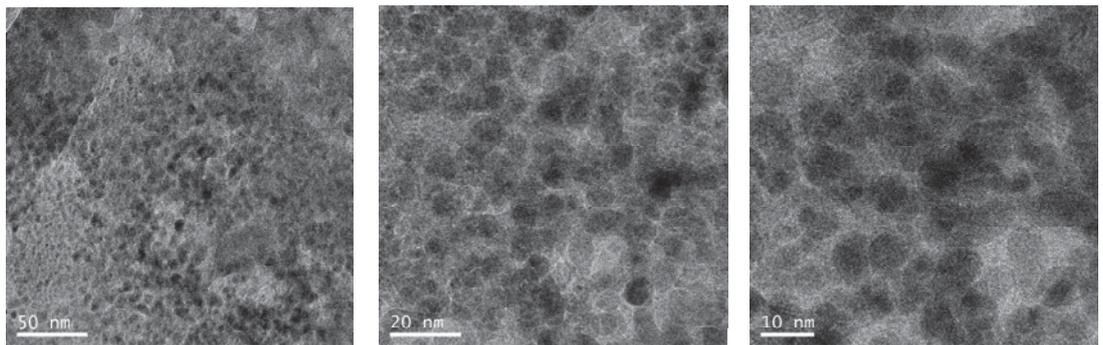


FIG. 5

A



B



C

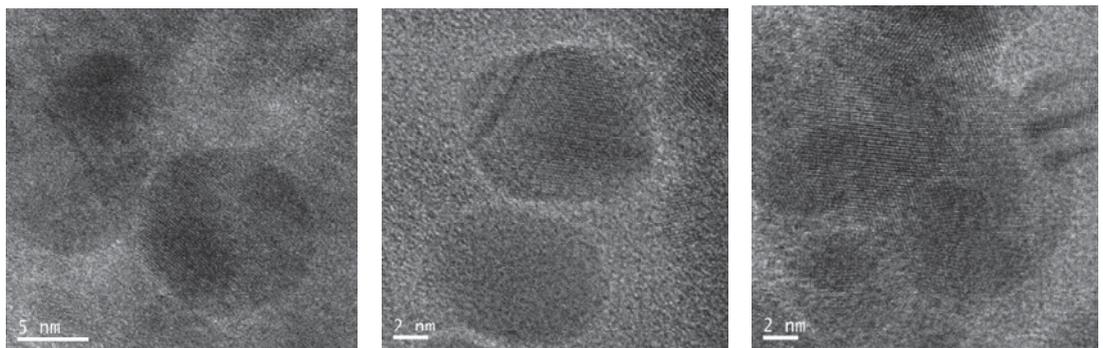
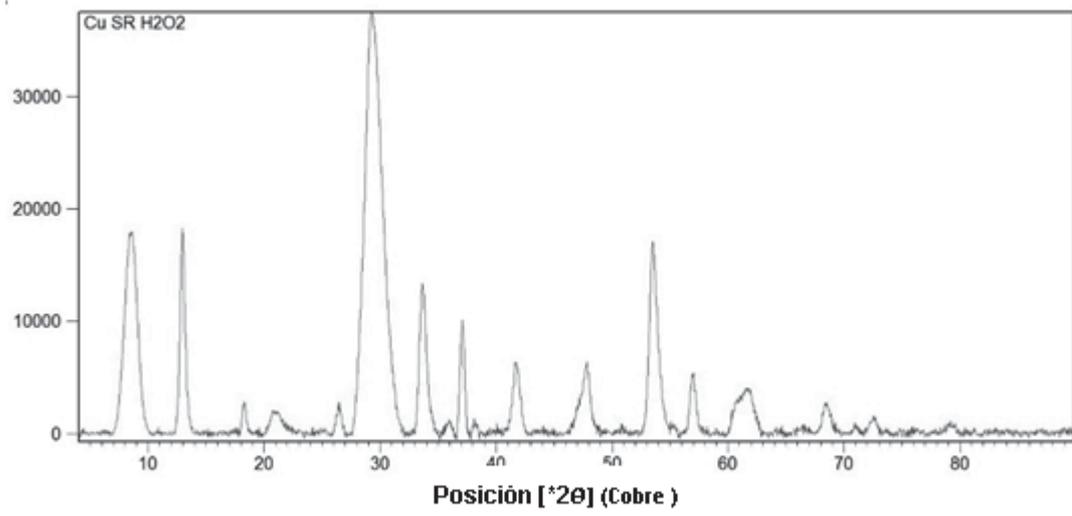
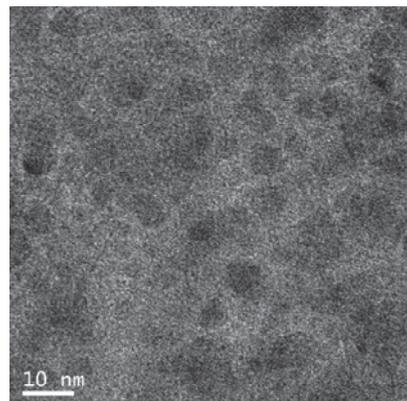
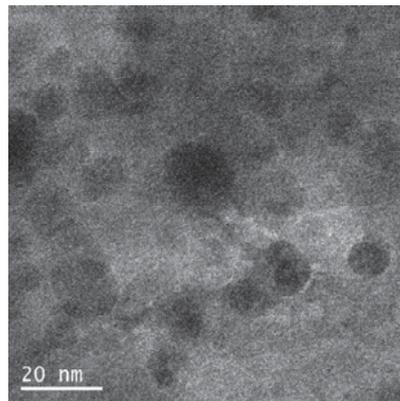


FIG. 6

A



B



C

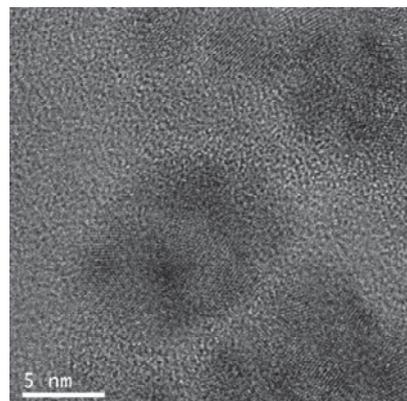
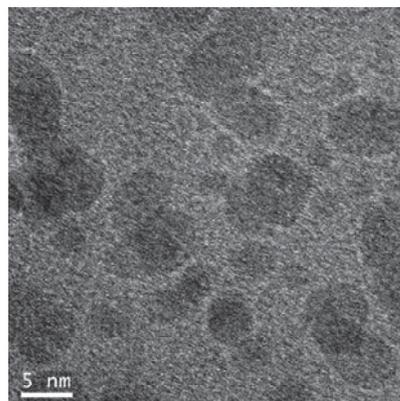
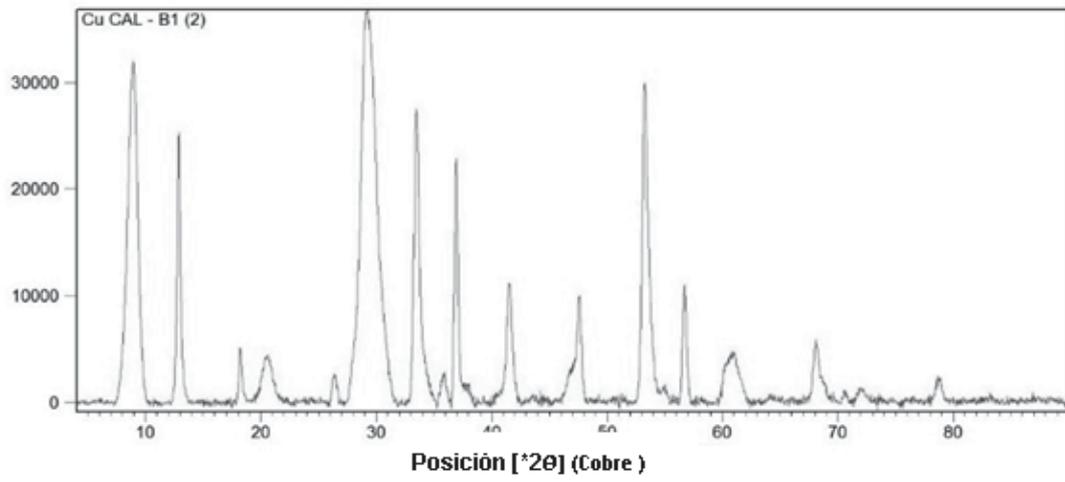


FIG. 7

A



B

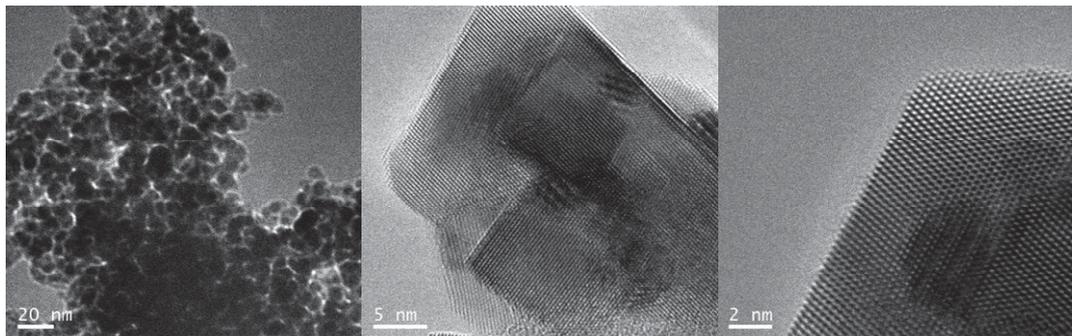


FIG. 8

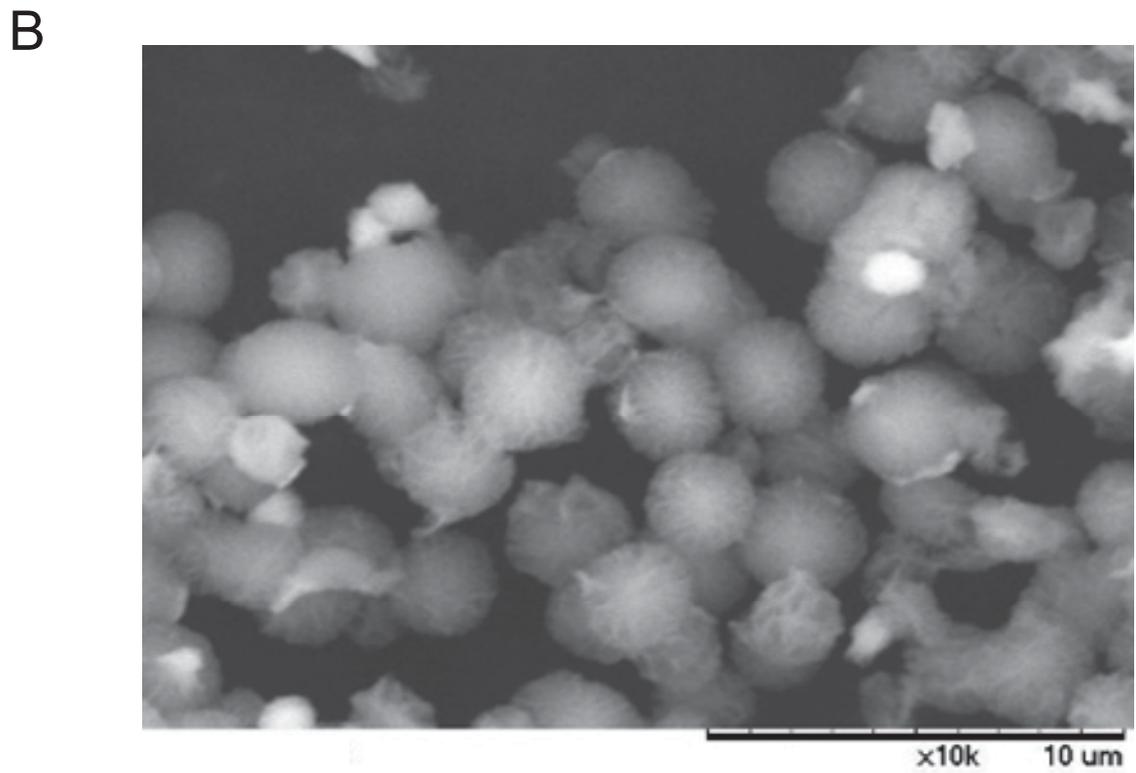
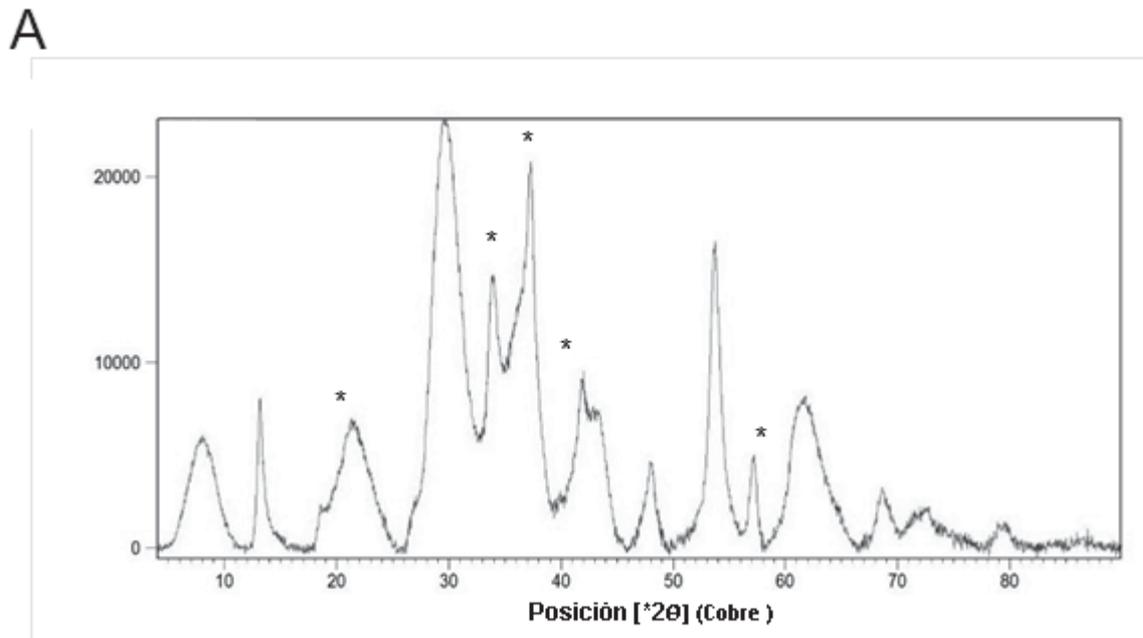
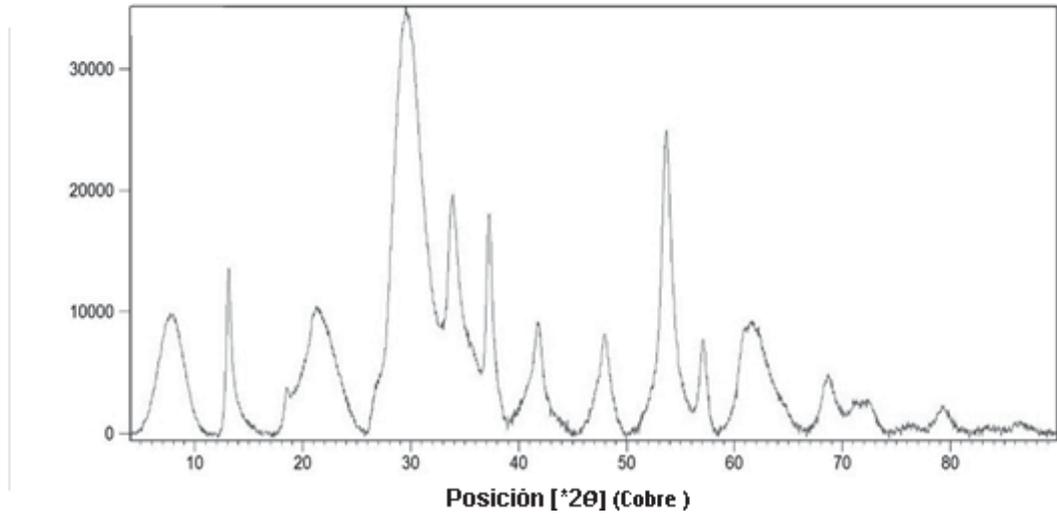


FIG. 9

A



B

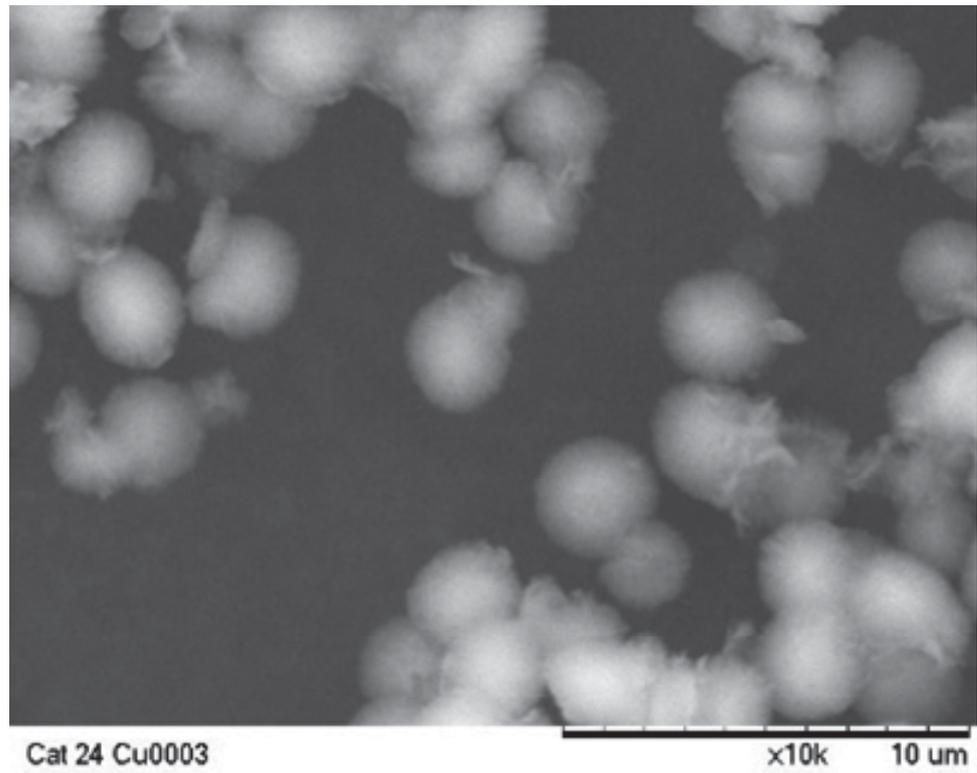


FIG. 10

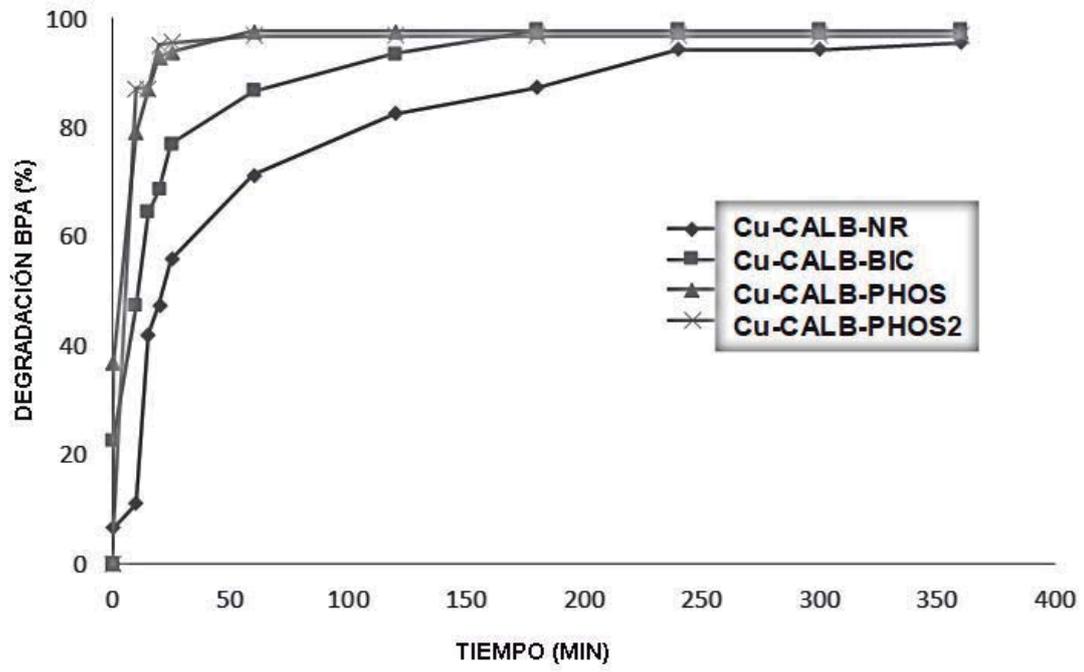


FIG. 11

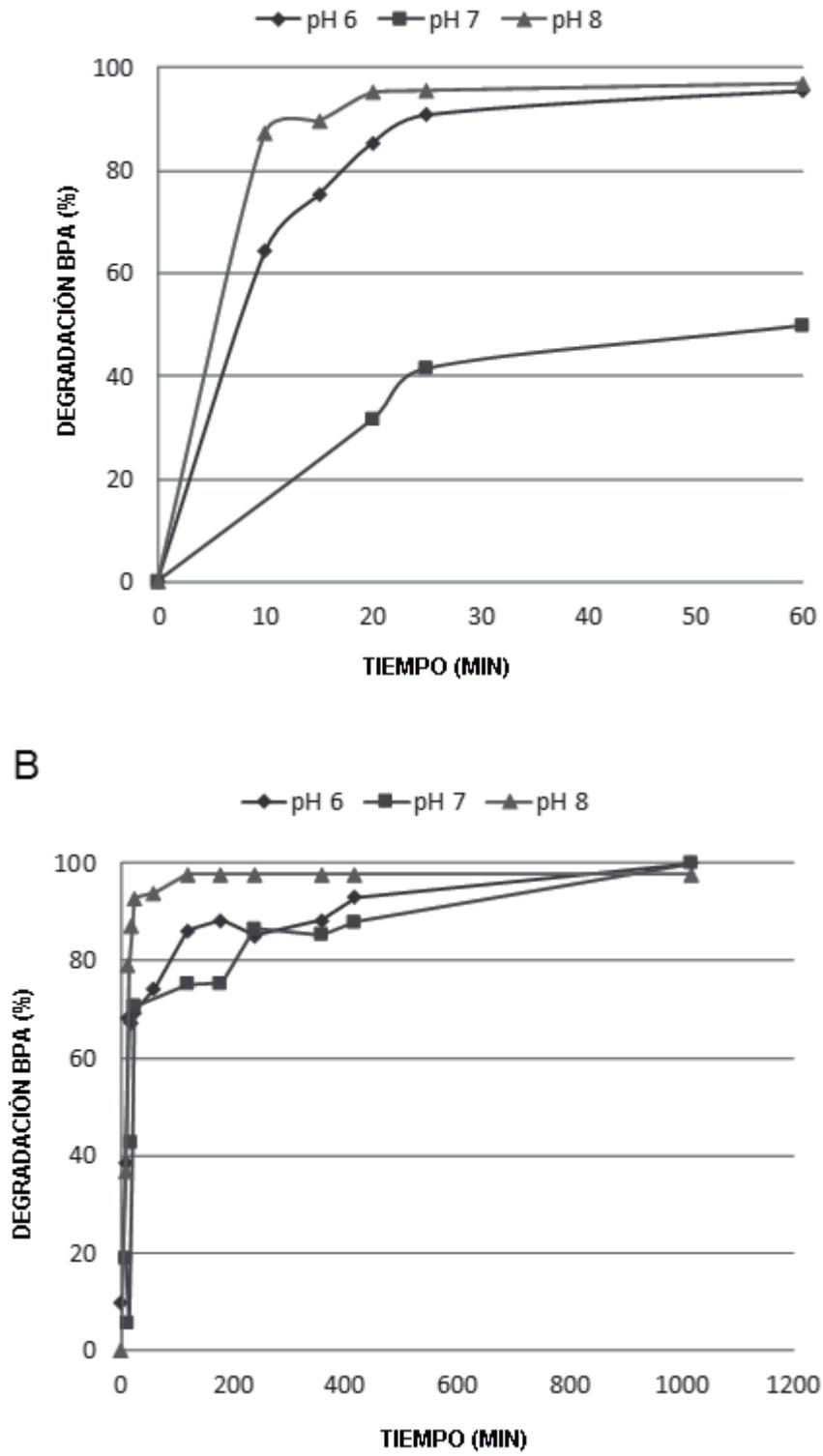


FIG. 12

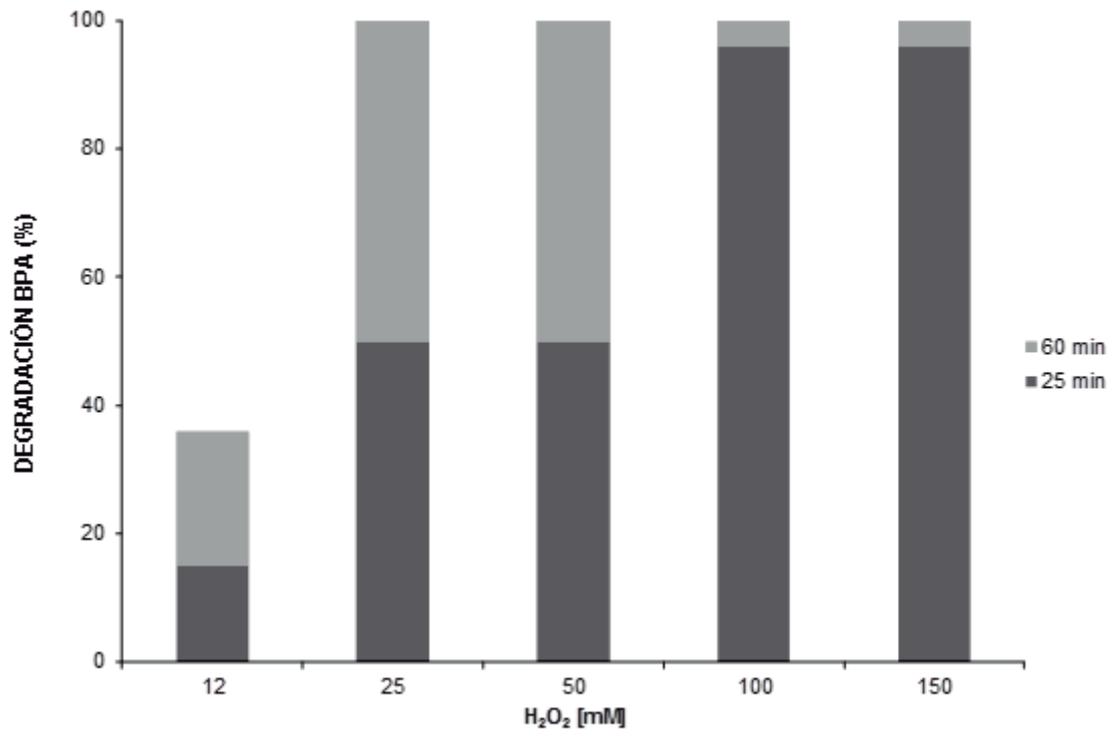


FIG. 13

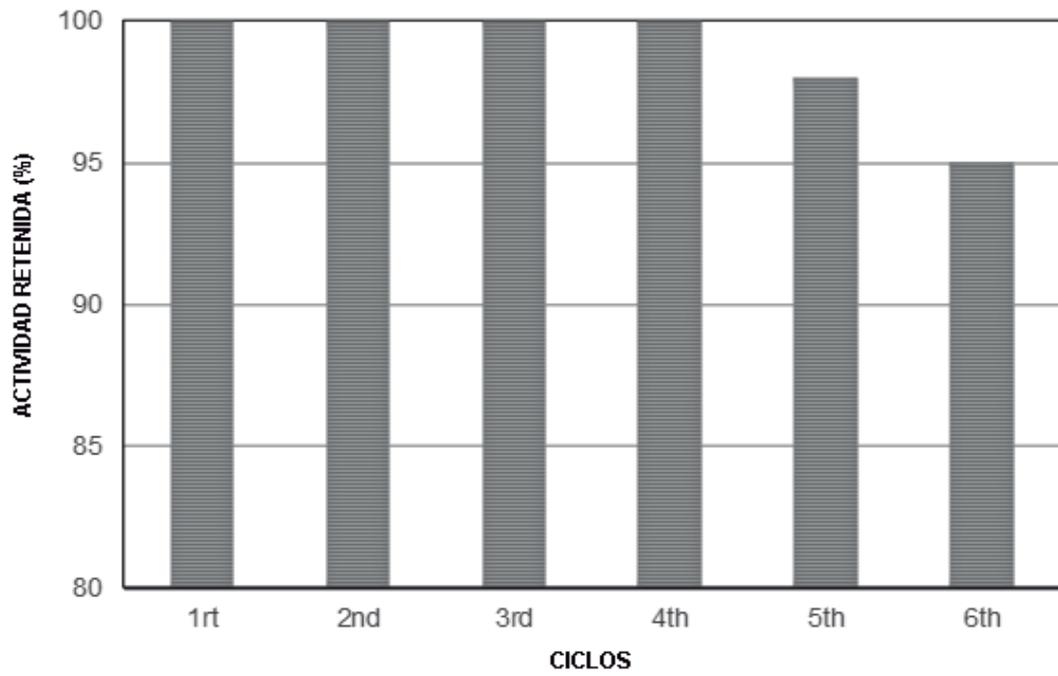


FIG. 14

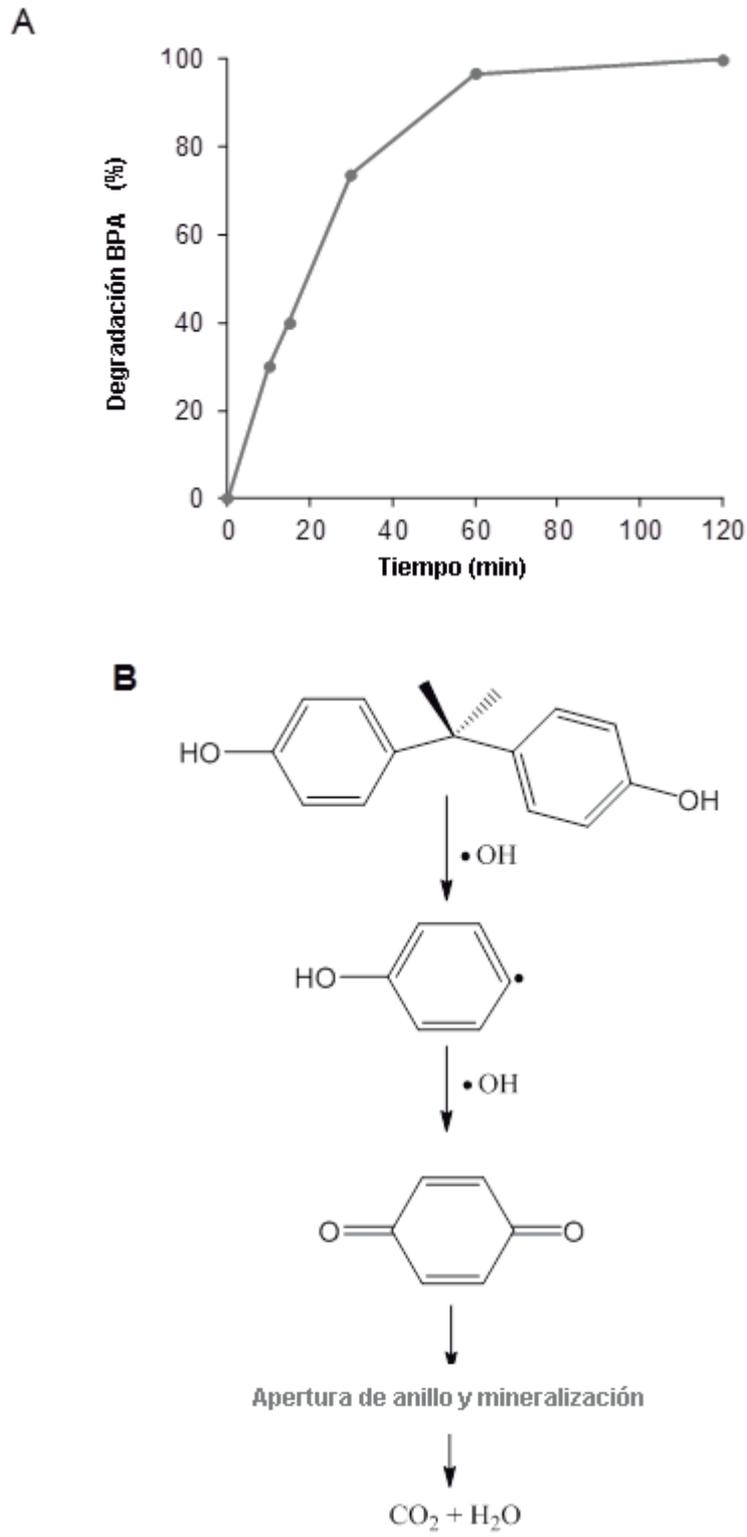


FIG. 15

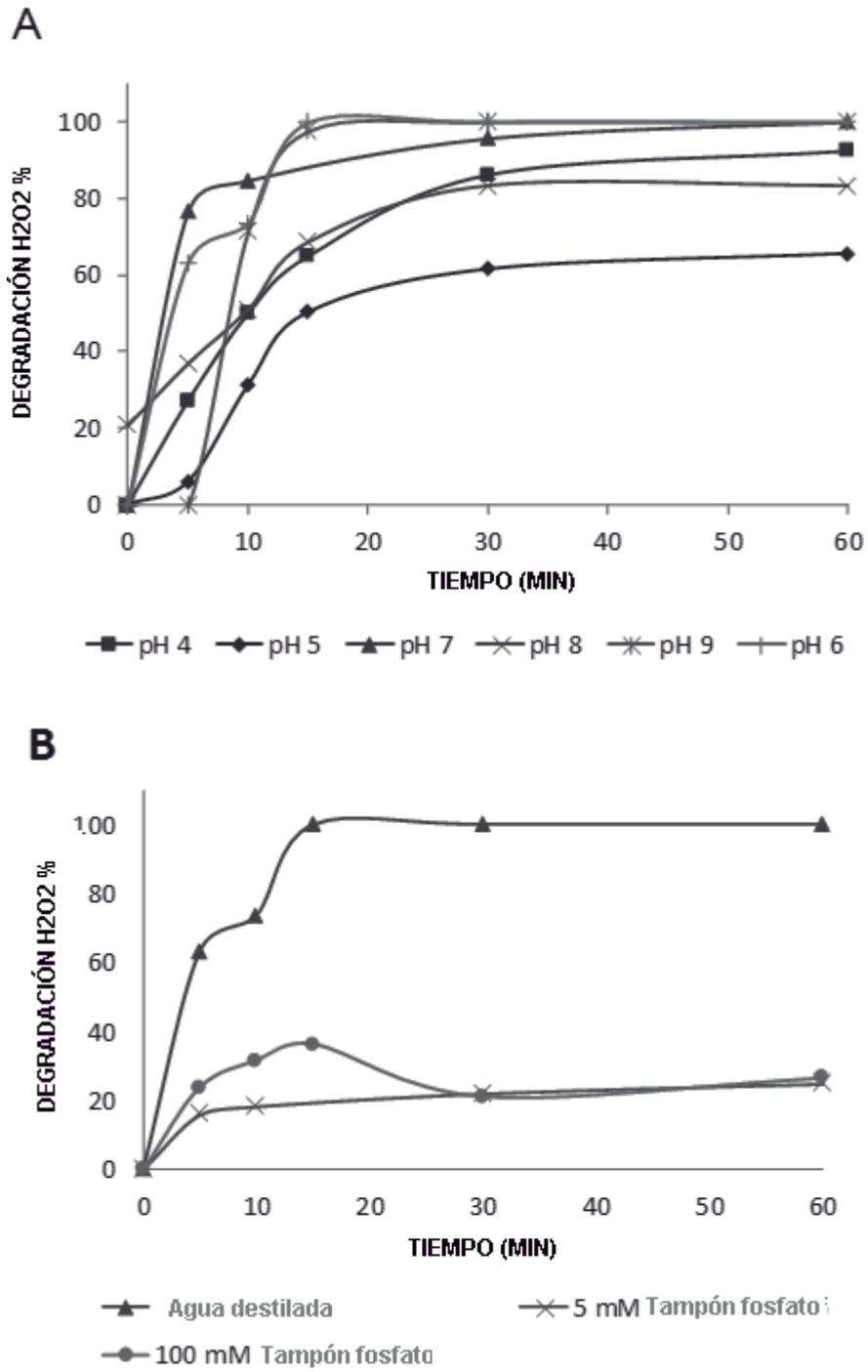


FIG. 16

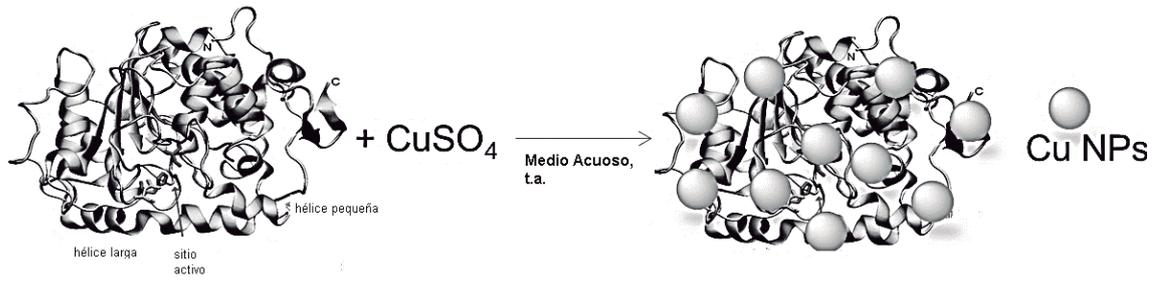


FIG. 17