

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología**

**Diseño de nanopartículas de quitosano con actividad
peroxidasa para la degradación de contaminantes**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Dulce Anahí Alarcón Payán

Ensenada, Baja California, México
2017

Tesis defendida por
Dulce Anahí Alarcón Payán

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Director de tesis

Dra. Ernestina Castro Longoria

Dr. Ernesto García Mendoza



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Dulce Anahí Alarcón Payán** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología.

Diseño de nanopartículas de quitosano con actividad peroxidasa para la degradación de contaminantes

Resumen aprobado por:

Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Director de tesis

Las actividades antropogénicas actuales, tanto por parte de la industria, como de la agricultura y de los hogares, han causado que la cantidad de contaminantes en el medio ambiente se eleve a niveles alarmantes. Los métodos de remediación de contaminantes convencionales tienen varias limitantes, como son, el costo, la baja eficiencia y la dificultad para ser usados *in situ*. La biorremediación ha surgido como una alternativa a estos métodos. Las metodologías basadas en sistemas biológicos tienen la cualidad de ser de bajo costo, y ambientalmente amigables. Específicamente, el uso de enzimas de hongos degradadores de lignina ha sido de interés, ya que se ha observado que estas proteínas son capaces de degradar una amplia variedad de contaminantes como fenoles halogenados, hidrocarburos aromáticos policíclicos, pesticidas y colorantes. Sin embargo, debido a la labilidad que poseen las enzimas se han buscado vías de estabilización, siendo la inmovilización una de las técnicas más exploradas. Dentro de la gran cantidad de materiales disponibles para inmovilización, las nanopartículas (NPs) de quitosano son una alternativa atractiva, debido a sus propiedades; tales como, biodegradabilidad, baja toxicidad, y gran área superficial. Aprovechando estas características, en el presente trabajo se diseñaron y sintetizaron NPs de quitosano semiesféricas con un diámetro promedio de 125 nm. Estas NPs con actividad peroxidasa son capaces de degradar una amplia variedad de contaminantes. Los compuestos degradados con mayor efectividad fueron 2,6-dimetoxifenol, 2,3,5,6-tetraclorofenol y negro ácido 194. Además, se evaluó la estabilidad de las NPs biocatalíticas ante la degradación microbiana bajo condiciones reales de tratamiento de aguas residuales. Incluso, esta estabilidad fue mejorada hasta por 72 horas al modificar la superficie de las NPs químicamente con cuatro distintos aldehídos, siendo las modificaciones con formaldehído y antraldehído las que presentaron una mejor estabilidad.

Palabras clave: nanopartículas, quitosano, peroxidasa versátil, biorremediación

Abstract of the thesis presented by **Dulce Anahí Alarcón Payán** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Microbiology.

Design of chitosan nanoparticles with peroxidase activity for the degradation of pollutants

Abstract approved by:

Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Thesis Director

The current anthropogenic activities from industry, agriculture and households, are the origin of an increase in the level of pollutants in the environment. Conventional methods of remediation show several limitations, such high costs, low efficiency and *in situ* applicability. Bioremediation is an alternative to the actual methods. Remediation techniques based on biological systems are inexpensive and eco-friendly. Specifically, the use of lignin degrading enzymes from white-rot fungi, have shown the ability to degrade a broad range of pollutants including chlorinated phenols, polycyclic aromatic hydrocarbons, pesticides and dyes. Nevertheless, due to the enzymes instability, several methods to stabilize them have been explored. Among these methods, the enzyme immobilization has shown good results. Chitosan nanoparticles (NPs) are an attractive alternative, due to their properties, such as biodegradability, low toxicity, and large surface area. Taking advantage of these characteristics, in this work 125 nm semispherical chitosan NPs with peroxidase activity able to degrade a wide range of pollutants were designed and synthesized. 2,6-dimethoxyphenol, 2,3,5,6-tetrachlorophenol and acid black 194 were the more effectively degraded pollutants. Furthermore, the stability of the NPs towards microbial degradation was evaluated in real operation conditions of wastewaters and their stability was enhanced up to 72 hours by chemically modifying their surface with four different aldehydes. The modifications with formaldehyde and anthraldehyde showed better stability.

Keywords: nanoparticles, chitosan, versatile peroxidase, bioremediation

Dedicatoria

A mis padres, quienes desde el inicio me han apoyado incondicionalmente.

Agradecimientos

Primeramente agradezco a CONACyT por los financiamientos otorgados para la beca de maestría (beca 396813) y para los proyectos IFC 2015-1 y CB-251241. A CICESE por permitirme formar parte de esta honorable institución.

A mi director de tesis el Dr. Rafael Vázquez, por integrarme a su grupo de trabajo y confiarme este proyecto. Por su valioso tiempo, sus enseñanzas y su dedicación durante este arduo proceso.

A los miembros del comité la Dra. Ernestina Castro y el Dr. Ernesto García por su interés, críticas y sugerencias a mi proyecto, lo que me ha ayudado a producir un trabajo de mayor calidad.

A la Dra. Rina Koyani por no solamente transmitirme su conocimiento científico sino también por brindarme su sincera amistad.

Agradezco además a los doctores del departamento de microbiología, quienes han propiciado mi crecimiento académico durante estos dos años.

A los miembros del departamento de bionanotecnología del CNyN por enriquecer mi trabajo en cada presentación. A la Dra. Katrin Quester por su asistencia técnica y su disposición. Agradezco a CNyN UNAM por proporcionarme el espacio y las herramientas necesarias para llevar a cabo este proyecto. Al Sr. Francisco Ruiz por su apoyo técnico con el TEM.

Agradezco a mis amigos en especial a Briceida, Lupita, Paulina, Héctor, Ivan, Aimeé y Leonardo, quienes con su compañía han hecho esta experiencia más amena.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	x
 Capítulo 1. Introducción.....	 1
1.1 Actividades humanas y contaminación.....	1
1.1.1 Tipos de contaminantes.....	1
1.1.1.1 Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs).....	2
1.1.1.2 Compuestos fenólicos.....	3
1.1.1.3 Compuestos organofosforados.....	3
1.1.1.4 Colorantes.....	4
 Capítulo 2. Antecedentes.....	 5
2.1 Remediación.....	5
2.1.1 Procesos fisicoquímicos de remediación.....	5
2.1.2 Biorremediación.....	6
2.1.2.1 Biorremediación enzimática.....	7
2.2 Peroxidasa versátil.....	8
2.2.1 Estructura molecular y ciclo catalítico.....	9
2.3 Inmovilización de enzimas.....	12
2.4 Nanotecnología.....	14
2.4.1 Nanobiocatálisis.....	14
2.5 Quitosano.....	15
2.5.1 Nanopartículas de quitosano.....	15
2.5.1.1 Inmovilización de enzimas en nanopartículas de quitosano.....	16
2.5.1.2 Nanopartículas de quitosano entrecruzadas con glutaraldehído.....	17
2.5.1.3 Biodegradabilidad de enzimas inmovilizadas en nanopartículas de quitosano.....	17

Capítulo 3. Justificación.....	19
Capítulo 4. Hipótesis.....	20
Capítulo 5. Objetivos.....	21
5.1 Objetivo general.....	21
5.2 Objetivos específicos.....	21
Capítulo 6. Materiales y Metodología.....	22
6.1 Reactivos y enzima.....	22
6.2 Síntesis de las nanopartículas.....	22
6.2.1 Variación del porcentaje de glutaraldehído.....	23
6.3 Caracterización estructural de las nanopartículas.....	23
6.4 Medición de la actividad enzimática.....	23
6.5 Eficiencia de inmovilización.....	24
6.6 Perfil de pH.....	24
6.7 Perfil de temperatura.....	24
6.8 Termoestabilidad.....	25
6.9 Transformación de contaminantes.....	25
6.9.1 Pesticidas.....	25
6.9.2 Colorantes.....	25
6.10 Número total de recambio.....	26
6.11 Degradación microbiana.....	26
6.12 Degradación por proteasas.....	27
6.13 Modificación química de las nanopartículas.....	27
6.13.1 Evaluación de la estabilidad ante degradación microbiana.....	27
Capítulo 7. Resultados.....	29
7.1 Estabilización de las nanopartículas.....	29
7.2 Caracterización de las nanopartículas.....	31
7.3 Perfil de pH.....	31
7.4 Perfil de temperatura.....	32
7.5 Termoestabilidad.....	33

7.6 Constantes catalíticas.....	33
7.7 Transformación de contaminantes.....	34
7.8 Número total de recambio.....	35
7.9 Degradación microbiana.....	36
7.10 Degradación por proteasas.....	37
7.11 Modificación química de las nanopartículas.....	37
Capítulo 8. Discusión.....	40
8.1 Síntesis de nanopartículas de quitosano.....	40
8.2 Efecto de la concentración de glutaraldehído.....	41
8.3 Caracterización de las nanopartículas.....	41
8.4 Eficiencia de inmovilización.....	42
8.5 Efecto del pH sobre la actividad enzimática.....	42
8.6 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.....	43
8.7 Parámetros cinéticos.....	43
8.8 Transformación de diversos contaminantes.....	44
8.9 Estabilidad ante la degradación microbiana.....	45
8.10 Estabilidad ante la degradación por proteasas.....	45
Capítulo 9. Conclusiones.....	47
Literatura Citada.....	48
Anexos.....	53
Anexo 1.....	53
Anexo 2.....	54

Lista de figuras

Figura		Página
1	Estructura cristalográfica de la peroxidasa versátil de <i>Pleorotus eryngii</i> (PDB 2BOQ).....	10
2	Vista axial de la región hemo de la VP.....	11
3	Ciclo catalítico de la VP.....	12
4	Actividad relativa de nanopartículas variando la cantidad de glutaraldehído adicionado durante la síntesis.....	30
5	Variación de la actividad enzimática respecto al tiempo de nanopartículas sintetizadas con distintos porcentajes de glutaraldehído.....	30
6	Micrografía TEM de nanopartículas con enzima inmovilizada.....	31
7	Evaluación de la actividad de la enzima libre y de las nanopartículas a distintos pH.....	32
8	Evaluación de la actividad de enzimática de la enzima libre y de las nanopartículas a distintas temperaturas.....	32
9	Actividad relativa de la enzima libre y de las nanopartículas después de ser incubadas a distintas temperaturas y tiempos.....	33
10	Actividad relativa de la enzima libre y de las nanopartículas después de ser incubadas con aguas residuales.....	36
11	Actividad relativa de la enzima libre y de las nanopartículas después de ser incubadas con la proteasa papaína.....	37
12	Esquema de la modificación química de la superficie de las nanopartículas de quitosano conteniendo la peroxidasa versátil.....	38
13	Actividad relativa tanto de la enzima libre, las nanopartículas sin modificar y las nanopartículas modificadas con antraldehído y benzaldehído.....	38
14	Actividad relativa de la enzima libre, las nanopartículas sin modificar y las nanopartículas modificadas con formaldehído y naftaldehído.....	39
15	Esquema de las nanopartículas de quitosano sintetizadas por el método de gelificación iónica.....	40

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Constantes catalíticas de la enzima libre y de las nanopartículas usando 2,6-dimetoxifenol como sustrato.....	34
2	Actividades específicas de la enzima libre y de las nanopartículas, en la oxidación de los diversos contaminantes elegidos.....	35
3	Número total de recambio utilizando azul brillante de Remazol R.....	36

Capítulo 1. Introducción

1.1 Actividades humanas y contaminación

La contaminación es uno de los problemas más graves a nivel mundial, que afecta tanto a seres humanos, plantas y animales. Cada año, millones de personas se ven perjudicadas por la contaminación, causándoles diversos padecimientos y hasta la muerte. Además, se estima que debido a la contaminación, más de 1 millón de aves marinas y miles de mamíferos marinos mueren anualmente. El rápido aumento en la población, la industrialización, la urbanización y en general las actividades antropogénicas es la principal causa del dramático incremento de contaminantes en el ambiente. Se estima que diariamente utilizamos más de 60,000 químicos en forma de combustibles, productos de consumo, colorantes, solventes industriales, fármacos, pesticidas, fertilizantes y aditivos en alimentos (Das, 2014). Tan sólo en los Estados Unidos, cada año se producen casi 4 mil millones de toneladas de contaminantes químicos peligrosos y solamente el 10 % de éstos se disponen de forma segura (Qayyum et al., 2009).

Gran parte de los contaminantes pueden viajar fácilmente de un sitio a otro a través de la tierra, agua y aire, llegando a lugares en los cuales tanto plantas, animales y humanos, pueden absorberlos o ingerirlos en el agua o alimento. Una vez en el organismo, éstos pueden acumularse en los tejidos y alcanzar concentraciones mucho más altas que en el medio circundante (biomagnificación). Asimismo, muchas de estas sustancias son altamente tóxicas, recalcitrantes, o pueden transformarse en químicos aún más tóxicos (Das, 2014; Husain y Ulber, 2011). Los químicos de mayor preocupación ambiental son aquellos capaces de permanecer en el ambiente largos periodos de tiempo y bioacumularse, los disruptores endocrinos que pueden interferir con el sistema hormonal de los seres vivos y los compuestos capaces de causar cáncer o llegar a dañar el ADN (WWF, 2015).

1.1.1 Tipos de contaminantes

Actualmente, la gran mayoría de los ríos, lagos, océanos, suelos y sedimentos del mundo se encuentran contaminados. Incluso se han encontrado pesticidas y otros químicos en hielo de la Antártica (Das, 2014). Muchos de estos contaminantes fueron liberados hace muchos años, mientras que otros llegan a estos sitios diariamente; los contaminantes más comunes son:

- Nutrientes
- Orgánicos macroparticulados
- Orgánicos persistentes
- Metales pesados

Los nutrientes están conformados por compuestos fosforados o nitrogenados. La principal fuente de nutrientes son los fertilizantes; estas sustancias tienen la habilidad de alterar los niveles de nutrientes de océanos y ríos promoviendo florecimientos algales nocivos. Como resultado los niveles de oxígeno en el agua disminuyen, causando la muerte de la vida acuática. Por otro lado, altas concentraciones de amoníaco pueden ser tóxicas para organismos bentónicos (WWF, 2015; EPA, 2012). Los contaminantes orgánicos macroparticulados son una clase de lípidos que incluyen aceites y grasas. Cuando los aceites o grasas llegan a cuerpos de agua, afectan a peces y otros invertebrados, debido a su toxicidad o debido a que pueden llegar a sofocarlos, causándoles la muerte (EPA, 2012; BTNEP, 2016). Los orgánicos persistentes están conformados por químicos que son altamente resistentes a la degradación, tal como los bifenilos policlorados (BPCs), que en su mayoría son utilizados en pesticidas o los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) que son una clase de químicos que se encuentran en muchos productos derivados del petróleo. Metales como el plomo, zinc, cadmio, cobre, cromo y níquel, son tóxicos para varias plantas y animales, y algunos incluso para humanos. Muchos de estos metales provienen de actividades industriales o se encuentran en varios productos comerciales (EPA, 2012; Fairfax County, 2015). Específicamente, los compuestos orgánicos constituyen la más amplia variedad de contaminantes ambientales. Dentro de éstos, los contaminantes más relevantes para el presente trabajo se describen a continuación.

1.1.1.1 Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos son una clase de compuestos químicos, que constan de dos o más anillos benceno fusionados; ya sea en forma lineal, angular, o en cúmulos (Singh y Tripathi, 2007). Se sabe que existen más de 100 tipos distintos de HAPs y que éstos se encuentran como mezclas complejas. Los HAPs se producen durante la combustión incompleta de combustibles sólidos y líquidos, o como subproducto de procesos industriales. Algunos HAPs se utilizan para la fabricación de colorantes, plásticos, pesticidas e incluso en medicamentos (EPA, 2008). Se ha observado en modelos murinos, que los HAPs tienen fuertes efectos carcinogénicos y mutagénicos. Los HAPs se acumulan también en tejidos

ricos en lípidos de animales marinos expuestos a dichos compuestos (Das, 2014). La alta hidrofobicidad de los HAPs, hace que se adsorban fácilmente a materia orgánica de los suelos y sedimentos, lo que dificulta su degradación (Das, 2014; Qayyum et al., 2009).

1.1.1.2 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son una clase de químicos conformados por lo menos por un anillo aromático unido a por lo menos un grupo funcional hidroxilo (-OH). Éstos, se encuentran en muchas de las aguas residuales industriales, particularmente las provenientes de refinerías y procesadoras de plásticos; y de aguas residuales de zonas con alta urbanización. La gran mayoría son tóxicos y se sabe que muchos compuestos fenólicos son capaces de alterar el sistema endócrino de humanos y animales como es el caso del bisfenol A (BPA). Además, se cree que algunos poseen efectos carcinogénicos (Qayyum et al., 2009; Gasser et al., 2014; Taboada-Puig et al., 2011).

1.1.1.3 Compuestos organofosforados

Como su nombre lo indica, son compuestos orgánicos que contienen en su estructura un átomo de fósforo. En su mayoría, los compuestos organofosforados son ésteres, tioles o amidas derivados de ácidos fosfóricos, fosfónicos, fosfínicos y fosforamídicos. Se utilizan principalmente como pesticidas e insecticidas, fueron introducidos para remplazar a los pesticidas organoclorados ya que poseen menor persistencia en el ambiente y son más efectivos, sin embargo presentan alta toxicidad en humanos. Además, los agentes neurotóxicos usados como armas químicas son también compuestos organofosforados. Entre los plaguicidas más utilizados se encuentran el paratión, metil paratión, malatión y clorpirifos, entre otros (Singh y Walker, 2006; Marrazza, 2014).

1.1.1.4 Colorantes

Entre los químicos presentes en las aguas residuales se encuentran los colorantes industriales. Existe más de 100,000 tipos de colorantes disponibles comercialmente, y la mayoría son utilizados en la industria textil. La estructura química compleja de muchos de estos colorantes los hace resistentes a la degradación por exposición a la luz, agua y químicos. Los colorantes se clasifican en ácidos, básicos, dispersos, azo, diazo, basados en antraquinona, y complejos metálicos. Se ha observado que los colorantes básicos y diazo, son los que presentan mayor toxicidad (Robinson et al., 2001).

Capítulo 2. Antecedentes

2.1 Remediación

Debido a que la degradación de contaminantes ocurre de manera muy lenta bajo condiciones naturales, desde hace varias décadas se han buscado técnicas para su remoción y tratamiento. En primera instancia se han utilizado métodos físicos y químicos, sin embargo, más recientemente se ha extendido el uso de métodos biológicos, que son más eficientes y amigables con el medio ambiente.

2.1.1 Procesos físicoquímicos de remediación

A lo largo del tiempo, se han utilizado una variedad de métodos para tratar suelo y agua contaminados. Dentro de los métodos convencionales de remediación más utilizados se encuentran el lavado de suelos (usualmente, agua combinada con solventes). Este proceso separa las partículas finas que se encuentran contaminadas, de las más grandes. Debido a que los hidrocarburos contaminantes tienden a absorberse a las partículas más finas, al separarlas se reduce el volumen del suelo contaminado. Otras técnicas como la extracción con bombas de vacío, la aireación o la desorción térmica se utilizan para la remoción de compuestos volátiles, sin embargo estos métodos no son efectivos para tratar otros tipos de contaminantes. Igualmente, se utilizan técnicas que evitan la propagación o lixiviación de los contaminantes como la inclusión de suelos contaminados en mezcla de pavimento o la encapsulación utilizando textiles y arcilla. Por otro lado, el tratamiento de aguas subterráneas se enfoca principalmente en tecnologías que extraen el agua contaminada para regresarla después de eliminar los contaminantes (mediante otros procesos), y más recientemente en la instalación de paredes de tratamiento que contienen materiales como zeolitas o carbón activado para atrapar los compuestos tóxicos. De igual manera, en el tratamiento de efluentes contaminados las técnicas más empleadas utilizan oxidantes como peróxido de hidrógeno u ozono en combinación con UV, y sales como el NaClO para degradar una amplia variedad de compuestos. Además, se utilizan ampliamente membranas de filtración y materiales adsorbentes como carbón activado, ceniza, turba, virutas de madera, etc., sin embargo, estos materiales se obstruyen rápidamente, generando así grandes cantidades de desechos. Más recientemente se ha utilizado irradiación, no obstante, este método requiere una alta demanda de oxígeno disuelto el cual es consumido rápidamente. Estos métodos físicos y químicos presentan varias desventajas, principalmente en el tratamiento de contaminantes orgánicos, como altos costos,

eficiencias bajas, la formación de subproductos peligrosos, intervalos de concentraciones muy limitados, además, algunas de estas técnicas son muy invasivas y perturban el medio, o simplemente no son capaces de degradar los contaminantes, sino solamente removerlos. Como consecuencia, en la búsqueda de alternativas más eficientes y menos dañinas para el medio ambiente se ha usado la estimulación de la biodegradación natural induciendo el crecimiento de los microorganismos ya presentes en el sitio, asimismo, se ha propuesto la introducción de microorganismos y plantas capaces de degradar dichos contaminantes (Robinson et al., 2001; Khan et al., 2004; Husain y Ulber, 2011).

2.1.2 Biorremediación

La biorremediación, consiste en la aplicación de procesos biológicos para eliminar químicos tóxicos presentes en el ambiente, o convertirlos en compuestos de menor toxicidad (Karigar & Rao, 2011). Los principales agentes de remediación son las plantas (fitorremediación), los microorganismos y las asociaciones entre éstos. Adicionalmente, en muchas ocasiones la biorremediación se utiliza en conjunto con procesos físicos o químicos para mejorar la fiabilidad y eficacia de la desintoxicación. Tales agentes de biorremediación son efectivos gracias a que sus componentes enzimáticos actúan como fuertes catalizadores que son capaces de modificar la estructura y las propiedades de los contaminantes; o incluso que pueden mineralizarlos completamente a productos inorgánicos inocuos (Gianfreda y Rao, 2004; Alcalde et al., 2006). Es posible clasificar los contaminantes de acuerdo a su grado de biodegradabilidad. Por ejemplo, contaminantes como hidrocarburos simples (1 a 15 carbonos), alcoholes, fenoles, aminas, ácidos, ésteres y amidas son relativamente simples de degradar; mientras que bifenilos policlorados (BPCs), hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y pesticidas se consideran muy difíciles de biodegradar. Para que un contaminante pueda ser biodegradado, debe interactuar con los sistemas enzimáticos de los organismos degradadores. Si un contaminante es soluble, puede entrar a la célula fácilmente, de lo contrario, debe ser transformado en un compuesto soluble. El primer paso de la transformación de compuestos insolubles (como xenobióticos y plásticos) es catalizado por enzimas extracelulares, principalmente oxidorreductasas e hidrolasas, las cuales son liberadas por las células al medio circundante. Estas enzimas transforman los compuestos insolubles a sustancias parcialmente degradadas o productos oxidados que pueden ingresar a las células fácilmente, donde serán transformados por completo. No obstante, se sabe que ciertas oxidorreductasas, también son capaces de oxidar compuestos tóxicos solubles para formar productos insolubles que no puedan ser internalizados por las células (Gianfreda y Rao, 2004).

2.1.2.1 Biorremediación enzimática

La búsqueda de enzimas útiles en remediación se enfoca en la detección de microorganismos capaces de metabolizar contaminantes y posteriormente en identificar a las enzimas responsables. El uso de enzimas en remediación, abre una nueva vía para tratar efluentes contaminados con xenobióticos peligrosos orgánicos; tales como, HAPs, pesticidas, colorantes, polímeros, etc. Las enzimas más estudiadas en remediación, son las mono- o di-oxigenasas, reductasas, dehalogenasas, fosfotriesterasas y citocromo P450 oxigenasas bacterianas; y las lacasas y peroxidasas fúngicas (Alcalde et al., 2006; Husain y Ulber, 2011). Algunas enzimas peroxidasas, como la peroxidasa de rábano blanco, lacasa y tirosinasa se han empleado para la remoción de fenoles de aguas residuales; los productos formados consisten en oligómeros y polímeros poco solubles que pueden separarse fácilmente por precipitación o filtración (Yao et al., 2006). La biorremediación con enzimas presenta las siguientes ventajas:

- Generan una mínima cantidad de subproductos tóxicos en comparación con los procesos químicos.
- Proporcionan un sistema mucho más simple que un organismo entero
- Las enzimas son eliminadas *in situ* por microorganismos endógenos después del tratamiento
- Poseen alta especificidad y gran capacidad catalítica
- Es posible producir enzimas a gran escala, con mayor actividad y estabilidad, y además a un menor costo utilizando tecnología de ADN recombinante
- Trabajan bajo condiciones suaves de reacción (temperatura, presión y pH)

A pesar de las ventajas de las enzimas como catalizadores, existen también ciertos problemas prácticos en su aplicación a gran escala en procesos de biorremediación. Por ejemplo, su inestabilidad una vez que son aisladas de su ambiente; dependencia a cofactores costosos; y su sensibilidad a las condiciones de los procesos y sustancias que puedan actuar como inhibidores. Así como también, el no poder ser recuperadas para su reutilización. Debido a esto, se han buscado alternativas para su estabilización. La inmovilización ha resultado una muy buena alternativa. La inmovilización de enzimas, estabiliza su estructura, aumenta su robustez y por tanto mejora su actividad en condiciones de proceso.

Más importante, la inmovilización de las enzimas permite recuperarlas del medio de reacción, por lo que se pueden tener procesos enzimáticos continuos y generar una gran variedad de diseños de biorreactores. Por otro lado, también se ha utilizado la evolución dirigida de enzimas, logrando mejorar ciertas propiedades enzimáticas (estabilidad y actividad) para su aplicación en la biorremediación (Alcalde et al., 2006; Krajewska, 2004; Husain y Ulber, 2011; Chen et al., 2013).

2.2 Peroxidasa versátil

Los hongos de la podredumbre blanca son microorganismos que han ganado importancia a nivel biotecnológico debido a su versatilidad y robustez. Se ha observado que esta clase de hongos son capaces de metabolizar una amplia variedad de sustratos incluyendo xenobióticos tóxicos. Gracias a la producción de enzimas extracelulares oxidativas poco específicas, que degradan la lignina de los árboles que colonizan (Asgher et al., 2008; Mohorčič et al., 2009). Las enzimas ligninolíticas incluyen la lacasa (Lac), la lignino peroxidasa (LiP), la manganoso peroxidasa (MnP) y la peroxidasa versátil (VP) (Wong, 2009). Específicamente, las peroxidasas son una clase de enzimas que se encuentran presentes en todas las formas de vida. Las peroxidasas catalizan la oxidación de compuestos orgánicos e inorgánicos a partir de la reducción de peróxidos como el H_2O_2 (Hamid y Khalil-ur-Rehman, 2009). Esto lo logran mediante la generación de radicales que tienen la capacidad de romper anillos aromáticos, enlaces éter o carbono-carbono, remover grupos metoxilo, además se ha observado que la oxidación de ciertos sustratos causa un acoplamiento radicalico que resulta en la polimerización espontánea (Siddiqui et al., 2014). De las más de 6000 secuencias de peroxidasas conocidas hasta ahora, 73% de éstas codifican para hemo-peroxidasas (Torres y Ayala, 2010).

La VP (EC 1.11.1.16) pertenece a las hemo-peroxidasas extracelulares de clase II, junto con la MnP y LiP. Las LiP y MnP fueron descritas por primera vez en *Phanerochaete chrysosporium* (Pérez-Boada et al., 2005), mientras que VP se reportó por primera vez en *Pleurotus eryngii* (Tinoco et al., 2007); y hasta la fecha, dichas enzimas solamente se han encontrado en hongos (Torres y Ayala, 2010). La VP es una enzima híbrida LiP-MnP de 45 kDa que es capaz de oxidar Mn^{2+} al igual que la MnP, oxidar compuestos de alto potencial redox como la LiP pero sin la necesidad de mediadores redox, y además, oxida eficientemente compuestos que son sustratos de peroxidasas genéricas (Ruiz-Deñás et al., 2009; Rodakiewicz-Nowak et al., 2006). Estas características han sido aprovechadas, y su potencial para degradar una amplia variedad de sustratos (incluyendo compuestos de importancia biotecnológica) ha

sido explorado por diversos autores. Principalmente se han utilizado VPs provenientes de cepas de *P. enryngii*, *Pleurotus ostreatus*, *Bjerkandera adusta* y *Bjerkandera fumosa* para la degradación compuestos fenólicos incluyendo lignina fenólica, 2,6-dimetoxifenol, 2,4-diclorofenol, guayacol, diclorofeno, bromoxinil, pentaclorofenol; compuestos no fenólicos como veratrilglicerol- β -guayacil éter, ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), alcohol veratrílico y *p*-dimetoxibenceno. Colorantes industriales tipo azo como negro reactivo 5, violeta reactivo 5, azul directo 2, negro directo 22 y ftalocianinas incluyendo azul ácido 185, azul directo 199, azul reactivo 38 y azul reactivo 72; disruptores endocrinos como bisfenol A, nonilfenol, triclosan, estrona, 17 α -etilenestradiol y 17 β -estradiol, y otros compuestos farmacéuticamente activos incluyendo acetaminofén, naproxeno, diclofenaco y ácido mefenámico. Inclusive algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos como antraceno y sus derivados metílicos, pireno y benzo[a]pireno (Davila-Vazquez et al., 2005; Rodakiewicz-Nowak et al., 2006; Tinoco et al., 2007; Ruiz-Dueñas et al., 2009; Taboada-Puig et al., 2011; Pozdnyakova et al., 2013; Touahar et al., 2014; Taboada-Puig et al., 2015; Baratto et al., 2015).

2.2.1 Estructura molecular y ciclo catalítico

Al igual que otras peroxidasas ligninolíticas, la estructura molecular de la VP está constituida por un grupo prostético hemo (hierro-protoporfirina IX) que se localiza en una cavidad interna (Figura 1), dicho grupo se encuentra comunicado a la superficie de la enzima mediante dos canales de acceso. El canal principal permite la interacción directa del H₂O₂ y de algunos sustratos con el grupo hemo. Adicionalmente, en la entrada de este canal se encuentra un radical proteico que permite la oxidación de sustratos de alto potencial redox; mediante un proceso de transferencia de electrones de largo alcance (LRET, por sus siglas en inglés). Esta transferencia inicia desde el residuo triptófano en la superficie de la enzima (Trp164), y procede a través de la leucina adyacente (Leu165) hacia el anillo de porfirina (cofactor hemo). El segundo canal, lleva directamente a los propionatos hemo, es aquí donde se oxida al manganeso, el cual funciona como oxidante difusible. La estabilización del Mn²⁺ se da por uno de los propionatos hemo y los carboxilatos de los residuos ácidos glutámicos Glu36 y Glu40, y el ácido aspártico Asp175 (Figura 2) (Pérez-Boada et al., 2005; Ruiz-Dueñas et al., 2009; Torres y Ayala, 2010).

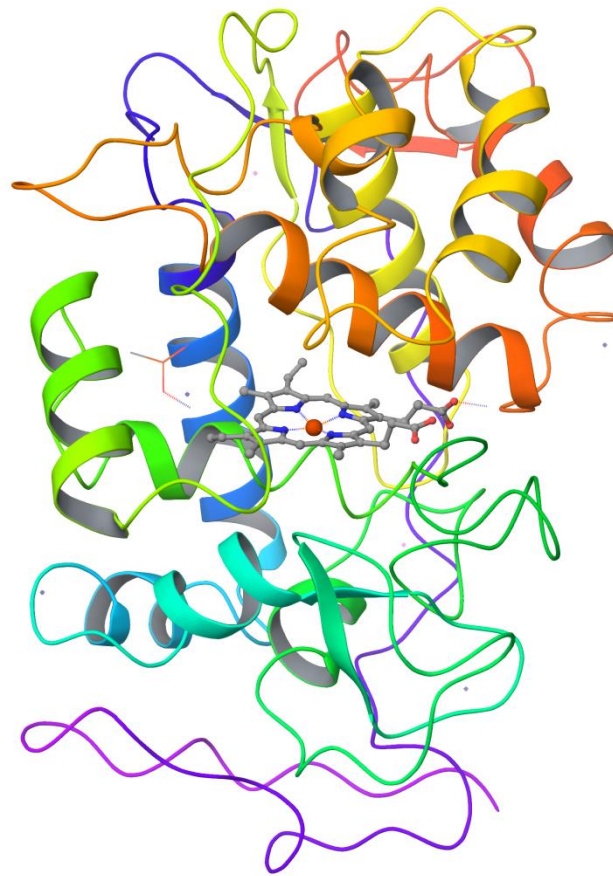


Figura 1.- Estructura cristalográfica de la peroxidasa versátil de *Pleorotus eryngii* (PDB 2BOQ). En la parte central se muestra el grupo hemo.

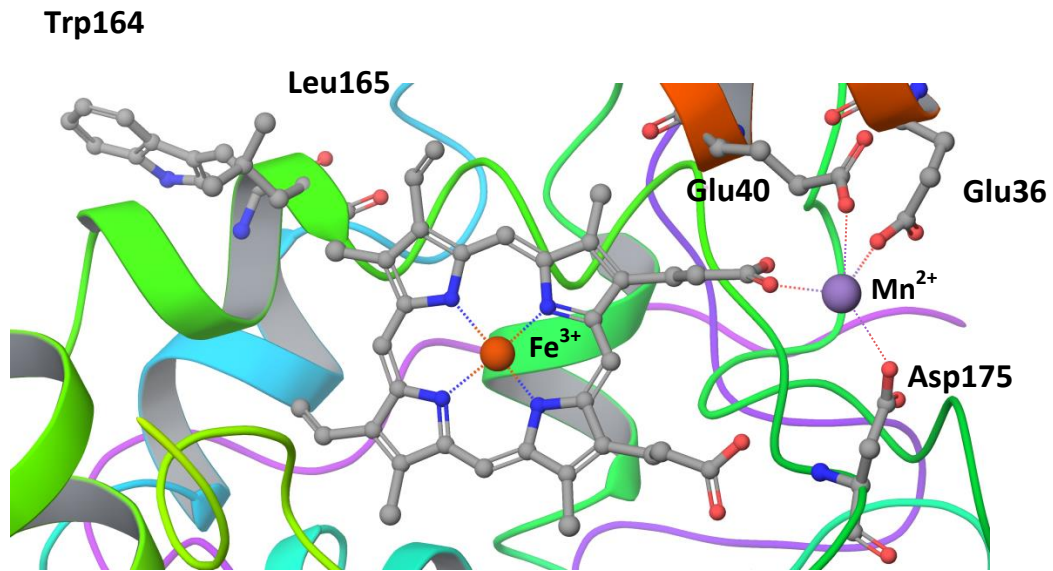


Figura 2.- Vista axial de la región hemo de la VP, que indica al triptófano (Trp164) y leucina (Leu165) responsables de la oxidación de compuestos de alto potencial redox por LRET. Además se presentan los residuos (Glu36, Glu40 y Asp175) que forman el sitio de unión a Mn^{2+} cerca de la parte interna del propionato hemo. Los iones Fe^{3+} y Mn^{2+} se muestran como esferas de van der Waals.

El mecanismo catalítico de la VP es muy similar al de otras peroxidasas como la LiP, la MnP y otras peroxidasas genéricas; y esto se debe a que su estructura combina los sitios catalíticos característicos de dichas enzimas. El ciclo catalítico de la VP inicia con la activación del grupo prostético hemo, que al interactuar con una molécula de H_2O_2 (u otro hidroperóxido) genera el compuesto I (CI), compuesto transitorio con dos equivalentes oxidantes. Uno de los equivalentes oxidantes del compuesto I es un oxoferril ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$) y el otro puede presentarse ya sea como un radical catiónico porfirina ($\text{P}^{\cdot+}$) en el compuesto I_A (CI_A), o como un radical triptófano ($\text{Trp}^{\cdot}$) formando el compuesto I_B (CI_B). La oxidación (en un electrón) de una molécula de sustrato por interacción directa con el grupo hemo activado o con el radical triptófano, da lugar a la formación del compuesto II (CII), que al igual que el CI puede oxidar una molécula de sustrato; regresando a la enzima al estado basal, lista para iniciar un nuevo ciclo catalítico. La reducción del radical catiónico porfirina o del radical triptófano en los compuestos CI_A y CI_B respectivamente, da lugar a la formación del compuesto II_A (CII_A), el cual mantiene uno de los equivalentes oxidantes como oxoferrilo. Dicho equivalente oxidante puede ser transferido desde el oxoferrilo hasta el triptófano en la superficie formando el compuesto II_B (CII_B). Asimismo, la oxidación de

Mn^{2+} por parte del grupo hemo permite la oxidación indirecta de diversos sustratos. En este caso, la transferencia de electrones desde el Mn^{2+} hasta el grupo hemo activado en CI y CII genera Mn^{3+} , el cual actúa como oxidante difusible. En la figura 3 se ilustra el ciclo catalítico de la VP (Torres y Ayala, 2010; Sáez-Jiménez et al., 2015; Ruiz-Dueñas y Martínez, 2009; Ruiz-Dueñas et al., 2009).

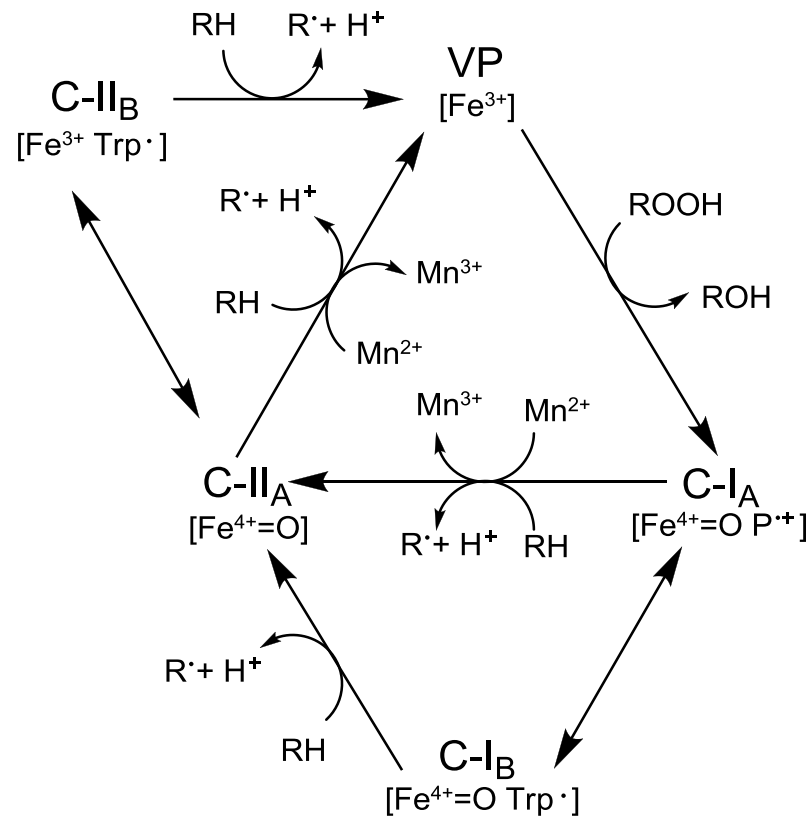


Figura 3.- Ciclo catalítico de la VP. El compuesto I (C-I) se obtiene debido a la oxidación de la enzima en reposo por la acción del peróxido (ROOH), posteriormente el compuesto II (C-II) es generado a partir de la reducción de C-I, y por una segunda reducción, se regresa a la enzima en su estado basal. VP puede oxidar tanto sustratos aromáticos (AH) como Mn^{2+} , el cual genera el oxidante difusible Mn^{3+} .

2.3 Inmovilización de enzimas

Como se mencionó con anterioridad, la poca estabilidad que presentan las enzimas al ser aisladas de su medio celular y su fácil desnaturalización por agentes químicos o biológicos, ha llevado a la

búsqueda de métodos de estabilización, siendo la inmovilización uno de los más efectivos hasta ahora (Chen et al., 2013). Las enzimas se pueden inmovilizar por una amplia variedad de métodos, los cuales se clasifican en físicos y químicos. Dentro de los métodos físicos se encuentran: el confinamiento de la enzima en una membrana, la adsorción (física, iónica) en una matriz insoluble, la inclusión (atrapamiento en un gel), la microencapsulación y la formación de películas de Langmuir-Blodgett enzimáticas. Por otro lado, dentro de los métodos químicos se encuentran: la unión covalente a una matriz insoluble y el entrecruzamiento con agentes de bajo peso molecular. En realidad, no es posible elegir un solo método para todas las enzimas, la elección de cada uno dependerá de la enzima a inmovilizar, sus características, así como el propósito para el cual se inmovilizará. Cada uno de estos métodos tiene sus ventajas y desventajas; por ejemplo, la adsorción es simple, económica y efectiva, pero frecuentemente reversible; la inmovilización covalente y el entrecruzamiento es efectivo y durable, pero resulta costoso, y en algunas ocasiones afecta el desempeño de la enzima; y en el confinamiento en membranas, atrapamiento, y microencapsulación se han observado problemas de difusión.

Una gran cantidad de procesos basados en enzimas inmovilizadas han sido implementados a gran escala, principalmente en la industria alimenticia, en donde reemplazaron los procesos catalizados por enzima libre; y en la manufactura de químicos finos y fármacos, particularmente, en síntesis asimétrica, donde se requiere la resolución de enantiómeros para producir moléculas ópticamente puras. En aplicaciones analíticas, las enzimas inmovilizadas se utilizan mayormente en biosensores y en pruebas diagnóstico (Torres y Ayala, 2010). Las aplicaciones médicas incluyen, el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, así como para recubrir materiales y mejorar su biocompatibilidad (Krajewska, 2004).

Las propiedades de las enzimas inmovilizadas están gobernadas tanto por las propiedades de la enzima, como del material soporte. A pesar de no haber un soporte universal para todas las enzimas y sus aplicaciones, cualquier material utilizado para la inmovilización de enzimas, debe cumplir con ciertas características deseables. Éstas incluyen, una alta afinidad hacia las proteínas, grupos funcionales reactivos disponibles, ya sea para reaccionar directamente con las enzimas, o para modificaciones químicas; ser hidrofílicos, tener estabilidad mecánica y rigidez, regenerabilidad; y fácil preparación en distintas configuraciones geométricas que le den al sistema permeabilidad y área superficial para el proceso elegido. Además, para ciertas aplicaciones como la industria médica, debe de ser biocompatible. Debido al aumento en la preocupación ambiental y de salud pública, los materiales deben ser biodegradables, y de bajo costo (Krajewska, 2004). Particularmente, en aplicaciones de biorremediación, se ha logrado remover una amplia variedad de fenoles mediante la inmovilización de peroxidasas en

diversos soportes, principalmente se ha enfocado en el uso de la peroxidasa del rábano picante (HRP). También hay estudios enfocados en el tratamiento de colorantes industriales y otros compuestos aromáticos (Husain y Ulber, 2011).

2.4 Nanotecnología

La nanotecnología involucra la investigación y el desarrollo de tecnología a nivel atómico, molecular o macromolecular en la escala de 1 a 100 nanómetros, para la creación y uso de estructuras, dispositivos y sistemas que tienen propiedades novedosas debido a su tamaño pequeño (NSF, 2014). La nanorremediación, implica el uso de nanomateriales reactivos para la transformación y desintoxicación de contaminantes; o la inmovilización de moléculas catalíticas, para mejorar sus propiedades. Algunos estudios han demostrado que las nanopartículas de hierro son muy efectivas en la transformación y desintoxicación de una gran variedad de contaminantes ambientales comunes como solventes orgánicos clorados, pesticidas organoclorados y bifenilos policlorados (BPCs). Recientemente se ha estudiado el uso de nanoacarreadores como nanopartículas o nanofibras para inmovilización de enzimas (Das, 2014; Zhao et al., 2011).

2.4.1 Nanobiocatálisis

El rápido desarrollo de la nanotecnología, ha conllevado a su asociación con otras tecnologías, como la biotecnología. Estas interacciones han generado resultados innovadores. Un ejemplo destacable es la nanobiocatálisis. En un principio, la nanobiocatálisis se enfocó solamente en la inmovilización de enzimas por métodos convencionales en nanoestructuras, como materiales nanoporosos, nanofibras, nanotubos o nanopartículas. Con esto se logró tener una mayor capacidad de carga en comparación con los soportes convencionales. Posteriormente se comenzaron a aprovechar otras características de los nanomateriales, como conductividad eléctrica y magnetismo, mejorando así la estabilidad y actividad de los sistemas nanobiocatalíticos. Actualmente, se ha logrado inmovilizar una amplia variedad de enzimas en este tipo de materiales. Las principales aplicaciones son los biosensores, celdas de biocombustibles y síntesis de químicos (Kim et al., 2008; Ansari y Husain, 2012; Min y Yoo, 2014). En biorremediación, particularmente se ha observado que la inmovilización de lacasa en nanopartículas de sílice mejora su

estabilidad enzimática en comparación con la enzima libre en solución, logrando así transformar sustratos como el bisfenol A bajo condiciones ambientalmente relevantes (Gasser et al., 2014). La premisa de utilizar nanomateriales como soportes, es que en comparación a enzimas inmovilizadas en soportes macro- y microestructurados, los nanomateriales pueden tener capacidades de carga superiores debido a su gran área superficial y además poseen menores limitaciones de transferencia de masa (Ansari y Husain, 2012).

2.5 Quitosano

El quitosano es un biopolímero natural, no tóxico, biocompatible y biodegradable. Está compuesto de copolímeros de glucosamina y N-acetil glucosamina. El quitosano se puede obtener a partir de la desacetilación alcalina de la quitina. La quitina es un biopolímero abundante aislado comercialmente del exoesqueleto de crustáceos como cangrejos y camarones. El quitosano es insoluble bajo condiciones neutras y alcalinas; pero soluble a pH menores a 6.5. Posee grupos -OH y -NH₂ que forman complejos con aniones metálicos o con moléculas aniónicas con múltiples cargas, como sulfatos, citratos y fosfatos. Debido a sus características, el quitosano ha sido ampliamente estudiado con el fin de preparar sistemas acarreadores, y de liberación de compuestos terapéuticos, particularmente genes y proteínas. Gracias a su carga positiva, éste puede formar complejos fácilmente con moléculas de ADN y proteínas cargadas negativamente (Zhao et al., 2011; Grenha, 2012; Rampino et al., 2013).

2.5.1 Nanopartículas de quitosano

Las nanopartículas de quitosano fueron descritas por primera vez en 1994, cuando se propuso su uso como acarreadores de 5-fluoroacil (un anticancerígeno) vía intravenosa. Las nanopartículas fueron obtenidas por emulsificación y entrecruzamiento (Ohya et al., 1994). Desde entonces, estos sistemas se han utilizado ampliamente para liberación de fármacos, vacunas, material genético, y para incorporación de sustancias activas en pasta de dientes. Posteriormente, se desarrollaron nuevos métodos para la obtención de nanopartículas de quitosano, la mayoría involucran emulsificación y distintos tipos de coacervación. Más específicamente, se han utilizado: método de micelar inverso, gelificación iónica, complejación con polielectrolitos, fusión de gotas de emulsión y la desolvatación. Todos éstos son

métodos de fabricación *bottom-up*, los cuales involucran el ensamblaje de moléculas en solución para formar estructuras definidas, en este caso, nanopartículas. Los métodos de preparación de quitosano catiónico mediante entrecruzamiento iónico con polianiones específicos han sido exitosos ya que además de que el quitosano forma complejos con polímeros cargados negativamente, tiene la habilidad de gelificar espontáneamente al entrar en contacto con polianiones multivalentes, debido a la formación de entrecruzamiento inter e intramolecular mediada por dichos polianiones. Entre los polianiones investigados, el tripolifosfato (TPP) es el más utilizado debido a que no es tóxico y a que gelifica rápidamente (Grenha et al., 2005; Koukaras et al., 2012). Los nanosistemas quitosano-TPP muestran características atractivas que los hacen acarreadores de macromoléculas prometedores. Estas características incluyen la formación bajo condiciones suaves, el tamaño homogéneo y ajustable, una carga superficial positiva que puede modularse fácilmente, y una gran capacidad para asociarse con péptidos, proteínas, oligonucleótidos y plásmidos. Mediante este tipo de metodologías, se ha logrado inmovilizar β -galactosidasa, tripsina, lipasa, lacasa y otras enzimas, en nanomateriales basados en quitosano. Cabe mencionar que el tamaño y la distribución de tamaño de las nanopartículas depende en gran parte de las concentraciones de quitosano y TPP que se utilicen, el peso molecular del quitosano y las condiciones de reacción a las que se haga la síntesis como velocidad de agitación y pH (Zhao et al., 2011; Gan et al., 2005; Singh y Mishra, 2015).

2.5.1.1 Inmovilización de enzimas en nanopartículas de quitosano

Específicamente la inmovilización de enzimas en nanopartículas de quitosano-TPP se ha reportado en muy pocos trabajos hasta ahora. En 2008 la inmovilización de β -galactosidasa en nanopartículas de quitosano entrecruzadas con TPP demostró que a pesar de que la cantidad de proteína inmovilizada respecto a su contraparte macroparticulada es mucho menor, la actividad específica es más grande. Lo anterior se puede deber a la poca área superficial de las macroesferas; y a que en realidad se forma una multicapa de proteínas en la superficie de la partícula generando así un impedimento estérico para el sustrato. Dichas nanopartículas mantuvieron casi un 60% de su actividad inicial hasta por 20 días (Biró et al., 2008). Por otro lado, se observó que la inmovilización de lipasa neutra en nanopartículas de quitosano-TPP mejoró su estabilidad térmica, al comparar con la enzima libre. A su vez, el perfil de pH de la enzima cambió ligeramente después de su inmovilización. Además las nanopartículas mantuvieron más del 40% de su actividad inicial hasta por 30 días mientras que la enzima libre perdió su actividad por completo después de 5 días de almacenamiento a 4°C. Contrario a lo

observado normalmente, la enzima inmovilizada demostró tener mayor afinidad hacia el sustrato que la enzima libre, lo que se observó mediante la disminución de la K_M (Tang et al., 2007). En 2006 Tang y colaboradores lograron inmovilizar proteinasa neutra en nanopartículas de quitosano. Observaron que la inmovilización le provee a la enzima una mayor estabilidad bajo distintos pH y temperatura, además ser más estable térmicamente. Sin embargo el valor de la K_M aumentó debido a la inmovilización, lo que se traduce en una pérdida de afinidad del sustrato (Tang et al., 2006).

2.5.1.2 Nanopartículas de quitosano entrecruzadas con glutaraldehído

El uso de glutaraldehído como entrecruzante también ha sido explorado por diversos autores. Se ha encontrado que la concentración de glutaraldehído afecta la actividad enzimática, a mayor cantidad de glutaraldehído la actividad decrece, además el tiempo de entrecruzamiento juega un papel importante, donde al aumentar el tiempo la actividad alcanza un máximo y posteriormente decrece rápidamente debido a un exceso de entrecruzamiento que causa cambios en la configuración de la enzima. Sin embargo, al evaluar el efecto del pH en el proceso de inmovilización sobre la actividad enzimática no se han encontrado diferencias significativas. Además, el efecto de la temperatura de entrecruzamiento también ha sido evaluado y se observó que la enzima inmovilizada muestra actividades mayores que la enzima libre cuando se utilizan diversas temperaturas (Chen et al., 2013). Otros autores han observado que la cantidad de enzima inmovilizada depende el pH al cual se lleve la reacción; a pHs cercanos al punto isoeléctrico de la enzima el porcentaje de inmovilización aumenta drásticamente ya que las cargas que tienen los grupos amino y carboxilo de la enzima le permiten interactuar en mayor grado con el glutaraldehído, logrando una mejor inmovilización (Cahyaningrum y Sianita, 2014).

2.5.1.3 Biodegradabilidad de enzimas inmovilizadas en nanopartículas de quitosano

Hasta la fecha solamente existe un estudio donde se evalúa la estabilidad de enzimas inmovilizadas en quitosano ante la degradación microbiana (Koyani y Vazquez-Duhalt, 2016). Los autores demostraron que la lacasa inmovilizada en nanopartículas de quitosano mejoró su estabilidad ante la degradación microbiana bajo condiciones ambientalmente relevantes. La enzima libre y la enzima

nanoencapsulada fueron incubadas en extractos de suelo, composta y en aguas de tratamiento; y posteriormente, se evaluó su actividad enzimática residual. La nanoencapsulación de la enzima retarda significativamente su inactivación provocada por la microflora que ocurre naturalmente en dichos sistemas.

Capítulo 3. Justificación

Existen una gran cantidad de enzimas que pueden ser utilizadas para fines biotecnológicos, sin embargo, éstas se degradan fácilmente. Se plantea el uso de nanopartículas para aumentar el tiempo de vida de estos biocatalizadores en procesos reales de biorremediación.

Capítulo 4. Hipótesis

La peroxidasa embebida en nanopartículas de quitosano tendrá mejores propiedades catalíticas, en especial un mayor tiempo de vida que la enzima libre en solución. Las nanopartículas biocatalíticas se presentarán como una alternativa atractiva para la degradación de contaminantes en procesos de biorremediación.

Capítulo 5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Diseñar y caracterizar nanopartículas de quitosano con actividad peroxidasa.

5.2 Objetivo específicos

- Estudiar diferentes procedimientos para embeber la peroxidasa versátil en nanopartículas de quitosano.
- Caracterizar las propiedades catalíticas de las nanopartículas biocatalíticas.
- Evaluar la actividad peroxidasa con diversos contaminantes.
- Evaluar la estabilidad de las nanopartículas biocatalíticas.
- Evaluar la estabilidad de las nanopartículas biocatalíticas modificadas químicamente en su superficie.

Capítulo 6. Materiales y Metodología

6.1 Reactivos y enzima

La enzima utilizada en este trabajo, la peroxidasa versátil (VP, EC 1.11.1.16) de *Bjerkandera adusta*, fue producida y purificada de acuerdo a Tinoco et al. (2007). El quitosano, tripolifosfato de sodio (TPP), ácido acético y glutaraldehído fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El difosfato de potasio (K_2HPO_4), fosfato monopotásico (KH_2PO_4) y el acetonitrilo grado HPLC se obtuvieron de Fermont (Monterrey, NL, México). El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se obtuvo de Hycel de México S. A. de C. V. (Zapopan, Jalisco, México). Los compuestos 2,6- dimetoxifenol (DMP), antraceno, fenantreno, pireno, 4-clorofenol, catecol, triclosan, β -estradiol, bisfenol A, 2,3,5,6-tetraclorofenol (TCP), diclorofeno, 2,6-dicloro-4-nitrofenol y fenol fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Los compuestos pentaclorofenol y paratión se obtuvieron de Chem Service Inc. (West Chester, PA, USA). Los colorantes negro ácido 194, azul reactivo 198 y azul brillante de Remazol R provienen de BASF Mexicana (México, D. F.). La enzima proteolítica papaína (EC 3.4.22.2) de *Carica papaya* (30,000 unidades USP/mg), el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y la L-cisteína fueron comprados a Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Los aldehídos antraldehído, benzaldehído, formaldehído y naftaldehído, y el agente reductor cianoborohidruro de sodio ($NaBH_3CN$) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).

6.2 Síntesis de las nanopartículas

La síntesis de nanopartículas de quitosano se llevó a cabo por el método de gelificación iónica y posteriormente las nanopartículas fueron estabilizadas por entrecruzamiento covalente. Primeramente se preparó una solución de quitosano 0.25% (w/v) en una solución acuosa de 2% ácido acético (v/v). La solución se mantuvo en agitación constante durante toda la noche para permitir la disolución del quitosano. Una vez disuelto el quitosano, el pH fue ajustado a 5.5. A 35 mL de dicha solución se le agregaron 700 μ L de la enzima concentrada gota a gota y la mezcla se dejó bajo agitación vigorosa durante 15 minutos. Posteriormente se agregaron 7 mL de una solución 0.025% (w/v) de TPP gota a gota y se mantuvo bajo agitación vigorosa por 1 hora. Por último se agregaron 7 mL de glutaraldehído (a distintos porcentajes, v/v) gota a gota y se dejó bajo agitación vigorosa por 1 hora más. A continuación, la mezcla se centrifugó por 2:20 horas a 60,000 rpm y 4°C en una ultracentrífuga Beckman Coulter

Optima XPN-100. Las nanopartículas fueron recuperadas en el pellet, posteriormente fueron resuspendidas en 3 mL de buffer de fosfatos 60 mM pH 4 y dispersadas por sonicación.

6.2.1 Variación del porcentaje de glutaraldehído

Debido a la variación de la actividad de las nanopartículas conforme el tiempo, se buscó su estabilización variando la cantidad de glutaraldehído colocado. Durante el procedimiento de síntesis de nanopartículas se colocaron 7 mL de glutaraldehído 0.03, 0.06, 0.12, 0.24, 0.48 y 0.96% de glutaraldehído. El resto del procedimiento de síntesis se mantuvo igual.

6.3 Caracterización estructural de las nanopartículas

La caracterización estructural de las nanopartículas se llevó a cabo en un microscopio electrónico de transmisión (TEM) JEOL JEM-2100F. Las nanopartículas fueron colocadas en una rejilla 400 mesh de cobre recubierta con carbono. A continuación se tiñó con ácido fosfotúngstico (TPA), para su análisis.

6.4 Medición de la actividad enzimática

La actividad tanto de la enzima libre, como de las nanopartículas fue determinada espectrofotométricamente a 468 nm, evaluando la oxidación de 2,6-dimetoxifenol (DMP, $\epsilon = 49600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La mezcla de reacción contenía 40 mM de buffer de fosfatos (a varios pH), 100 mM de DMP, las cantidades necesarias de enzima (ya sea enzima libre o nanopartículas), 1 mM de H_2O_2 para iniciar la reacción, y las cantidades necesarias de agua destilada para mantener un volumen constante de 1 mL.

6.5 Eficiencia de inmovilización

Una vez sintetizadas y centrifugadas las nanopartículas, se midió la actividad enzimática con 2,6-dimetoxifenol en el sobrenadante y se comparó con la actividad enzimática de la cantidad de enzima colocada en el proceso de síntesis. Por lo que la eficiencia de inmovilización (EI) se estimó indirectamente restando ambas cantidades, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$EI (\%) = \left[\frac{(U \text{ totales utilizadas en la síntesis} - U \text{ en el sobrenadante})}{U \text{ totales utilizadas en la síntesis}} \right] \times 100$$

6.6 Perfil de pH

La evaluación del efecto del pH en la actividad catalítica de la enzima libre y de las nanopartículas se llevó a cabo espectrofotométricamente a 468 nm en un espectrofotómetro Agilent Cary 60 UV-Vis. Se prepararon distintas soluciones 0.15 M de 2,6-dimetoxifenol a los pH de 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5 y 7. La actividad fue evaluada siguiendo el mismo procedimiento del apartado 6.4.

6.7 Perfil de temperatura

El perfil de temperatura de la enzima libre y de las nanopartículas fue evaluado espectrofotométricamente a 468 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis adaptado con un sistema de control de temperatura Perkin Elmer PTP 1+1. La actividad enzimática fue evaluada a 27, 40, 60 y 80°C. La actividad fue evaluada siguiendo el mismo procedimiento del apartado 6.4.

6.8 Termoestabilidad

La estabilidad térmica de la enzima libre y de las nanopartículas fue evaluada espectrofotométricamente a 468 nm en un espectrofotómetro Agilent Cary 60 UV-Vis. La actividad residual se obtuvo después de incubar la enzima hasta por 30 minutos a 40, 50 y 60°C. La actividad fue evaluada siguiendo el mismo procedimiento del apartado 6.4.

6.9 Transformación de contaminantes

6.9.1 Pesticidas

La transformación de pesticidas se cuantificó mediante un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) Agilent 1100 series, con una columna Phenomenex (150 mm x 4.6 mm) de fase reversa C-18 y utilizando como eluyentes acetonitrilo y agua. El método de elución fue 1 minuto 100% agua seguido de un gradiente a 75% acetonitrilo en 14 minutos, en donde se mantuvo por 3 minutos para posteriormente regresar a 100% agua. La detección se realizó monitoreando la absorbancia a la longitud de onda adecuada para cada sustrato. La mezcla de reacción se ajustó a 1 mL, y contenía 40 mM de buffer de fosfatos pH 4, 200 μM del contaminante, las cantidades necesarias de enzima (ya sea la enzima libre, o las nanopartículas), 1 μM de H_2O_2 para iniciar la reacción y agua destilada para mantener un volumen constante. Cada reacción se llevó a cabo durante 10 minutos, y posteriormente se detuvo agregando 1 mL de acetonitrilo puro. La mezcla de reacción se centrifugó durante 2 minutos a 11,000 rpm con el fin de eliminar cualquier posible precipitado y se tomaron 20 μL para su análisis por HPLC.

6.9.2 Colorantes

La transformación de los colorantes se cuantificó espectrofotométricamente. Las mediciones se hicieron en un espectrofotómetro Agilent Cary 60 UV-Vis. Para cada colorante la absorbancia fue ajustada a 1 y se evaluó el cambio en la absorbancia respecto al tiempo ($\Delta A/\text{min}$). La mezcla de reacción se ajustó a 1 mL, y contenía 40 mM de buffer de fosfatos pH 4, 100 μM del colorante (azul reactivo 198 $\epsilon_{625} = 14233 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, negro ácido 194 $\epsilon_{575} = 5495.1 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ o azul brillante de Remazol R $\epsilon_{592} = 8480 \text{ M}^{-1}$

cm^{-1}), las cantidades necesarias de enzima (enzima libre o nanopartículas), 1 mM de H_2O_2 para iniciar la reacción y agua destilada para mantener un volumen constante.

6.10 Número total de recambio

El número total de recambio fue obtenido evaluando la oxidación del colorante azul brillante de Remazol R a 592 nm. Tanto para la enzima libre como para las nanopartículas, se trabajó con un sistema de 10 mL. La mezcla de reacción contenía 40 mM de buffer de fosfatos pH 4, 100 μM de azul brillante de Remazol R, las cantidades necesarias de enzima (enzima libre o nanopartículas), 1 mM de H_2O_2 para iniciar la reacción y agua destilada para mantener un volumen constante. La absorbancia del colorante se ajustó a 1, y el cambio en la misma se evaluó cada 2 minutos en un principio y después de 20 minutos, a intervalos mayores hasta no observar cambios. El número total de recambio está expresado como el número de moléculas de sustrato transformadas hasta la inactivación completa de la enzima.

6.11 Degradación microbiana

Los ensayos de degradación microbiana fueron llevados a cabo como se describe a continuación. Se recolectó agua residual proveniente de un sistema de tratamiento de aguas residuales por lodos activados, ubicado en UABC unidad Sauzal. Las partículas de mayor tamaño se precipitaron y se tomaron 30 mL de la parte acuosa y se colocaron en un recipiente bajo agitación constante conteniendo 200 μL de la enzima libre y 1 mL de las nanopartículas, respectivamente. La actividad enzimática se midió espectrofotométricamente a 468 nm cada 8 horas. La mezcla de reacción contenía 30 mM de buffer de fosfatos pH 4, 75 mM de DMP, las cantidades necesarias de las mezclas de enzima y agua residual, 1 mM de H_2O_2 para iniciar la reacción y agua destilada para mantener un volumen constante. Las unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL) colocadas en los ensayos, fueron determinadas mediante recuento en placa con agar Luria Bertani (LB).

6.12 Degradación por proteasas

Se evaluó la degradación por proteasas utilizando papaína de *Carica papaya*. Previo a la evaluación de la degradación, la papaína fue activada, disolviéndola en un buffer de fosfatos 60 mM pH 5.5 el cual contenía 5 mM de EDTA y 5 mM de L-cisteína, la mezcla fue incubada por 30 minutos a 33°C. A 3 mL de la solución anterior se le agregó 1 mL enzima versátil peroxidasa, ya sea en su forma libre o en nanopartículas. La mezcla se mantuvo agitación constante y a una temperatura de 33°C, tomando muestras cada hora. La degradación fue cuantificada evaluando espectrofotométricamente la actividad enzimática de la VP a 468 nm, utilizando 2,6-dimetoxifenol como sustrato. La mezcla de reacción contenía 40 mM de buffer de fosfatos, 100 mM de DMP, las cantidades necesarias de enzima (ya sea enzima libre o nanopartículas), 1 mM de H₂O₂ para iniciar la reacción, y las cantidades necesarias de agua destilada para mantener un volumen constante de 1 mL.

6.13 Modificación química de la nanopartículas

La modificación química de las nanopartículas de quitosano se llevó a cabo mediante una reacción de alquilación reductora con cuatro diferentes aldehídos: antraldehído, benzaldehído, formaldehído y naftaldehído, utilizando NaBH₃CN como agente reductor. 2 mL de nanopartículas de quitosano fueron mezclados con 2 mL de una solución de aldehído en acetonitrilo (400 µg cada aldehído) en 2 mL de buffer fosfatos 60 mM pH 4. La mezcla se mantuvo en agitación constante durante 15 minutos a 4°C y posteriormente se agregaron 8 mg de NaBH₃CN, después de 4 horas la mezcla fue centrifugada durante 5 minutos a 10,000 rpm, las nanopartículas modificadas fueron precipitadas y resuspendidas en 2 mL de buffer fosfatos 60 mM pH 4 y dispersadas mediante sonicación.

6.13.1 Evaluación de la estabilidad ante degradación microbiana

Los ensayos de degradación microbiana fueron llevados a cabo de manera muy similar a los experimentos descritos en la sección 6.11. Se recolectó agua del sistema de tratamiento de aguas residuales ubicado en UABC unidad Sauzal. Las partículas de mayor tamaño se retiraron por centrifugación y 20 mL del sobrenadante se colocaron en un recipiente bajo agitación constante

conteniendo 100 μ L de la enzima libre, 2 mL de las nanopartículas sin modificar o 2 mL de las nanopartículas modificadas en su superficie con los distintos aldehídos. La actividad enzimática se midió espectrofotométricamente a 468 nm tomando alícuotas cada 12 horas. La mezcla de reacción contenía 30 mM de buffer de fosfatos pH 4, 75 mM de DMP, las cantidades necesarias de las mezclas de enzima y agua residual, 1 mM de H_2O_2 para iniciar la reacción y agua destilada para mantener un volumen constante de 1 mL. Las unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL) colocadas en los ensayos, fueron determinadas mediante recuento en placa con agar Luria Bertani (LB) (Anexo 1).

Capítulo 7. Resultados

El presente trabajo tiene como finalidad la síntesis, caracterización y evaluación de nanopartículas de quitosano con actividad peroxidasa. Se determinó la habilidad de dichas nanopartículas en la transformación de diversos contaminantes, incluyendo hidrocarburos aromáticos policíclicos, compuestos fenólicos y colorantes. Además, se evaluó su degradación al ser incubadas con agua residual y se comparó con la enzima libre en solución. Las nanopartículas fueron modificadas químicamente en su superficie con diversos aldehídos con el fin de mejorar la estabilidad enzimática ante la degradación microbiana. A continuación se presentan los resultados obtenidos.

7.1 Estabilización de las nanopartículas

Con el fin de estabilizar las nanopartículas se variaron las cantidades de glutaraldehído adicionadas durante la síntesis. Se observó que existe una relación entre la actividad enzimática y la cantidad de glutaraldehído. Las nanopartículas que presentaron una mayor actividad enzimática fueron las que contenían 0.12% de glutaraldehído (Figura 4). Así mismo, se determinó que a mayor cantidad de glutaraldehído, se presentó una mayor retención de la actividad inicial conforme al paso del tiempo. Las preparaciones que conservaron mayor actividad (55% de la actividad inicial) fueron las sintetizadas con 0.48 y 0.96% de glutaraldehído. La actividad se mantuvo hasta por 20 días para las nanopartículas con 0.48% de glutaraldehído (Figura 5), por lo que se decidió continuar los experimentos posteriores con esta preparación.

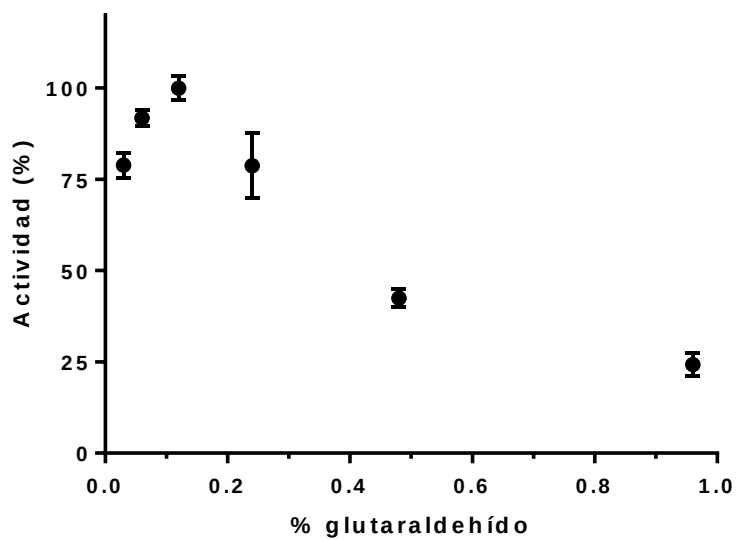


Figura 4.- Actividad relativa de nanopartículas variando la cantidad de glutaraldehído adicionado durante la síntesis.

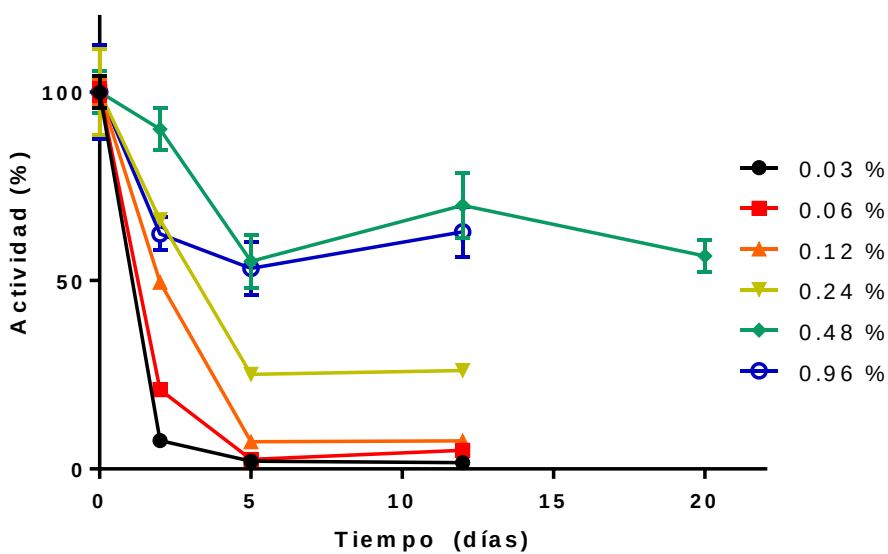


Figura 5.- Variación de la actividad enzimática respecto al tiempo de nanopartículas sintetizadas con distintos porcentajes de glutaraldehído.

7.2 Caracterización de las nanopartículas

Una vez estabilizadas las nanopartículas, se procedió a caracterizarlas estructuralmente. En la Figura 6 se muestran las nanopartículas sintetizadas con enzima inmovilizada. La morfología de las nanopartículas es semiesférica, con poca aglomeración de partículas y tamaños variables, con un promedio de 125 ± 42 nm. El porcentaje de inmovilización calculado fue de 76.4%.

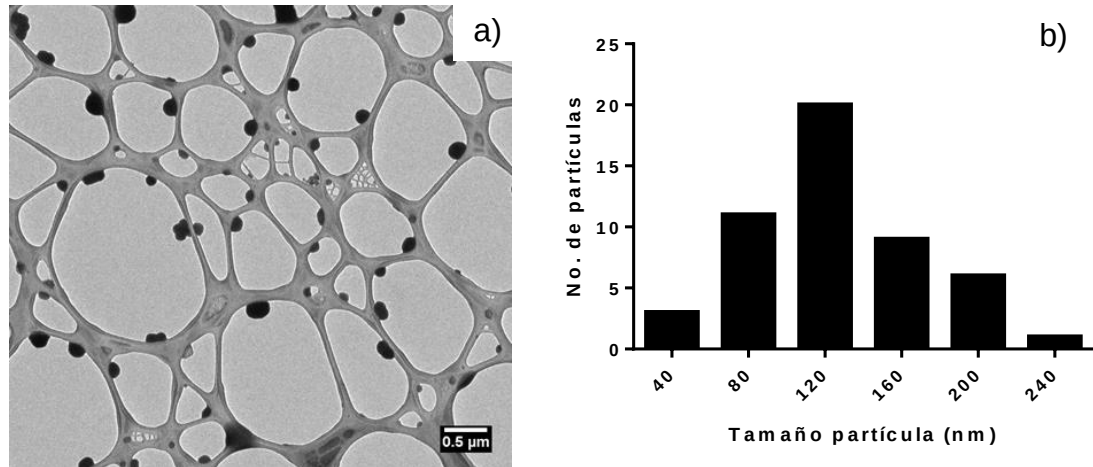


Figura 6.- a) Micrografía TEM de nanopartículas con enzima inmovilizada y b) histograma de la distribución de tamaño de partícula.

7.3 Perfil de pH

La actividad enzimática fue evaluada a distintos pH. Para ambos casos (enzima libre y nanopartículas) la mayor actividad se observó a pH 4, y no hubo diferencias relevantes entre la enzima y las nanopartículas. A excepción del pH 3, en donde las nanopartículas presentaron mayor actividad; con actividades relativas de 45% y 5% para las nanopartículas y para la enzima libre, respectivamente (Figura 7).

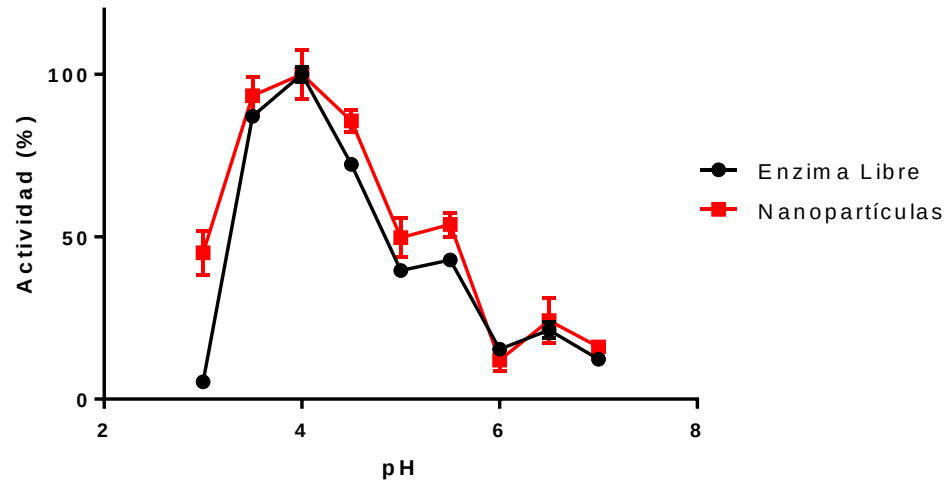


Figura 7.- Evaluación de la actividad de la enzima libre y de las nanopartículas a distintos pH.

7.4 Perfil de temperatura

Los ensayos de perfil de temperatura demostraron que a diferencia de la enzima libre, las nanopartículas pueden actuar en un intervalo más amplio de temperaturas. La enzima libre presentó una mayor actividad a 40°C. Mientras que para las nanopartículas, el 100% de su actividad se mantuvo a las temperaturas de 40 y 60°C. Para ambos casos la actividad es prácticamente nula a 80°C (Figura 8).

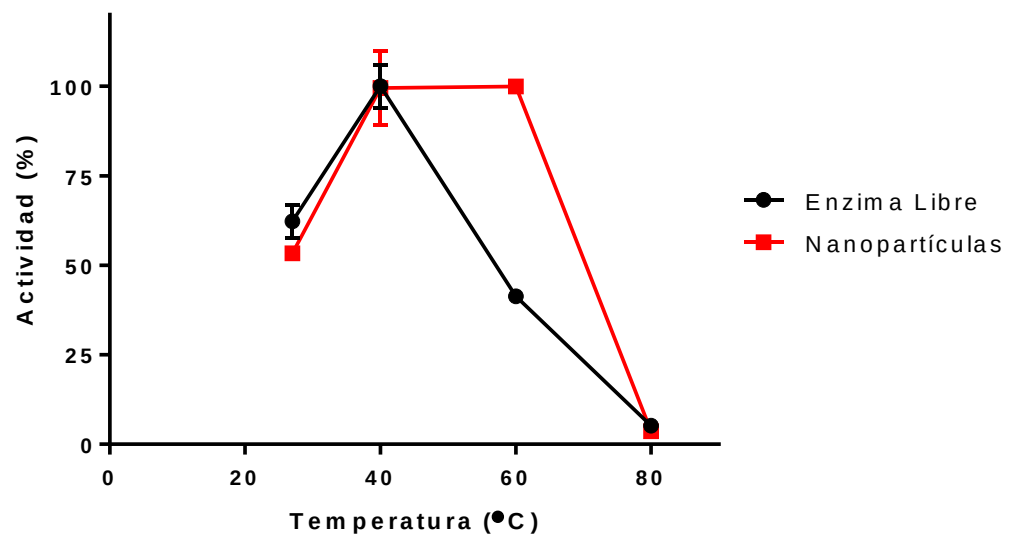


Figura 8.- Evaluación de la actividad de enzimática de la enzima libre y de las nanopartículas a distintas temperaturas.

7.5 Termoestabilidad

Se estudió la estabilidad térmica de la enzima tanto libre, como inmovilizada en nanopartículas. Tanto para la enzima libre como para las nanopartículas hubo una disminución de la actividad después de incubar por 5 minutos en todas las temperaturas ensayadas. A 40°C, ambas mostraron una actividad residual mayor del 70% después de incubar por 30 minutos. Cuando se incubó a 50°C, la enzima libre retuvo sólo 8% de su actividad inicial, mientras que las nanopartículas mantuvieron un 30%. Por último, a 60°C, la enzima libre perdió por completo su actividad después de 30 minutos; mientras que las nanopartículas mantuvieron 6% de su actividad después del mismo tiempo de incubación (Figura 9).

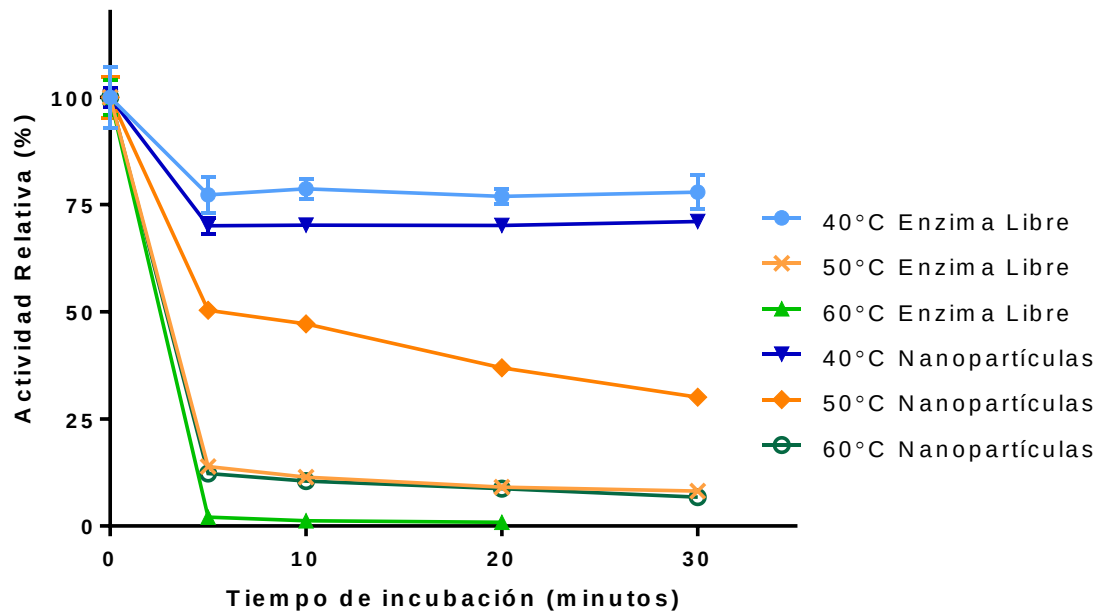


Figura 9.- Actividad relativa de la enzima libre y de las nanopartículas después de ser incubadas a distintas temperaturas y tiempos.

7.6 Constantes catalíticas

Se calcularon las constantes catalíticas k_{cat} y K_M , y la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M) de la enzima libre y las nanopartículas utilizando DMP como sustrato (Tabla 1). Para esto, las concentraciones de DMP y de H_2O_2 fueron aumentadas hasta llegar al punto de saturación; los datos obtenidos se ajustaron a un modelo cinético de Michaelis-Menten utilizando el software Graphpad Prism 6. Se observó un aumento

de la K_M DMP en las nanopartículas, mientras que en K_M para el H_2O_2 no hubo cambios significativos. Tanto para el DMP como para el H_2O_2 se obtuvo una mayor k_{cat} con la enzima libre. La disminución de la eficiencia catalítica después de la inmovilización fue de 26% para el H_2O_2 , mientras que para el DMP fue drástica y ascendió a 73%. Estas disminuciones en la eficiencia catalítica después de inmovilizar la enzima se deben principalmente a una pérdida de la afinidad de la enzima por el sustrato (K_M DMP).

Tabla 1.- Constantes catalíticas de la enzima libre y de las nanopartículas usando 2,6-dimetoxifenol como sustrato.

	k_{cat} (min^{-1})	K_M DMP (μM)	k_{cat}/K_M DMP ($\text{min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$)	K_M H_2O_2 (μM)	k_{cat}/K_M H_2O_2 ($\text{min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$)
Enzima Libre	1009.0 ± 4.8	16.5 ± 1.1	61.1	122.2 ± 32.3	8.3
Nanopartículas	757.9 ± 4.3	46.6 ± 2.1	16.3	123.4 ± 13.0	6.1

7.7 Transformación de contaminantes

Se determinó la capacidad de las nanopartículas biocatalíticas y de la enzima libre en la transformación de 17 compuestos contaminantes, que incluyen 3 hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), 3 plaguicidas, 2 fenoles, 4 fenoles halogenados, 2 disruptores endócrinos y 3 colorantes industriales. La transformación de diversos contaminantes fue evaluada mediante HPLC a excepción de los colorantes y del 2,6-dimetoxifenol, que fueron evaluados espectrofotométricamente. En primer lugar, se probó la actividad enzimática sobre los 17 contaminantes. Se observó que 13 fueron transformados tanto por la enzima libre como por las nanopartículas, por lo que se calculó la actividad específica para estos contaminantes (Tabla 2). La enzima libre presentó mayor actividad específica que las nanopartículas en todos los casos (a excepción del pentaclorofenol). Además, dentro de los contaminantes fenólicos evaluados el 2,6-dimetoxifenol y el 2,3,5,6-tetraclorofenol fueron con los que se alcanzó una mayor actividad específica. Por otro lado, de los tres colorantes ensayados, se obtuvo una mayor actividad específica con el negro ácido 194.

Tabla 2.- Actividades específicas de la enzima libre y de las nanopartículas, en la oxidación de los diversos contaminantes elegidos.

Sustrato	Longitud de onda (nm)	Actividad específica (min ⁻¹)	
		Enzima libre	Nanopartículas
Antraceno	255	0	0
Fenantreno	255	0	0
Pireno	270	0	0
Paratión	275	0	0
2,6-Dimetoxifenol	468	822.6 ± 37.2	143.2 ± 11.2
Catecol	220	60.6 ± 0.4	47.4 ± 0.1
Bisfenol A	280	83.4 ± 5.3	21.5 ± 4.3
β-Estradiol	220	185.5 ± 12.4	15.3 ± 1.3
4-Clorofenol	225	166.9 ± 23.1	23.3 ± 4.0
2,3,5,6-Tetraclorofenol	240	463.9 ± 13.7	91.6 ± 6.1
Pentaclorofenol	215	16.5 ± 0.9	20.4 ± 3.8
2,6-Dicloro-4-nitrofenol	255	176.6 ± 5.2	65.1 ± 10.0
Diclorofeno	280	96.0 ± 5.2	28.4 ± 1.7
Triclosan	280	53.2 ± 4.0	11.6 ± 0.1
Negro Ácido 194	575	1069.1 ± 21.8	239.3 ± 8.3
Azul Reactivo 198	625	372.3 ± 11.0	65.8 ± 2.0
Azul Brillante de Remazol R	592	65.2 ± 2.2	49.9 ± 1.6

Actividad específica= μmoles de sustrato transformados por minuto por μmol de enzima

7.8 Número total de recambio

El número total de recambio (TTN) nos indica el número de moles transformados por un catalizador durante el tiempo que el catalizador permanece activo. Al utilizar azul brillante de Remazol R

como sustrato se observó que la enzima libre posee un TTN mayor (29% más) que la enzima en nanopartículas. Sin embargo, en ambos casos la inactivación enzimática se presentó a los 150 minutos.

Tabla 3.- Número total de recambio utilizando azul brillante de Remazol R.

	TTN
Enzima Libre	715.1 ± 24.0
Nanopartículas	505.2 ± 5.7

TTN= μ moles de sustrato transformados por μ mol de enzima

7.9 Degradación microbiana

La susceptibilidad a la degradación microbiana de las nanopartículas biocatalíticas fue evaluada en condiciones reales de remediación. Las preparaciones se incubaron en aguas provenientes de una planta de tratamiento de lodos activados. De acuerdo a lo evaluado, las nanopartículas mantuvieron por mucho más tiempo su actividad en comparación con la enzima libre. Después de incubar por 24 horas con agua residual, la enzima libre perdió su actividad por completo, mientras que las nanopartículas mantuvieron 25% de su actividad inicial hasta por 48 horas (Figura 10).

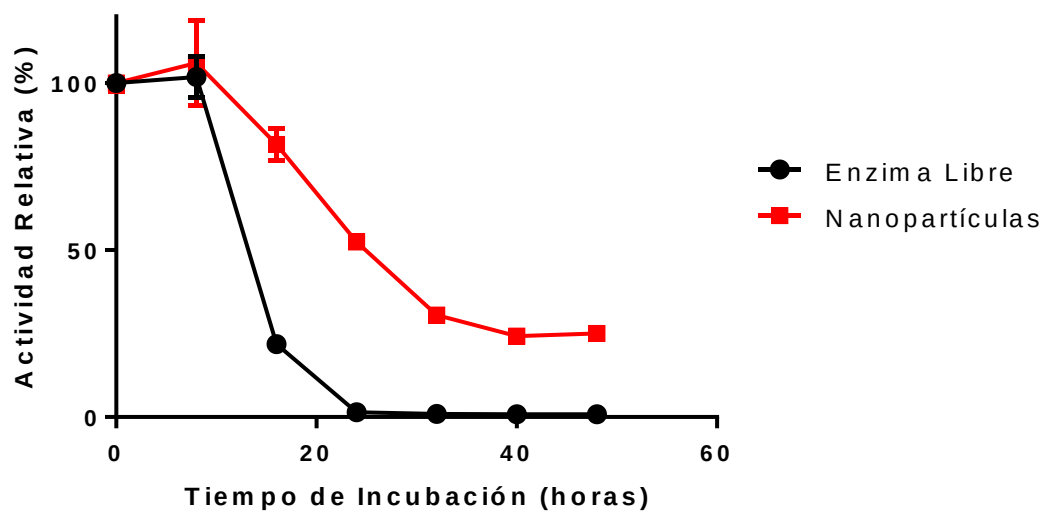


Figura 10.- Actividad relativa de la enzima libre y de las nanopartículas después de ser incubadas con aguas residuales conteniendo 4.34×10^5 UFC/mL.

7.10 Degradación por proteasas

La incubación de las nanopartículas y de la enzima libre con papaína demostró que la inmovilización de la VP la protege ante la degradación por proteasas. Después de incubar hasta por 7 horas, la enzima inmovilizada conservó hasta 62% de su actividad inicial, mientras que la enzima libre mantuvo solamente un 26%, como se observa en la Figura 11.

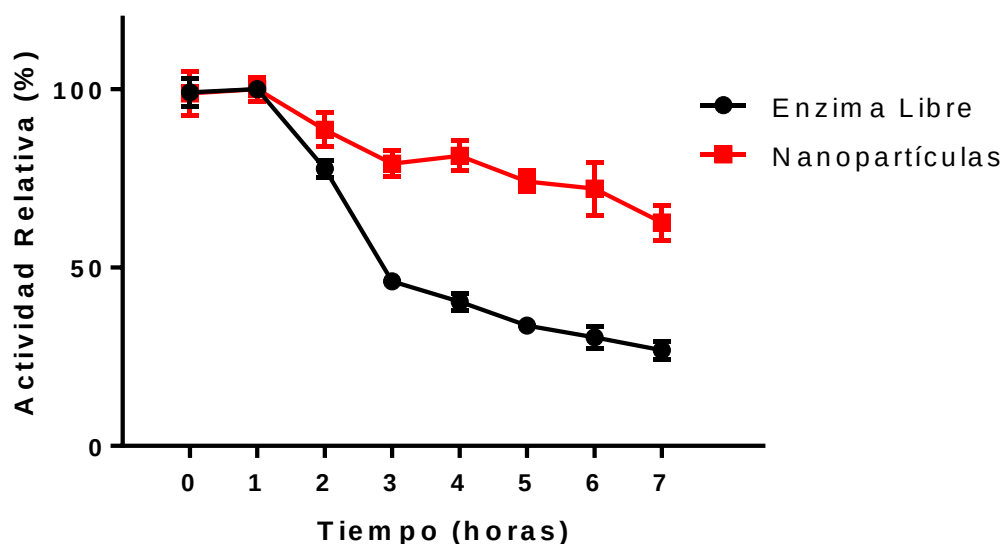


Figura 11.- Actividad relativa de la enzima libre y de las nanopartículas después de ser incubadas con la proteasa papaína.

7.11 Modificación química de las nanopartículas

Para incrementar su tiempo de vida en aguas residuales, las nanopartículas fueron modificadas en su superficie con diferentes aldehídos: formaldehído, benzaldehído, naftaldehído y antraldehído (Figura 12). Las nanopartículas modificadas químicamente en su superficie mostraron mejor estabilidad ante la degradación microbiana que la enzima libre y que las nanopartículas sin modificar. Los cuatro aldehídos utilizados presentaron actividades relativas muy similares. Después de 36 horas la enzima libre perdió su actividad por completo, y las nanopartículas sin modificar mantuvieron alrededor del 50% de su actividad inicial, mientras que las nanopartículas modificadas presentaron 150% de su actividad inicial.

Dicho comportamiento se prolongó hasta las 72 horas de incubación y posteriormente la actividad residual fue disminuyendo hasta llegar al 50% (Figuras 13 y 14).

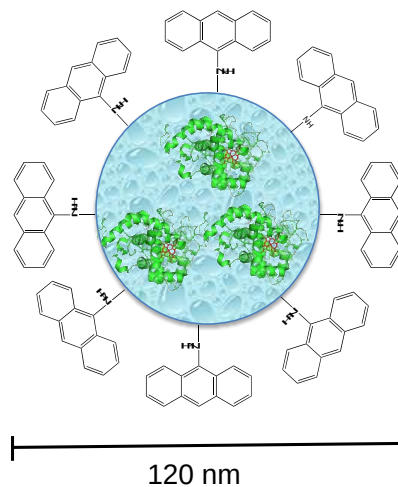


Figura 12. Esquema de la modificación química de la superficie de las nanopartículas de quitosano conteniendo la peroxidasa versátil.

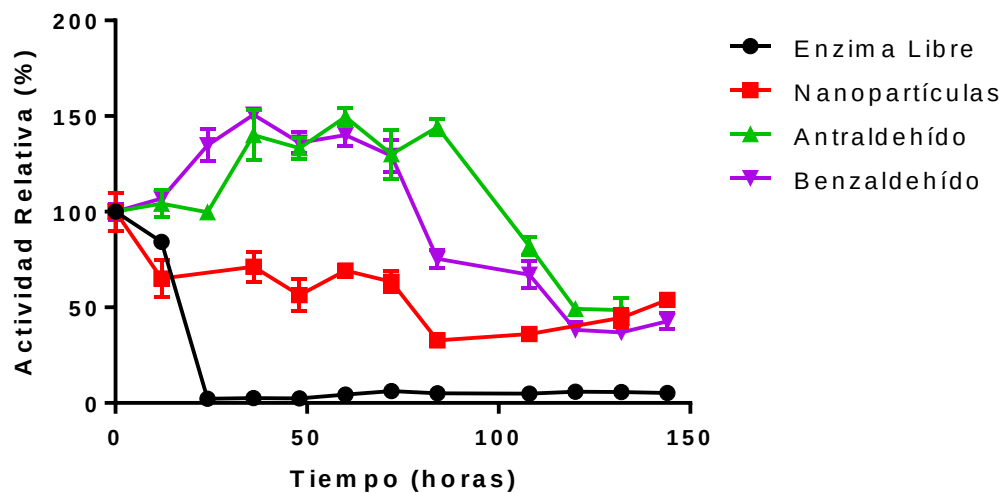


Figura 13.- Actividad relativa de la enzima libre, las nanopartículas sin modificar y las nanopartículas modificadas con antraldehído y benzaldehído, después de ser incubadas con aguas residuales conteniendo 1.88×10^4 UFC/mL.

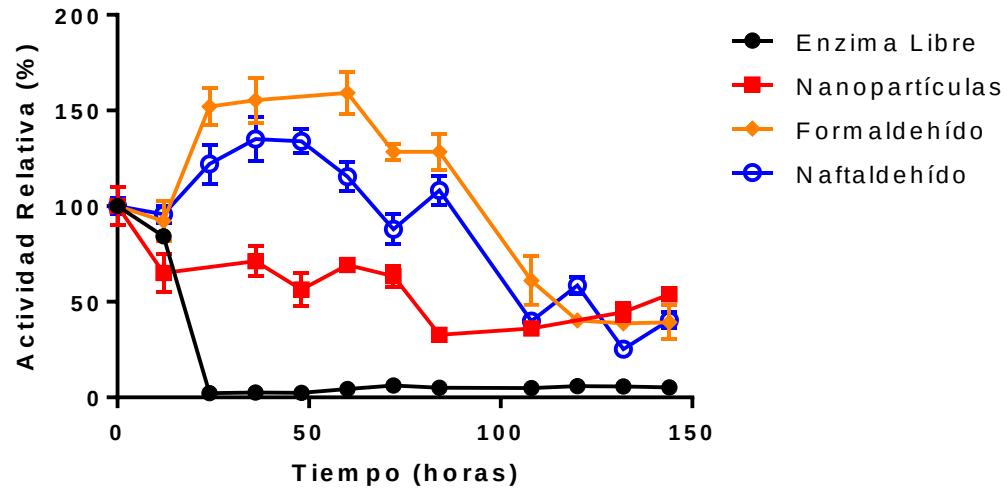


Figura 14.- Actividad relativa tanto de la enzima libre, las nanopartículas sin modificar y las nanopartículas modificadas con formaldehído y naftaldehído, después de ser incubadas con aguas residuales conteniendo 1.88×10^4 UFC/mL.

Capítulo 8. Discusión

8.1 Síntesis de nanopartículas de quitosano

Uno de los métodos de síntesis de nanopartículas de quitosano más utilizado y el que se escogió en este trabajo fue el de gelificación iónica, también conocido como gelificación ionotrópica. Mediante esta técnica, las nanopartículas se forman espontáneamente por interacciones inter- e intra-moleculares entre los grupos amino que se encuentran en la estructura del quitosano (que le confieren carácter policatiónico) y el polianión seleccionado (Figura 15) (Gan et al., 2005; Biró et al., 2008). En el presente trabajo se utilizó el polianión tripolifosfato de sodio (TPP) como entrecruzante debido a su habilidad de gelificación rápida. La forma y la distribución del tamaño de partículas en nuestro caso mostraron que esta técnica es efectiva para encapsular VP (Figura 6). La síntesis de nanopartículas de quitosano-TPP conteniendo proteínas ya ha sido reportada en diversos trabajos (Tang et al., 2006; Biró et al., 2008; Mohammadpour Dounighi et al., 2012; Bahreini et al., 2014; Koyani y Vazquez-Duhalt, 2016), sin embargo, hasta la fecha, éste es el primer trabajo en el que se inmoviliza la enzima peroxidasa versátil en nanopartículas de quitosano.

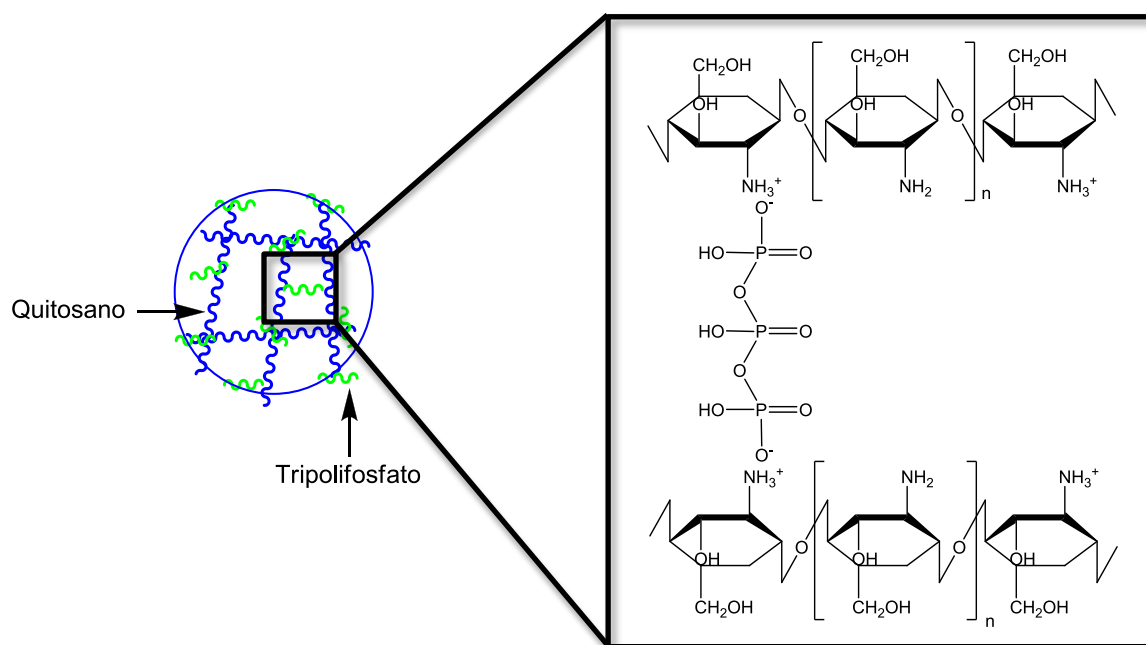


Figura 15.- Esquema de las nanopartículas de quitosano sintetizadas por el método de gelificación iónica. Donde se ilustra la interacción entre los grupos amino del quitosano y el TPP.

8.2 Efecto de la concentración de glutaraldehído

La adición de glutaraldehído como entrecruzante aumenta la estabilidad de la enzima inmovilizada al formar enlaces covalentes, que son más resistentes que los enlaces iónicos formados por el TPP. Sin embargo un exceso de entrecruzamiento puede provocar una alteración de la estructura tridimensional de la proteína, inactivándola. El glutaraldehído es un entrecruzante muy versátil debido a que forma oligómeros con una distribución de longitudes, lo que lo hace universal para entrecruzar grupos reactivos independientemente de la distancia a la que se encuentren (Migneault et al., 2004). En este trabajo se evaluó el efecto de diversas concentraciones de glutaraldehído (0.03, 0.06, 0.12, 0.24, 0.48 y 0.96 % (v/v)) sobre la actividad enzimática y la estabilidad al almacenamiento. La actividad enzimática alcanzó un máximo al utilizar glutaraldehído 0.12%, y posteriormente decrece conforme aumenta la concentración de glutaraldehído adicionada. Al haber una menor cantidad de glutaraldehído la proporción de enzima inmovilizada es menor, sin embargo y como se mencionó anteriormente al tener un exceso de entrecruzamiento, es posible que se generen obstáculos estructurales o que la enzima adquiera rigidez; lo que puede impedir que la enzima realice los cambios conformacionales necesarios para oxidar al sustrato, como fue sugerido por Cabana et al. (2007) y Chen et al. (2013) en el caso de la lacasa y de la β -galactosidasa respectivamente. Por otro lado, se observó que el aumento de estabilidad al almacenamiento es proporcional a la cantidad de glutaraldehído colocada durante la síntesis. Se sabe que el glutaraldehído puede aumentar la estabilidad de los soportes, esto permitiría que la enzima inmovilizada muestre mejores propiedades que la enzima libre, incluyendo una mejor estabilidad al almacenamiento (Hung et al., 2003; Migneault et al., 2004). Por esta razón, se decidió continuar los experimentos con nanopartículas preparadas con 0.48% de glutaraldehído, las cuales mantuvieron 55% de actividad inicial hasta por 20 días (Figura 5).

8.3 Caracterización de las nanopartículas

Los análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM) mostraron que las nanopartículas de quitosano presentan una forma esferoidal al inmovilizar la enzima. Esto se ha caracterizado en otros trabajos (Gan et al., 2005; Tang et al., 2006). El tamaño promedio de las nanopartículas fue de 125 nm, en otros trabajos el diámetro promedio reportado es de menos de 100 nm al inmovilizar proteinasa neutra (Tang et al., 2006) y lacasa (Koyani y Vazquez-Duhalt, 2016), 162 nm al inmovilizar β -galactosidasa, 265 nm al encapsular L-asparaginasa II (Bahreini et al., 2014) y hasta más de 300 nm al inmovilizar albúmina de suero bovino (Gan et al., 2005). El tamaño de nanopartícula puede estar

relacionado entre otros aspectos, a la cantidad de proteína colocada y a la participación de su carga durante la formación de las nanopartículas (Rampino et al., 2013; Bahreini et al., 2014), así como también a la proporción de quitosano/TPP (Bahreini et al., 2014).

8.4 Eficiencia de inmovilización

La eficiencia de inmovilización de nuestra preparación fue bastante buena, con un valor de 76.4% de la proteína presente. La cantidad de enzima inmovilizada depende de la proporción de quitosano/TPP usada así como de la cantidad de proteína. Se ha observado que proporciones de quitosano/TPP demasiado altas exhiben menores eficiencias de inmovilización (Bahreini et al., 2014; Koyani y Vazquez-Duhalt, 2016), por otro lado, la cantidad de enzima adicionada también juega un papel importante, mostrando mayor eficiencia al colocar más cantidad de enzima (Rampino et al., 2013; Bahreini et al., 2014).

8.5 Efecto del pH sobre la actividad enzimática

El pH es uno de los parámetros que más impacto tiene sobre la actividad enzimática en medios acuosos, por esta razón es importante evaluar el desempeño de la enzima antes y después de un proceso de inmovilización. Como se observó, tanto la enzima libre como la enzima inmovilizada presentaron un máximo de actividad a pH 4. Estos resultados concuerdan con lo obtenido anteriormente por diversos autores, los cuales demuestran que las enzimas inmovilizadas en nanopartículas de quitosano, y las enzimas libres en solución exhiben los mismos pH óptimos (Tang et al., 2006; Bahreini et al., 2014; Cahyaningrum y Sianita, 2014; Koyani y Vazquez-Duhalt, 2016). No obstante, en algunos estudios se ha encontrado que intervalo de actividad respecto al pH aumenta al inmovilizar la enzima (Tang et al., 2006; Koyani y Vazquez-Duhalt, 2016), en nuestro caso dichas mejoras solamente fueron observadas a pH 3, donde la enzima inmovilizada en nanopartículas mostró 45% de su actividad máxima, mientras que la enzima libre presentó únicamente un 5%. Esta protección a pH extremos puede deberse a la presencia de grupos ionizables (amino) en el quitosano (Çetinus y Öztop, 2003).

8.6 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

Al igual que la enzima libre, la enzima inmovilizada en nanopartículas mostró una actividad catalítica máxima a 40°C. Sin embargo, su intervalo óptimo de trabajo se amplió hasta 60°C mientras que la enzima libre presentó solamente 50% de su actividad inicial a dicha temperatura. Asimismo, la termoestabilidad de la enzima inmovilizada en nanopartículas fue mucho mayor que la de la enzima libre en solución. Tales incrementos se atribuyen a que el proceso de inmovilización le confiere a la enzima estabilidad ante altas temperaturas debido a que durante la formación de nanopartículas se crean enlaces inter- e intramoleculares que aumentan la rigidez de la enzima, evitando que se desnaturalice al someterla a condiciones de estrés térmico (Cabana et al., 2007; Cahyaningrum y Sianita, 2014). Comportamientos similares se han observado al inmovilizar enzimas en materiales basados en quitosano (Tang et al., 2006; Monier et al., 2010; Cahyaningrum y Sianita, 2014; Bahreini et al., 2014).

8.7 Parámetros cinéticos

Los cambios ocasionados en las constantes catalíticas debido al proceso de inmovilización, indican que la afinidad hacia el sustrato hidrofóbico (2,6-DMP) se modificó ya que se presentó un aumento en la K_M y una disminución de la k_{cat} en comparación con la enzima libre. Esta característica común al inmovilizar enzimas puede estar relacionada a las limitaciones en la transferencia de masa hacia los sitios activos de la enzima al estar embebida en la matriz de quitosano. El carácter hidrofílico del quitosano queda demostrado por los valores iguales de K_M para el peróxido de hidrógeno, que es una molécula similar al agua, en la enzima libre e inmovilizada. La creación de microambientes formados por los soportes, genera limitaciones de transferencia de masa que se ven reflejadas en los rendimientos catalíticos obtenidos (Hung et al., 2003; Krajewska, 2004; Monier et al., 2010). Por otro lado, al evaluar el número de total de recambio (TTN) utilizando azul brillante de Remazol R, no se observaron cambios en la velocidad de inactivación de la enzima debido al proceso de inmovilización. Esto también en acuerdo con el hecho de que el H_2O_2 tiene el mismo acceso a la enzima.

8.8 Transformación de diversos contaminantes

De los diferentes contaminantes evaluados (Tabla 2, Anexo 2), no fue posible degradar los tres aromáticos policíclicos (antraceno, fenantreno y pireno). Esta clase de contaminantes son altamente recalcitrantes y más difíciles de biodegradar que hidrocarburos simples, debido a su estructura compleja y su alto potencial de ionización. Sin embargo, la oxidación de HAPs por parte de enzimas ligninolíticas ya ha sido reportada con anterioridad. Incluso se ha utilizado peroxidasa versátil proveniente de *B. fumosa* para tratar diversos HAPs incluyendo antraceno y fenantreno. No obstante, a diferencia de este trabajo, los tratamientos fueron llevados a cabo en presencia de manganeso (Gianfreda y Rao, 2004; Pozdnyakova et al., 2013) que es un mediador redox. Por otro lado, ya se ha estudiado la transformación de pesticidas organofosforados utilizando hongos de la podredumbre blanca como *B. adusta*, *P. ostreatus* y *P. chrysosporium* (Torres y Ayala, 2010). El insecticida organofosforado paratión no fue degradado por nuestras preparaciones. Sin embargo, en el presente trabajo se lograron degradar diversos contaminantes fenólicos y sus derivados, incluyendo algunos fenoles clorados. Se sabe que esta clase de compuestos son altamente tóxicos a concentraciones bajas, y además se sospecha que pueden tener efectos mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos (Nešvera et al., 2015). Éstos, se encuentran principalmente en efluentes industriales, aguas residuales domésticas o provenir de escorrentía agrícola o derrames químicos (Lin y Juang, 2009). Específicamente ya se ha demostrado la capacidad de la VP de *B. adusta* para transformar pesticidas halogenados como diclorofeno y pentaclorofenol (Davila-Vazquez et al., 2005). A pesar de que existen varios trabajos donde se ha demostrado el tratamiento de fenoles y sus derivados utilizando enzimas inmovilizadas (Husain y Ulber, 2011) poco trabajos han explorado la degradación de fenoles utilizando enzimas inmovilizadas en nanomateriales (Husain y Ulber, 2011; Gasser et al., 2014). Asimismo, se degradaron algunos disruptores endócrinos (bisfenol A, β -estradiol y triclosan), esta clase de contaminantes se encuentra principalmente en efluentes de aguas residuales (Torres y Ayala, 2010; Srivastava et al., 2015). Varios autores han logrado la degradación de bisfenol A, β -estradiol y triclosan utilizando enzimas como lacasa y peroxidasa versátil (Cabana et al., 2007; Cabana et al., 2011; Taboada-Puig et al., 2011; Gasser et al., 2014; Taboada-Puig et al., 2015). Por último, también fue posible degradar algunos colorantes industriales como negro ácido 194, azul brillante de Remazol R y azul reactivo 198. La habilidad de la VP de *B. adusta* para degradar varios tipos de colorantes industriales ya ha sido demostrada (Tinoco et al., 2007; Baratto et al., 2015). Como se observó en los resultados obtenidos (Tabla 2), en la mayoría de los contaminantes evaluados, la enzima libre presentó actividades específicas más altas que la enzima inmovilizada, que como ya se discutió es consecuencia de la inmovilización de enzimas. Independientemente a no haber utilizado condiciones de saturación para cada uno de los sustratos evaluados, las variaciones en las actividades específicas de los

contaminantes puede deberse a la afectación de la afinidad entre el sustrato y la enzima cuando esta se encuentra embebida en el soporte hidrofílico de quitosano.

8.9 Estabilidad ante la degradación microbiana

Una de las principales limitaciones de la aplicación de enzimas en biorremediación es su susceptibilidad a ser metabolizadas por los microorganismos presentes en los efluentes o sitios contaminados (Rao et al., 2010). Esta susceptibilidad se refleja en tiempos de vida cortos y por lo tanto en conversiones demasiado bajas para aplicaciones a gran escala (Sukan y Sargin, 2013). Este trabajo demostró que la inmovilización de peroxidasa versátil en nanopartículas de quitosano la protege eficientemente ante la degradación microbiana, aumentando el tiempo de vida útil de la enzima al ser colocada en aguas de tratamiento con alta abundancia microbiana. Se observó que la enzima libre es degradada por completo después de estar 24 horas en presencia de microorganismos, mientras que la enzima inmovilizada mantuvo 50% de su actividad inicial. Estos resultados son similares a los obtenidos al inmovilizar lacasa en nanopartículas de quitosano (Koyani y Vazquez-Duhalt, 2016).

Con el fin de mejorar aún más la estabilidad de las nanopartículas ante la degradación microbiana, se decidió modificar químicamente la superficie de las mismas al unir covalentemente diversos aldehídos a los grupos amino libre restantes en el quitosano. Efectivamente, al evaluar la actividad de las preparaciones, se observó que en todos los casos la estabilidad de las nanopartículas modificadas es mucho mayor que las nanopartículas sin modificar y por consiguiente que la enzima libre en solución. Algunos estudios han demostrado que la modificación con aldehídos reduce la hidrofiliidad del quitosano (Soliman et al., 2013; Eldin et al., 2015). Por lo tanto, se infiere que la adición de estos hidrocarburos a la superficie de las nanopartículas puede estar dificultando la degradación por parte de los microorganismos debido a un aumento en su hidrofobicidad reduciendo su biodisponibilidad.

8.10 Estabilidad ante la degradación por proteasas

Para confirmar que la nanoinmovilización de la enzima la protege de la actividad proteolítica de los microorganismos se evaluó la degradación de la VP tanto en su forma libre como inmovilizada, por acción de la proteasa papaína. Después de 7 horas de incubación, la VP inmovilizada retuvo 63% de su

actividad inicial, mientras que la enzima libre solamente mantuvo 27%. La capacidad del quitosano de proteger enzimas ante la degradación por proteasas ya ha sido demostrada anteriormente (Degroot y Neufeld, 2001; Chung et al., 2006; Chen et al., 2015; Sáez et al., 2015). Las nanopartículas de quitosano no solamente previenen el contacto de las proteasas con la VP, sino que también permiten que la enzima oxide sustratos (Degroot y Neufeld, 2001; Chung et al., 2006).

Capítulo 9. Conclusiones

El método de gelificación iónica permitió la obtención de nanopartículas de quitosano estables con actividad peroxidasa bajo condiciones suaves de reacción. El uso de nanopartículas de quitosano para la inmovilización de peroxidasa versátil demostró su protección efectiva ante degradación microbiana y ante la acción de proteasas. Además, la modificación de la superficie utilizando diversos aldehídos mejoró aún más la estabilidad enzimática, por lo que las nanopartículas de quitosano modificadas surgen como una alternativa atractiva a los métodos convencionales, para su uso en la degradación de diversos contaminantes incluyendo pesticidas halogenados, disruptores endócrinos y colorantes industriales en condiciones reales de biorremediación. Esto es importante ya que a pesar de que las enzimas poseen características que hacen posible su utilización en una amplia variedad de aplicaciones tecnológicas incluyendo la biorremediación, su susceptibilidad a las condiciones a las que deben ser sometidas limita su aplicación en sistemas reales de remediación. Además, el quitosano es un material biodegradable, biocompatible e hidrofílico que lo hace ideal para inmovilizar y mejorar la estabilidad de enzimas con aplicaciones ambientales.

Literatura Citada

- Alcalde, M., Ferrer, M., Plou, F. J., y Ballesteros, A. 2006. Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. *Trends in Biotechnology*, 24(6), 281–287.
- Ansari, S. A., y Husain, Q. 2012. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. *Biotechnology Advances*, 30(3), 512–523.
- Asgher, M., Bhatti, H. N., Ashraf, M., y Legge, R. L. 2008. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation*, 19(6), 771–783.
- Bahreini, E., Aghaiypour, K., Abbasalipourkabir, R., Mokarram, A. R., Goodarzi, M. T., y Saidijam, M. 2014. Preparation and nanoencapsulation of L-asparaginase II in chitosan-tripolyphosphate nanoparticles and in vitro release study. *Nanoscale research letters*, 9(1), 1–13.
- Baratto, M. C., Juarez-Moreno, K., Pogni, R., Basosi, R., y Vazquez-Duhalt, R. 2015. EPR and LC-MS studies on the mechanism of industrial dye decolorization by versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(11), 8683–8692.
- Biró, E., Németh, A. S., Sisak, C., Feczko, T., y Gyenis, J. 2008. Preparation of chitosan particles suitable for enzyme immobilization. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 70(6), 1240–1246.
- BTNEP. 2015. Oil & Grease. Consultado el 3 de mayo del 2015, de <http://www.btnep.org/subsites/water/estuarywater/pollutants/oilandgrease.aspx>
- Cabana, H., Ahamed, A., y Leduc, R. 2011. Conjugation of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor* to chitosan and its utilization for the elimination of triclosan. *Bioresource technology*, 102(2), 1656–1662.
- Cabana, H., Jones, J. P., y Agathos, S. N. 2007. Preparation and characterization of cross-linked laccase aggregates and their application to the elimination of endocrine disrupting chemicals. *Journal of biotechnology*, 132(1), 23–31.
- Cahyaningrum, S. E., y Sianita, M. M. 2014. Immobilization of pepsin onto chitosan silica nanobeads with glutaraldehyde as crosslink agent. *Bulletin of Chemical Reaction Engineering and Catalysis*, 9(3), 263–269.
- Çetinus, Ş. A., y Öztop, H. N. 2003. Immobilization of catalase into chemically crosslinked chitosan beads. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(7), 889–894.
- Chen, H., Zhang, Q., Dang, Y., y Shu, G. 2013. The effect of glutaraldehyde cross-linking on the enzyme activity of immobilized β -galactosidase on chitosan bead. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 5(7), 932–935.
- Chen, J., Liu, C., Shan, W., Xiao, Z., Guo, H., y Huang, Y. 2015. Enhanced stability of oral insulin in targeted peptide ligand trimethyl chitosan nanoparticles against trypsin. *Journal of Microencapsulation*, 32(7), 1–10.

- Chung, K. H., Park, S. H., Kim, M. K., Park, H. D., y Son, T. Il. 2006. Stabilization of Epidermal Growth Factor on Thermal and Proteolytic Degradation by Conjugating with Low Molecular Weight Chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, 102(5).
- Das, S. 2014. *Microbial Biodegradation and Bioremediation*. Elsevier Inc., India.
- Davila-Vazquez, G., Tinoco, R., Pickard, M. A., y Vazquez-Duhalt, R. 2005. Transformation of halogenated pesticides by versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(2-3), 223–231.
- Degroot, A. R., y Neufeld, R. J. 2001. Encapsulation of urease in alginate beads and protection from α -chymotrypsin with chitosan membranes. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(6-7), 321–327.
- EPA. 2008. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). Consultado el 14 de junio del 2015 de <http://www3.epa.gov/epawaste/hazard/wastemin/minimize/factshts/pahs.pdf>
- EPA. 2012. Major Contaminants. Consultado el 14 de junio del 2015 de <http://water.epa.gov/polwaste/sediments/cs/contaminants.cfm>
- Fairfax County. 2015. Heavy Metal Pollution Is More Common Than You Think. Consultado el 16 de junio del 2015 de <http://www.fairfaxcounty.gov/nvswcd/newsletter/heavymetal.htm>
- Gan, Q., Wang, T., Cochrane, C., y Mccarron, P. 2005. Modulation of surface charge , particle size and morphological properties of chitosan–TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 44, 65–73.
- Gasser, C. a., Yu, L., Svojitka, J., Wintgens, T., Ammann, E. M., Shahgaldian, P., Corvini, P., y Hommes, G. 2014. Advanced enzymatic elimination of phenolic contaminants in wastewater: a nano approach at field scale. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 3305–3316.
- Gianfreda, L., y Rao, M. A. 2004. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(4), 339–354.
- Grenha, A. 2012. Chitosan nanoparticles : a survey of preparation methods. *Journal of Drug Targeting*, 20(4), 291–300.
- Grenha, A., Seijo, B., y Remuñán-López, C. 2005. Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25, 427–437.
- Hamid, M., y Khalil-ur-Rehman. 2009. Potential applications of peroxidases. *Food Chemistry*, 115(4), 1177–1186.
- Hung, T.-C., Giridhar, R., Chiou, S.-H., y Wu, W.-T. 2003. Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 26(1-2), 69–78.
- Husain, Q., y Ulber, R. 2011. Immobilized Peroxidase as a Valuable Tool in the Remediation of Aromatic Pollutants and Xenobiotic Compounds: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 41(8), 770–804.
- Karigar, C. S., y Rao, S. S. 2011. Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants : A Review. *Enzyme Research*, 2011.

- Khan, F. I., Husain, T., y Hejazi, R. 2004. An overview and analysis of site remediation technologies. *Journal of Environmental Management*, 71(2), 95–122.
- Kim, J., Grate, J. W., y Wang, P. 2008. Nanobiocatalysis and its potential applications. *Trends in Biotechnology*, 26(11), 639–646.
- Koukaras, E. N., Papadimitriou, A., Bikiaris, D. N., y Froudakis, G. E. 2012. Insight on the Formation of Chitosan Nanoparticles through Ionotropic Gelation with Tripolyphosphate. *Molecular Pharmaceutics*, 9, 2856–2862.
- Koyani, R. D., y Vazquez-Duhalt, R. 2016. Laccase encapsulation in chitosan nanoparticles enhances the protein stability against microbial degradation. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(18), 18850–18857.
- Krajewska, B. 2004. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations : a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(2), 126–139.
- Lin, S.-H., y Juang, R.-S. 2009. Adsorption of phenol and its derivatives from water using synthetic resins and low-cost natural adsorbents: A review. *Journal of environmental management*, 90(3), 1336–1349.
- Marrazza, G. 2014. Piezoelectric Biosensors for Organophosphate and Carbamate Pesticides: A Review. *Biosensors*, 4, 301–317.
- Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M. J., y Waldron, K. C. 2004. Glutaraldehyde : behavior in aqueous solution , reaction with proteins , and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques*, 37(5), 790-802.
- Min, K., y Yoo, Y. J. 2014. Recent progress in nanobiocatalysis for enzyme immobilization and its application. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 19(4), 553–567.
- Mohammadpour Dounighi, N., Eskandari, R., Avadi, M., Zolfagharian, H., Mir Mohammad Sadeghi, A., y Rezayat, M. 2012. Preparation and in vitro characterization of chitosan nanoparticles containing *Mesobuthus eupeus* scorpion venom as an antigen delivery system. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 18(1), 44–52.
- Mohorčič, M., Benčina, M., Friedrich, J., y Jerala, R. 2009. Expression of soluble versatile peroxidase of *Bjerkandera adusta* in *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*, 100(2), 851–858.
- Monier, M., Ayad, D. M., Wei, Y., y Sarhan, A. A. 2010. Immobilization of horseradish peroxidase on modified chitosan beads. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46(3), 324–330.
- Nešvera, J., Rucká, L., y Pátek, M. 2015. Catabolism of Phenol and Its Derivatives in Bacteria: Genes, Their Regulation, and Use in the Biodegradation of Toxic Pollutants. *Advances in applied microbiology*, 93, 107–160.
- NSF. 2014. Nanotechnology definition. Consultado el 22 de diciembre del 2014 de http://www.nsf.gov/crssprgm/nano/reports/omb_nifty50.jsp
- Ohya, Y., Shiratani, M., Kobayashi, H., y Ouchi, T. 1994. Release Behavior of 5-Fluorouracil from Chitosan-Gel Nanospheres Immobilizing 5-Fluorouracil Coated with Polysaccharides and Their Cell Specific Cytotoxicity. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 31(5), 629–642.

- Pérez-Boada, M., Ruiz-Dueñas, F. J., Pogni, R., Basosi, R., Choinowski, T., Martínez, M. J., Piontek, K., y Martínez, A. T. 2005. Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: Site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigation of three long-range electron transfer pathways. *Journal of Molecular Biology*, 354(2), 385–402.
- Pozdnyakova, N., Makarov, O., Chernyshova, M., Turkovskaya, O., y Jarosz-Wilkolazka, A. 2013. Versatile peroxidase of *Bjerkandera fumosa*: Substrate and inhibitor specificity. *Enzyme and Microbial Technology*, 52(1), 44–53.
- Qayyum, H., Maroof, H., y Yasha, K. 2009. Remediation and treatment of organopollutants mediated by peroxidases: a review. *Critical reviews in biotechnology*, 29(2), 94–119.
- Rampino, A., Borgogna, M., Blasi, P., Bellich, B., y Cesàro, A. 2013. Chitosan nanoparticles : Preparation , size evolution and stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 455(1-2), 219–228.
- Rao, M., Scelza, R., Scotti, R., y Gianfreda, L. 2010. Role of Enzymes in the Remediation of Polluted Environments. *Journal of soil science and plant nutrition*, 10(3), 333–353.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., y Nigam, P. 2001. Remediation of dyes in textile effluent: A critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology*, 77(3), 247–255.
- Rodakiewicz-Nowak, J., Jarosz-Wilkolazka, A., y Luterek, J. 2006. Catalytic activity of versatile peroxidase from *Bjerkandera fumosa* in aqueous solutions of water-miscible organic solvents. *Applied Catalysis A: General*, 308, 56–61.
- Ruiz-Dueñas, F. J., y Martínez, Á. T. 2009. Microbial degradation of lignin: How a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microbial Biotechnology*, 2(2), 164–177.
- Ruiz-Dueñas, F. J., Morales, M., García, E., Miki, Y., Martínez, M. J., y Martínez, A. T. 2009. Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases. *Journal of Experimental Botany*, 60(2), 441–452.
- Sáez, M. I., Barros, A. M., Vizcaíno, A. J., López, G., Alarcón, F. J., y Martínez, T. F. 2015. Effect of alginate and chitosan encapsulation on the fate of BSA protein delivered orally to gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Animal Feed Science and Technology*, 210, 114–124.
- Sáez-Jiménez, V., Acebes, S., Guallar, V., Martínez, A. T., y Ruiz-Dueñas, F. J. 2015. Improving the oxidative stability of a high redox potential fungal peroxidase by rational design. *PLoS ONE*, 10(4), 1–17.
- Siddiqui, K. S., Ertan, H., Charlton, T., Poljak, A., Daud Khaled, A. K., Yang, X., Marshall, G., y Cavicchioli, R. 2014. Versatile peroxidase degradation of humic substances: Use of isothermal titration calorimetry to assess kinetics, and applications to industrial wastes. *Journal of Biotechnology*, 178(1), 1–11.
- Singh, B. K., y Walker, A. 2006. Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(3), 428–471.
- Singh, K., y Mishra, A. 2015. Chitosan Nanoparticulate and Their Applications: A Review. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 6(2), 36–52.

- Singh, S. N., y Tripathi, R. D. 2007. Environmental Bioremediation Technologies. Springer, India.
- Srivastava, S., Gupta, P., Chandolia, A., y Alam, I. 2015. Bisphenol A: A Threat to Human Health? J Environ Health, 77(6), 20–26.
- Sukan, A., y Sargin, S. 2013. Enzymatic Removal of Phenol from Industrial Wastewaters. Journal Biomaterials and Nanobiotechnology, 4, 300–307.
- Taboada-Puig, R., Junghanns, C., Demarche, P., Moreira, M. T., Feijoo, G., Lema, J. M., y Agathos, S. N. 2011. Combined cross-linked enzyme aggregates from versatile peroxidase and glucose oxidase: production, partial characterization and application for the elimination of endocrine disruptors. Bioresource technology, 102(11), 6593–6599.
- Taboada-Puig, R., Lu-Chau, T. A., Eibes, G., Feijoo, G., Moreira, M. T., y Lema, J. M. 2015. Continuous removal of endocrine disruptors by versatile peroxidase using a two-stage system. Biotechnology Progress, 31(4), 908–916.
- Tang, Z. X., Qian, J. Q., y Shi, L. E. 2006. Characterizations of immobilized neutral proteinase on chitosan nano-particles. Process Biochemistry, 41(5), 1193–1197.
- Tang, Z.-X., Qian, J.-Q., y Shi, L.-E. 2007. Characterizations of immobilized neutral lipase on chitosan nano-particles. Material Letters, 61(1), 37–40.
- Tinoco, R., Verdin, J., y Vazquez-Duhalt, R. 2007. Role of oxidizing mediators and tryptophan 172 in the decoloration of industrial dyes by the versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 46(1-4), 1–7.
- Torres, E., y Ayala, M. 2010. Biocatalysis Based on Heme Peroxidases. Peroxidases as potential industrial biocatalysts. Springer, México.
- Touahar, I. E., Haroune, L., Ba, S., Bellenger, J.-P., y Cabana, H. 2014. Characterization of combined cross-linked enzyme aggregates from laccase, versatile peroxidase and glucose oxidase, and their utilization for the elimination of pharmaceuticals. Science of The Total Environment, 481, 90–99.
- Wong, D. W. S. 2009. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. Applied Biochemistry and Biotechnology, 157(2), 174-209.
- WWF. 2015. Pollution. Consultado el 10 de mayo de 2015 de <http://www.worldwildlife.org/threats/pollution>
- Yao, R. S., Sun, M., Wang, C. L., y Deng, S. S. 2006. Degradation of phenolic compounds with hydrogen peroxide catalyzed by enzyme from *Serratia marcescens* AB 90027. Water Research, 40(16), 3091–3098.
- Zhao, L.-M., Shi, L., Zhang, Z.-L., Chen, J.-M., Shi, D.-D., Yang, J., y Tang, Z.-X. 2011. Preparation and Application of Chitosan Nanoparticles and Nanofibers, Brazilian Journal of Chemical Engineering, 28(03), 353–362.

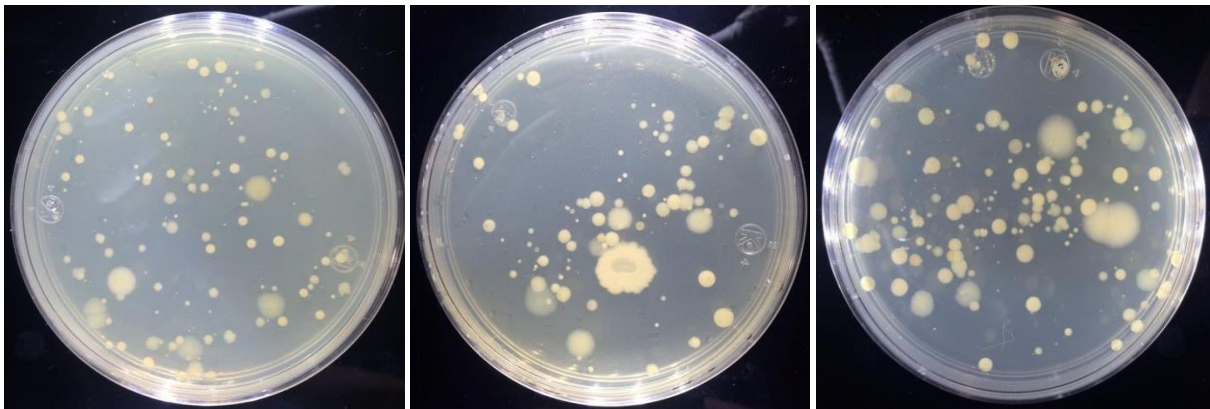
Anexos

Anexo 1

Fórmula utilizada para calcular las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) colocadas en los ensayos de degradación microbiana, después de determinar la cantidad de microorganismos colocados mediante la técnica de recuento en placa:

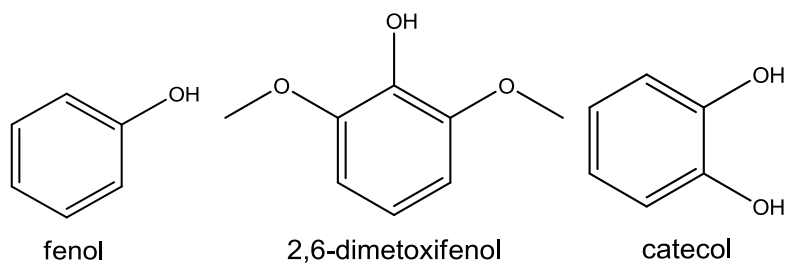
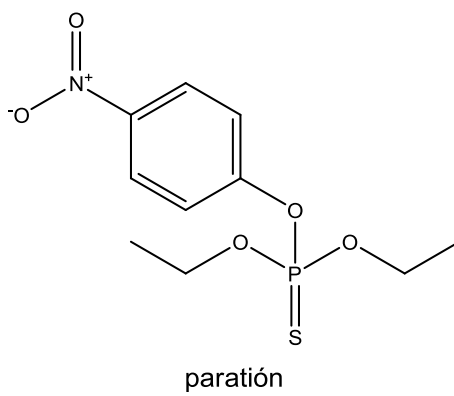
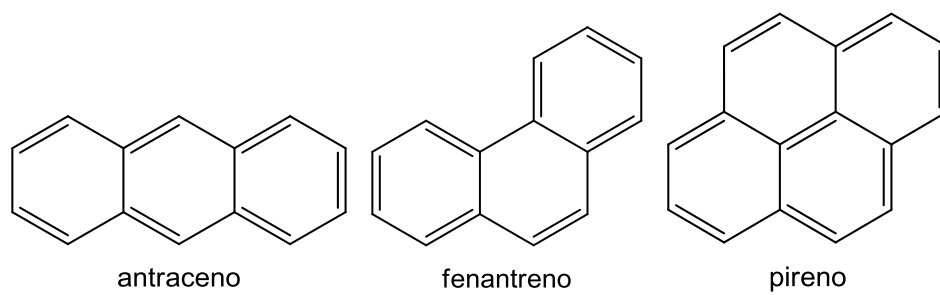
$$\frac{UFC}{mL} = \frac{\text{número de colonias} * \text{factor de dilución}}{\text{volumen de la placa}}$$

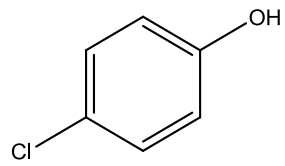
Cajas Petri inoculadas con 5 µL de agua de tratamiento proveniente de la planta en UABC, utilizada para los experimentos de degradación microbiana con las nanopartículas modificadas químicamente en su superficie.



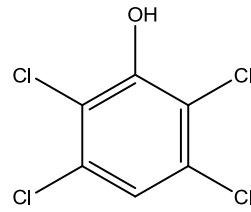
Anexo 2

Estructuras de los contaminantes evaluados.

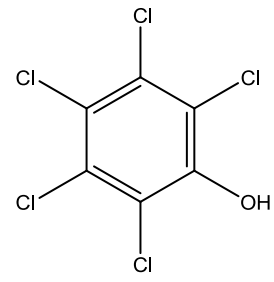




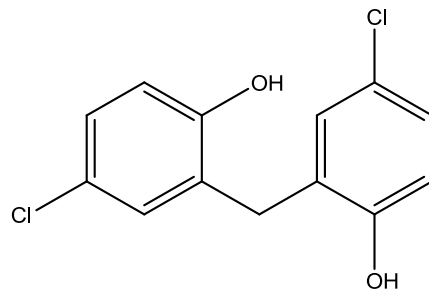
4-clorofenol



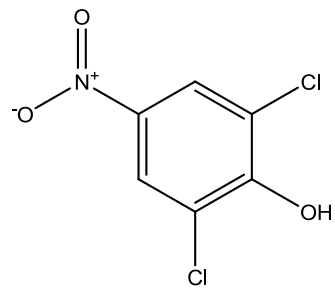
2,3,5,6-tetraclorofenol



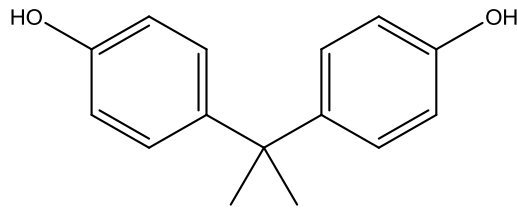
pentaclorofenol



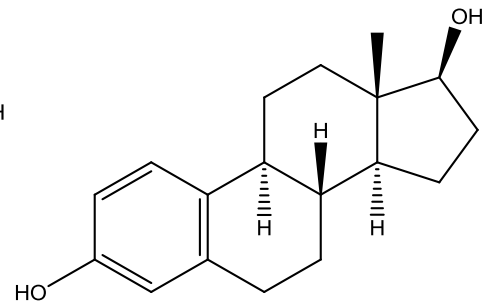
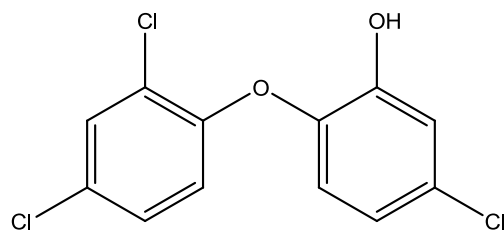
diclorofeno



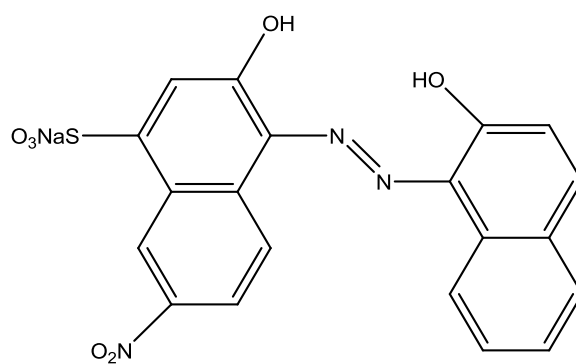
2,6-dicloro-4-nitrofenol



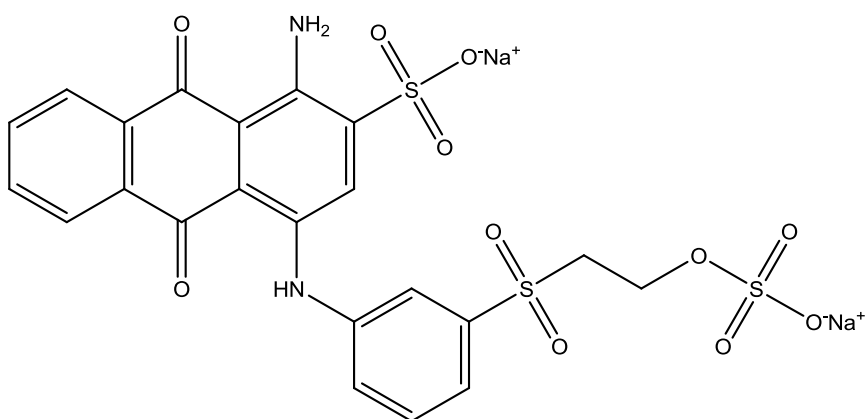
bisfenol A

 β -estradiol

triclosan



negro ácido 194



azul brillante de remazol r

