

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



---

**Maestría en Ciencias  
en Nanociencias**

---

**Diseño de nanocajas biocatalíticas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$**

Tesis

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

Presenta:

**Omar Silva Torres**

Ensenada, Baja California, México

2018

Tesis defendida por  
**Omar Silva Torres**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dr. Rafael Vázquez Duhalt**  
Director de tesis

**Dr. Andrey Simakov**

**Dra. Ernestina Castro Longoria**



---

**Dr. Sergio Fuentes Moyado**  
Coordinador del Posgrado en Nanociencias

---

**Dra. Rufina Hernández Martínez**  
Directora de Estudios de Posgrado

*Omar Silva Torres © 2018*

*Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.*

Resumen de la tesis que presenta **Omar Silva Torres** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias.

### **Diseño de nanocajas biocatalíticas de $\text{Cu}(\text{OH})_2$**

Resumen aprobado por:

---

Dr. Rafael Vázquez Duhalt  
**Director de tesis**

La nanobiocatálisis es la combinación de las propiedades únicas de los materiales a escala nanométrica con la eficiencia y sofisticación de la catálisis bioquímica y representa una oportunidad para mejorar los procesos de transformación catalítica. Las transformaciones enzimáticas son ya muy usadas en procesos industriales, remediación ambiental y usos médicos demostrando proveer ventajas importantes. En este trabajo se sintetizaron nanocajas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  con un tamaño promedio de 170 nm para su uso como soporte en la conjugación de enzimas ligninolíticas. Estas enzimas catalizan la oxidación de un gran número de compuestos contaminantes. Las nanocajas fueron caracterizadas por difracción de rayos X, microscopía electrónica de transmisión, espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier, análisis termogravimétrico, espectroscopía UV-Vis y medición del potencial zeta. A través del análisis de rayos X se confirmó el arreglo ortorrómbico de las nanocajas, y los resultados de TEM mostraron que éstas están compuestas por nanocintas apiladas una sobre otra. Previo a la conjugación, las nanocajas fueron funcionalizadas con el compuesto (3-aminopropil)-trimetoxisilano (APTMS), y se confirmó mediante la técnica FTIR. Las enzimas lacasa (Lac) y peroxidasa versátil (VP) fueron conjugadas sobre la superficie de las nanocajas funcionalizadas. Los análisis de TEM, potencial zeta y UV-Vis confirmaron la presencia de las enzimas sobre las nanocajas. Las micrografías muestran una capa externa sobre la superficie, el cual no aparecía antes de la conjugación. El espesor promedio de las capas fue de 11 y 8 nm para la VP y lacasa, respectivamente, las cuales corresponden al diámetro promedio reportado para las enzimas. La cuantificación de proteína contenida en cada muestra de nanocajas-enzima fue realizada mediante el ensayo Bio-Rad. En los experimentos de actividad catalítica se utilizaron los sustratos ABTS y 2,6-dimetoxifenol. Las mediciones de actividad con nanocajas sin enzimas mostraron que éstas catalizan la oxidación de los sustratos en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , la cual confirma su actividad peroxidasa intrínseca. Las nanocajas en las que se conjugó la enzima lacasa (nanocajas-Lac) presentaron mejor rendimiento catalítico que el reportado para la enzima libre, al contrario de las nanocajas-VP que su rendimiento se redujo considerablemente. La presencia de iones de cobre en el sitio activo de la lacasa y su reemplazamiento por el cobre de las nanocajas puede ser el origen de la mejor actividad de la lacasa conjugada en las nanocajas.

**Palabras clave:** nanocajas, hidróxido de cobre, lacasa, peroxidasa versátil, biorremediación.

Abstract of the thesis presented by **Omar Silva Torres** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanoscience.

### **Design of biocatalytic nanocages of copper hydroxide**

Abstract approved by:

---

PhD. Rafael Vázquez Duhalt  
Thesis Director

Nanobiocatalysis is the combination of the unique properties of nanosized materials and the efficiency and sophistication of enzymes, and represent an opportunity niche to improve the catalytical transformations. Enzyme are widely used in industrial processes, environmental remediation and biomedical uses showing important advantages. In this work,  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  nanocages with an average size of 170 nm were synthesized to be used as a support for the conjugation of ligninolytic enzymes. These enzymes have the ability to degrade a wide range of pollutants. These nanocages were extensively characterized by X-ray diffraction, transmission electron microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, thermogravimetric analysis, UV-Vis spectroscopy and zeta potential measurement. Through the XRD analysis, the orthorhombic arrangement of the nanocages was confirmed, and TEM images showed that the nanocages are composed of nanoribbons stacked around the particles. Before conjugation, the nanocages were functionalized with the reagent (3-aminopropyl)-trimethoxysilane (APTMS), and confirmed by the FTIR technique. Laccase (Lac) and peroxidase versatile (VP) enzymes were conjugated on the surface of the functionalized nanocages. The results of TEM, zeta potential and UV-Vis confirmed the presence of the enzymes in the nanocages. The micrographs showed an outer layer on the surface, which did not appear before conjugation. The average thickness of the layers was 11 and 8 nm for the VP and laccase, respectively, which correspond to the average diameter reported for each enzyme molecules. The quantification of protein was performed by the Bio-Rad assay. ABTS and 2,6-dimethoxyphenol were used as substrates in the catalytic activity determination. The catalytic activity of nanocages, without enzymes, showed that they are able to catalyze the oxidation of some substrates in the presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , which confirms their peroxidase like activity. Nanocages-Lac exhibited better catalytic performance that the reported for the free enzyme, while activity of nanocages-VP was considerably reduced. The presence of copper ions in the enzyme's activity site and the possible replacement by copper ions from the nanocage structure could be the origin for the better catalytic performance of laccase-conjugated nanocages.

**Keywords:** nanocages, copper hydroxide, laccase, versatile peroxidase, bioremediation.

## Dedicatoria

A mi madre Leticia,  
mis hermanos Fernando, Iván y Sayari,

y hasta el cielo, para papá.

## Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría. A CICESE y CNYN-UNAM por la formación académica.

Agradezco al Dr. Rafael por permitirme llevar a cabo este proyecto, por sus enseñanzas y su paciencia. A los miembros de mi comité, al Dr. Andrey y a la Dra. Ernestina por sus valiosos aportes para enriquecer este trabajo.

A la Dra. Katrin Quester por su labor como técnico académico, y por asesorarme ininidad de veces a lo largo de estos años. Al personal técnico del CNYN, al Sr. Francisco Ruíz, a la M.C. Eloisa Aparicio. A Mario Guzmán por su ayuda en FTIR, a Adriana por su asistencia en el TGA, y la Dra. Elena Smolentseva por su ayuda en el análisis ICP. También agradezco a la M.C. Ana Misquez, por su amable ayuda en el préstamo de equipo de laboratorio, y a la Psic. Laura Rosales, por su orientación durante los procesos escolares.

Especial agradecimiento a mis amigos Karelid, Carlos, Gloria por brindarme su amistad durante estos años, y a Ish por su ayuda y apoyo siempre.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	xi
<b>Capítulo 1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes .....	3
1.1.1 Remediación ambiental .....	3
1.1.2 Biorremediación enzimática.....	5
1.1.3 Hongos de la podredumbre blanca .....	6
1.1.4 Lacasa .....	7
1.1.5 Peroxidasa versátil .....	9
1.1.6 Ciclo catalítico de la VP.....	9
1.2 Inmovilización enzimática .....	10
1.2.1 Inmovilización enzimática en nanomateriales .....	11
1.3 Cobre .....	13
1.3.1 Nanopartículas de cobre y basadas en cobre .....	13
1.3.2 Hidróxido de cobre.....	14
1.4 Nanocajas .....	15
1.4.1 Nanocajas de Cu(OH) <sub>2</sub> .....	16
1.4.2. Actividad peroxidasa intrínseca de las nanocajas de Cu(OH) <sub>2</sub> .....	17
1.5 Hipótesis.....	18
1.6 Objetivos .....	18
1.6.1 Objetivo general.....	18
1.6.2. Objetivos específicos.....	18

<b>Capítulo 2. Metodología</b>	<b>19</b>
2.1 Enzimas y reactivos .....	19
2.2 Síntesis y caracterización .....	20
2.2.1 Síntesis de nanopartículas de Cu(OH) <sub>2</sub> .....	20
2.2.2 Síntesis de nanocajas de Cu(OH) <sub>2</sub> .....	20
2.2.3 Caracterización por microscopía electrónica de transmisión (TEM) .....	21
2.2.4 Caracterización por difracción de rayos X (XRD).....	21
2.3 Funcionalización de las nanocajas de Cu(OH) <sub>2</sub> .....	21
2.3.1 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).....	22
2.4 Conjugación de la lacasa y peroxidasa versátil en las nanocajas funcionalizadas .....	22
2.4.1 Medición del potencial Zeta.....	23
2.4.2 Espectroscopía UV-Vis.....	23
2.4.3 Análisis termogravimétrico TGA.....	23
2.5 Caracterización catalítica .....	24
2.5.1 Espectroscopía de Plasma ICP-OES .....	24
2.5.2 Cuantificación de la proteína .....	24
2.5.3 Perfil de pH.....	24
2.5.4 Medición de la actividad catalítica .....	25
<b>Capítulo 3. Resultados</b>	<b>26</b>
3.1 Caracterización de nanopartículas y nanocajas de Cu(OH) <sub>2</sub> .....	26
3.2 Funcionalización de las nanocajas de Cu(OH) <sub>2</sub> .....	29
3.3 Conjugación de enzimas en las nanocajas .....	31
3.3.1 Caracterización por TEM .....	31
3.3.2 Potencial Zeta ( $\zeta$ ) .....	32
3.3.3 UV-Vis.....	33
3.3.4 Análisis termogravimétrico TGA.....	33
3.4 Caracterización catalítica .....	34
3.4.1 Cuantificación de la proteína .....	34
3.4.2 Perfil de pH.....	35
3.4.3 Medición de la actividad catalítica .....	36

<b>Capítulo 4. Discusión</b>	39
4.1 Síntesis de nanocajas de Cu(OH) <sub>2</sub> .....	39
4.2 Funcionalización de nanocajas de Cu(OH) <sub>2</sub> .....	41
4.3 Conjugación de enzimas en nanocajas de Cu(OH) <sub>2</sub> .....	41
4.3.1 Potencial zeta .....	42
4.3.2 Espectroscopía UV-Vis.....	42
4.3.3 Análisis termogravimétrico (TGA) .....	43
4.4 Caracterización catalítica .....	43
4.4.1 Perfil de pH.....	43
4.4.2 Medición de actividad catalítica.....	44
<b>Capítulo 5. Conclusiones</b>	47
<b>Literatura citada</b> .....	48
<b>Anexos</b> .....	55

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> En a) se presenta el esquema de la estructura de la lacasa (Jones y Solomon, 2015). .....	8
<b>Figura 2.</b> Ciclo catalítico de la VP (Pérez-Boada et al., 2005).....	10
<b>Figura 3.</b> Imágenes de TEM de las nanocajas de $\text{Cu}(\text{OH})_2$ reportadas por el grupo de Cai, et al., (2015)...16	
<b>Figura 4.</b> Imágenes de la reacción de oxidación del TMB catalizada por las nanocajas de $\text{Cu}(\text{OH})_2$ en presencia de $\text{H}_2\text{O}_2$ en diferentes tiempos (Cai et al., 2015).....	17
<b>Figura 5.</b> Proceso de conversión de una nanopartícula a una nanocaja biocatalítica de $\text{Cu}(\text{OH})_2$ .....	19
<b>Figura 6.</b> Funcionalización de una nanocaja de $\text{Cu}(\text{OH})_2$ con el reactivo APTMS. ....	22
<b>Figura 7.</b> Conjugación de las enzimas en nanocajas funcionalizadas de $\text{Cu}(\text{OH})_2$ . ....	23
<b>Figura 8.</b> Micrografías de TEM de las nanoagujas de $\text{Cu}(\text{OH})_2$ .....	26
<b>Figura 9.</b> Micrografías de TEM de las nanopartículas de $\text{Cu}(\text{OH})_2$ .....	27
<b>Figura 10.</b> Micrografías de TEM de las nanocajas de $\text{Cu}(\text{OH})_2$ .....	28
<b>Figura 11.</b> Distribución de tamaño de a) nanopartículas y, b) nanocajas de $\text{Cu}(\text{OH})_2$ .....	28
<b>Figura 12.</b> Patrón de difracción de rayos X de nanocajas y nanopartículas de $\text{Cu}(\text{OH})_2$ .....	29
<b>Figura 13.</b> Espectros de IR de las nanocajas de $\text{Cu}(\text{OH})_2$ funcionalizadas con APTMS (línea roja) y de las nanocajas sin funcionalizar (línea azul). ....	30
<b>Figura 14.</b> Micrografías de TEM de las nanocajas de $\text{Cu}(\text{OH})_2$ después del proceso de conjugación con la enzima peroxidasa versátil. ....	31
<b>Figura 15.</b> Micrografías de TEM de las nanocajas de $\text{Cu}(\text{OH})_2$ después del proceso de conjugación con la enzima lacasa.....	32
<b>Figura 16.</b> Espectros UV-Vis de las nanocajas y las nanocajas con las enzimas conjugadas (nanocajas-VP y nanocajas-Lac). ....	33
<b>Figura 17.</b> Análisis TGA de las nanocajas, y de las nanocajas con enzimas conjugadas. ....	34

<b>Figura 18.</b> Curva de absorbancia estándar del reactivo colorante de Bio-Rad con albúmina de suero bovino (BSA).....	35
<b>Figura 19.</b> Evaluación de la actividad catalítica de las a) nanocajas, b) nanocajas-VP y c) nanocajas-Lac a distintos valores de pH. Como comparación, se muestra la actividad relativa de las enzimas VP y lacasa libre. ....	36
<b>Figura 20.</b> Comportamiento cinético de las nanocajas-VP y nanocajas-Lac en la oxidación del ABTS y 2,6-DMP. ....	37
<b>Figura 21.</b> Esquema de la formación de las nanocajas de $\text{Cu}(\text{OH})_2$ mediante la reacción con el complejo cobre-amoniaco .....	40
<b>Figura 22.</b> Gráficas de actividad de las nanocajas y nanopartículas usando como sustrato 1.5 mM de DMP. A la derecha se muestran los espectros de absorción en la oxidación del DMP con nanopartículas y nanocajas a diferentes periodos de tiempo. ....	55

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Ventajas y desventajas de las tecnologías de remediación, clasificadas de acuerdo con el tipo de tratamiento (Trejo, 2002). .....	4
<b>Tabla 2.</b> Ventajas y desventajas de la nano-inmovilización (Cipolatti et al., 2014). .....	12
<b>Tabla 3.</b> Sustratos utilizados en la determinación de la actividad catalítica .....	25
<b>Tabla 4.</b> Principales picos característicos obtenidos a partir de FTIR de las nanocajas y nanocajas funcionalizadas. ....	30
<b>Tabla 5.</b> Valores de potencial zeta de las muestras en el día 1 de su síntesis. ....	32
<b>Tabla 6.</b> Constantes catalíticas de nanocajas y nanocajas-enzima con dos diferentes sustratos. ....	38
<b>Tabla 7.</b> Comparación de los parámetros cinéticos de las enzimas libres lacasa y peroxidasa versátil con los parámetros de las nanocajas-VP y nanocajas-Lac. ....	46
<b>Tabla 8.</b> Tabla de la actividad específica obtenida en la oxidación del DMP con 30µg de nanocajas vs nanopartículas. ....	55

## Capítulo 1. Introducción

---

Como habitantes del planeta Tierra, nuestra calidad de vida depende de la calidad global que presenta el medio ambiente. La contaminación ambiental se encuentra entre los principales problemas globales debido al riesgo que representa para todos los organismos. Ésta se define como la presencia de un agente externo (físico, químico o biológico) en el suelo, el aire o el agua y que puede ser perjudicial para la salud, la seguridad y el bienestar de los organismos que ahí habitan (Solís y López Arriaga, 2006).

Según *World Wildlife* (2017), entre los años 1930 y 2000, se incrementó 400 veces la producción de sustancias químicas a nivel mundial. Aunque la mayoría de los compuestos químicos han mejorado diversos aspectos de la vida moderna, también es un hecho que han contaminado los ecosistemas naturales de todo el planeta.

Entre los principales contaminantes liberados en el ambiente se encuentran los compuestos orgánicos, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), los compuestos fenólicos, los compuestos organofosforados y los colorantes industriales. Existe especial preocupación sobre estos contaminantes debido a que poseen propiedades fisicoquímicas que les permiten viajar grandes distancias, tener vida media larga, la capacidad de acumularse en el ambiente o dentro de un organismo, y en este último causar efectos en la salud como cáncer o mutaciones, motivo por el cual su retención y eliminación son de interés para la sociedad (Rao et al., 2010).

Los HAPs son compuestos contaminantes semivolátiles, los cuales tienen en su estructura química dos o más anillos fusionados. Son hidrofóbicos y persisten en el ambiente gracias a su baja solubilidad en el agua. Además, se producen como resultado de procesos industriales o en la combustión de combustibles fósiles, y se han asociado a diferentes tipos de cáncer (Kadri et al., 2017).

Los colorantes artificiales que se utilizan en la industria textil están específicamente diseñados para resistir condiciones ambientales como la luz solar, la degradación microbiana, algunos productos químicos, etc., es por ello que son potencialmente tóxicos, algunos incluso están catalogados como carcinogénicos (Chung et al., 1992). Se ha estimado que aproximadamente el 15% de la materia colorante es liberada en los efluentes de aguas residuales, llegando así a una gran variedad de ecosistemas (Tinoco et al., 2007).

Los compuestos fenólicos contienen en su estructura química un hidroxilo unido a un anillo aromático. Están clasificados como *contaminantes prioritarios* por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados

Unidos (US EPA, por sus siglas en inglés), ya que se ha reportado que muchos de ellos pueden ser mutagénicos y/o carcinogénicos (Seetharam y Saville, 2003).

Existen diversas técnicas para restaurar los lugares que ya han sido alterados por la contaminación por compuestos tóxicos, que van desde métodos físicos, químicos y biológicos. Estos últimos son los más recientes y con más ventajas que los otros. Por ejemplo, son compatibles con el medio ambiente, ya que utilizan plantas, microorganismos o enzimas para tratar los ambientes contaminados.

La biorremediación enzimática, es decir, la remediación empleando enzimas que se sabe tienen la capacidad de catalizar la oxidación de compuestos tóxicos tiene más ventajas, ya que una enzima es un sistema más simple que un organismo completo y posee una mayor especificidad por su sustrato (Tanokura et al., 2015). Desafortunadamente, el uso de enzimas para la biorremediación tiene desventajas. Debido a su origen, son muy inestables y pueden inactivarse en las condiciones del sitio contaminado, de tal forma que se disminuye su eficiencia (Guisán, 2006). Entre las enzimas más estudiadas se encuentran las producidas por los hongos ligninolíticos, como la lacasa, lignino peroxidasa, manganeso peroxidasa y la más reciente la peroxidasa versátil (Wong, 2009).

Debido a que su aplicación es limitada, se ha impulsado la búsqueda de procedimientos que mejoren su eficiencia y estabilidad operacional. Una manera de hacerlo posible es a través de la inmovilización de la enzima en una membrana, en una matriz insoluble, y más recientemente, en materiales con dimensiones en escala nanométrica, es decir en nanomateriales, como por ejemplo nanotubos de carbono, nanopartículas metálicas, nanopartículas de quitosano, etc. (Cipolatti et al., 2014; Koyani y Vazquez-Duhalt, 2016; Alarcón-Payán et al., 2017).

En comparación con los materiales en macro escala, un nanomaterial posee más área superficial, de tal forma que tiene una mayor capacidad de carga, es decir, puede inmovilizar mayor cantidad de enzimas. Además, por sus dimensiones tiene mejor movilidad y difusión (Min y Yoo, 2014).

Por otro lado, la forma que tiene el nanomaterial también le brinda propiedades interesantes que en bulto no las tiene. El campo de la nanocatálisis dependiente de la forma cobró gran importancia desde la publicación del artículo *Shape-controlled synthesis of colloidal platinum nanoparticles* (Ahmadi, 1996).

En dicho trabajo describieron la síntesis de nanopartículas metálicas con diversas morfologías, y se reportó que pueden catalizar diferentes reacciones químicas dependiendo de su forma. Desde entonces,

numerosos grupos de investigación se han enfocado en la síntesis de nanomateriales esféricos, cilíndricos, cúbicos, nanotubos, películas delgadas, con cavidad hueca, con esquinas y bordes prominentes, o alguna combinación de éstos, etc. para estudiarlos como catalizadores.

Recientemente fue reportada la síntesis de un nanomaterial de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  con morfología cuadrangular y con cavidad hueca, llamada *nanocaja*. También se reportó que este material cataliza la oxidación de sustratos como el TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina), por lo que exhibe actividad peroxidasa intrínseca (PMA, del inglés peroxidase-mimic activity) (Cai et al., 2015).

Debido a esto, el propósito del presente trabajo es utilizar las nanocajas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  como soporte en la inmovilización enzimática de la lacasa y la peroxidasa versátil, aprovechando además su actividad peroxidasa intrínseca, para su posible aplicación en la biorremediación de ambientes contaminados con compuestos tóxicos.

## **1.1 Antecedentes**

### **1.1.1 Remediación ambiental**

El crecimiento demográfico, la industrialización y la falta de regulación de desechos han generado una situación alarmante en el ambiente, debido a que el ambiente está siendo contaminado con grandes cantidades de compuestos tóxicos que difieren en estructura de los compuestos orgánicos naturales, por lo que se vuelven recalcitrantes a la biodegradación.

Se denomina remediación ambiental al tratamiento y restauración de los ambientes contaminados con el fin de controlar, disminuir o eliminar compuestos tóxicos. El intento por remediar dichos lugares ha llevado al desarrollo de diferentes estrategias.

En términos generales, las estrategias de remediación se pueden clasificar en métodos físicos, químicos y biológicos. Los métodos físicos son métodos de separación que aprovechan las propiedades físicas de los contaminantes o de fenómenos físicos como la permeabilidad y la adsorción. Algunos ejemplos son el lavado de suelos y la extracción de vapores.

Entre los métodos químicos se encuentra la solidificación/estabilización, en la cual el suelo contaminado se mezcla con aditivos para inmovilizar a los contaminantes y separarlos fácilmente (Mukherjee et al., 2013).

Por su parte, el uso de los métodos biológicos se denomina biorremediación. La biorremediación se refiere al uso de agentes biológicos, básicamente microorganismos, para eliminar o reducir la concentración de sustancias tóxicas que se encuentran en un determinado sitio contaminado (Yair et al., 2008). En la tabla 1 se presentan las ventajas y desventajas de los métodos de remediación. La elección del método de remediación a utilizar depende de factores como el tipo de sistema afectado, las características físico-químicas de los contaminantes, el costo y el tiempo para su desarrollo, entre otros (Rao et al., 2010).

El proceso de biorremediación envuelve diversos tipos de reacciones, como de óxido-reducción, intercambio iónico o incluso de quelación. Además, es posible utilizar organismos que son propios del lugar contaminado, o de otros sitios (exógenos). Un ejemplo muy utilizado de biorremediación es la fitorremediación, que se refiere al uso de las plantas para la remoción, transferencia o eliminación de los compuestos del suelo. Sin embargo, este método tiene algunas limitaciones, ya que altas concentraciones de contaminantes puede resultar tóxico para las plantas, así como todo el proceso puede depender de la estación del año (Macek et al., 2000).

**Tabla 1.** Ventajas y desventajas de las tecnologías de remediación, clasificadas de acuerdo con el tipo de tratamiento (Trejo, 2002).

	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
<b>Tratamientos físicoquímicos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Son efectivos en cuanto a costos</li> <li>- Pueden ser realizados en períodos cortos de tiempo</li> <li>- Se necesita equipo accesible y no requieren de mucha energía ni ingeniería</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento en costos por los residuos generados que también deben ser tratados.</li> <li>- Los fluidos de extracción pueden aumentar la movilidad de los contaminantes: necesidad de sistemas de recuperación</li> </ul>
<b>Tratamientos biológicos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Son efectivos en cuanto a costos</li> <li>- Son tecnologías amigables con el ambiente</li> <li>- Los contaminantes generalmente son destruidos</li> <li>- Se requiere un mínimo o ningún tratamiento posterior</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Requieren mayores tiempos de tratamiento</li> <li>- Es necesario verificar la toxicidad de intermediarios y/o productos</li> <li>- No pueden emplearse si el tipo de suelo no favorece el crecimiento microbiano</li> </ul>

Otro ejemplo es la bioaumentación, que es la adición de microorganismos vivos con la capacidad de degradar los compuestos o de convertirlos en otros menos tóxicos. No obstante, ciertos contaminantes pueden resultar tóxicos para los microorganismos, por lo que se requiere de poblaciones microbianas que estén aclimatadas y tengan una vida larga de reacción para obtener los niveles deseados de descontaminación (Tyagi et al., 2011). Estas desventajas han generado el estudio de otras alternativas, como el uso de enzimas como agentes de biorremediación, en lugar de organismos enteros como las bacterias. Al uso de enzimas en estos procesos se le conoce como biorremediación enzimática.

### **1.1.2 Biorremediación enzimática**

En la década de 1930, se propuso por primera vez el uso de enzimas para el tratamiento de residuos, sin embargo, fue hasta 1970 cuando se utilizaron para la remediación de ciertos ambientes contaminados. Como agentes descontaminantes, las enzimas constituyen una opción factible para la transformación de algunos compuestos (Tanokura et al., 2015). Las características más importantes de las enzimas son su alta especificidad y su gran capacidad catalítica (Eibes et al., 2015).

Entre sus múltiples ventajas se encuentran también sus diferentes modos operacionales, ya que una enzima puede ser funcional intracelularmente, es decir, en presencia o en el interior de la célula de la que es originaria; así como de forma extracelular, esto es en ausencia de su célula de origen.

Además, las enzimas pueden estar fijas en una matriz sólida, es decir, inmovilizadas en un material, y se pueden producir a gran escala, logrando mayor estabilidad y menor costo. Para que una enzima pueda ser utilizada en el proceso de degradación de contaminantes, se debe identificar si tiene una alta afinidad por el sustrato, también debe tener una alta estabilidad en las condiciones operativas y, de preferencia, que no dependa de cofactores o de coenzimas de alto costo económico (Mohamad et al., 2015).

A pesar de las grandes ventajas que brindan las enzimas, existen algunos inconvenientes relacionados con su uso. Uno de ellos es que, debido a su origen, las enzimas tienen una baja estabilidad, lo que conlleva a un tiempo de vida corto. Además, pueden ser inactivadas fácilmente por condiciones del ambiente, como pH, temperatura, o por otros compuestos presentes en el medio (Valderrama et al., 2002).

Se ha reportado un gran número de estudios en los que se comprueba que las enzimas tienen la capacidad de catalizar la oxidación de compuestos tóxicos. Las enzimas producidas por los hongos ligninolíticos son una de las familias de enzimas más estudiadas. Estos hongos secretan enzimas como la lacasa, lignino peroxidasa, manganeso peroxidasa y la más recientemente estudiada, la peroxidasa versátil, entre otras.

### **1.1.3 Hongos de la podredumbre blanca**

Los hongos son los únicos organismos capaces de mineralizar totalmente la ligninocelulosa, el material renovable recalcitrante más abundante en la naturaleza. Los hongos de la podredumbre blanca secretan enzimas altamente oxidativas que degradan la lignina (Yadav y Yadav, 2015). La lignina es un polímero de la madera que le brinda soporte y rigidez a la planta, y la protege del ataque microbiano. El nombre de podredumbre blanca se debe al color que adquiere la madera una vez que ha sido degradada por las enzimas de los hongos.

A partir de la década de 1980, se impulsó enormemente el uso de enzimas producidas por los hongos de la podredumbre blanca para la degradación de contaminantes. Desde entonces, se ha publicado una gran cantidad de estudios que reportan que estas enzimas son capaces de degradar diferentes tipos de compuestos contaminantes como fenoles, disruptores endocrinos, colorantes industriales, pesticidas, entre otros (Scott et al., 2008; Taboada-Puig et al., 2016; Chibwe et al., 2017). Entre las ventajas que poseen las enzimas secretadas por estos hongos se encuentran la poca especificidad hacia un solo sustrato, por lo que tienen como sustratos a un amplio grupo de compuestos contaminantes; además, pueden tolerar ambientes con concentraciones de metales tóxicos, contribuyendo así a su eliminación (Gianfreda y Rao, 2004).

Las cuatro enzimas principales que son secretadas por los hongos de la podredumbre blanca son la lacasa (Lac), manganeso peroxidasa (MnP), lignino peroxidasa (LiP) y la peroxidasa versátil (VP). La demanda para la aplicación de las enzimas ligninolíticas en las industrias y en la biotecnología está creciendo debido a su posible uso en una gran variedad de procesos. Los campos de aplicación incluyen las industrias: química, del papel, cosmética, textil, alimenticia, agricultura, etc.

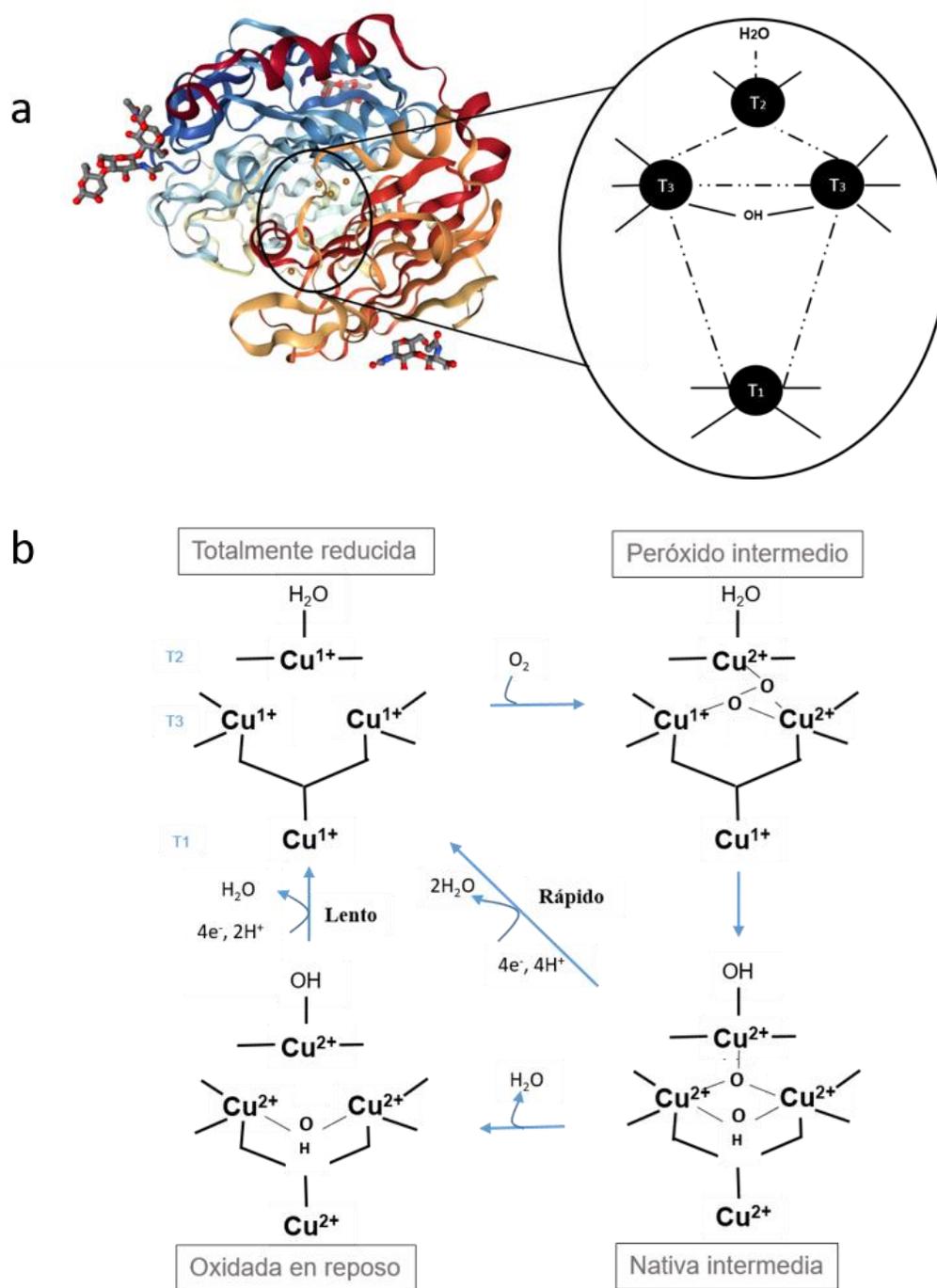
#### 1.1.4 Lacasa

La enzima lacasa ha sido ampliamente estudiada porque degrada una variedad de compuestos recalcitrantes. Fue descrita por primera vez en el año 1883 por Yoshida cuando estudió la savia del árbol de la laca (*Rhus vernicifera*) (Yoshida, 1883). No fue sino hasta 1896 cuando Bertrand y Laborde observaron que esta enzima también se encuentra en los hongos (Upadhyay et al., 2016).

Una ventaja de las lacasas de los hongos es que, a diferencia de las que se obtienen de las plantas, presentan mayor estabilidad en el medio extracelular ya que son proteínas extracelulares, y su purificación es relativamente más sencilla. Las lacasas son regularmente las primeras enzimas que segregan los hongos ligninolíticos a los medios circundantes para degradar la lignina (Thurston, 1994). Se han reportado lacasas intracelulares provenientes de hongos, aunque aún no se sabe qué función desempeñan (Morozova et al., 2007).

El peso molecular de las lacasas fúngicas está entre 60 y 70 kDa, su punto isoeléctrico es de 4, y su pH óptimo entre 3 y 5 (Giardina et al., 2010). El sitio activo de la lacasa (EC. 1.10.3.2) está formado por cuatro átomos de Cu distribuidos en tres sitios redox, denominados tipo 1 (T1) o Cu azul, tipo 2 (T2) o Cu normal, y tipo 3 (T3) o Cu binuclear (Figura 1a). Es por ello que usualmente a estas enzimas se les llama oxidasas multicobre (Baldrian, 2006). A través de estos átomos de Cu, la glicoproteína puede catalizar la oxidación de una cantidad de sustratos junto con la reducción de cuatro electrones de oxígeno molecular a agua (Figura 1b). Además, puede usar el oxígeno molecular como aceptor de electrones y no requiere de ningún co-sustrato (Jones y Solomon, 2015).

La lacasa solamente ataca a las subunidades fenólicas de la lignina. Sin embargo, en presencia de un compuesto mediador, aumenta su capacidad de oxidación y puede oxidar compuestos no fenólicos. El ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) fue el primer mediador efectivo en la transformación de la lignina por la lacasa (Collins et al., 1998). Esto da lugar a que esta enzima sea una de las más prometedoras para aplicaciones industriales.



**Figura 1.** En a) se presenta el esquema de la estructura de la lacasa, el cual muestra la posición de los iones de cobre y en b) el mecanismo de reducción de oxígeno en su sitio activo (Jones y Solomon, 2015).

### 1.1.5 Peroxidasa versátil

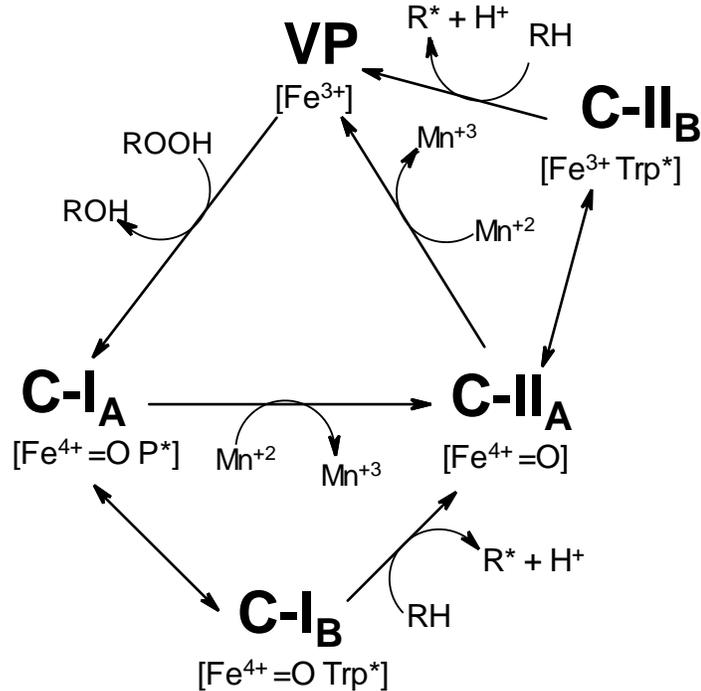
La enzima peroxidasa versátil (VP), como su nombre lo indica, es una peroxidasa que cataliza las reacciones de oxidación de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos mediante la reducción de peróxidos. Fue descrita por primera vez en cepas de *Pleurotus eryngii* degradadoras de lignina. No obstante, también la producen los hongos de especies como *Bjerkandera* y *Lepista*, entre otros (Pogni et al., 2005).

La VP utiliza como co-sustrato al peróxido de hidrógeno,  $H_2O_2$ . A través de la generación de radicales libres logra romper los enlaces C-C, éster u oxidación de anillos aromáticos. Es una enzima híbrida estructural de la LiP y de la MnP. Su peso molecular es de 45 kDa, su punto isoeléctrico está entre 3.5 y 4.1 (Moreira et al., 2005; Chen et al., 2010). Su grupo prostético es un grupo hemo, por lo que pertenece al grupo de las hemo-peroxidases (Siddiqui et al., 2014). La VP (EC. 1.11.1.16) tiene la capacidad de oxidar  $Mn^{2+}$  de igual forma como lo hace la MnP, así como oxidar compuestos de alto potencial redox como la LiP, por lo que no necesita mediadores redox. Además, puede oxidar sustratos que no alcanzan el grupo hemo, mediante un intermediario que es altamente reactivo o por medio de un residuo de aminoácido superficial activado (Ayala Aceves et al., 2001).

### 1.1.6 Ciclo catalítico de la VP

Debido a que la VP es una combinación estructural de la LiP y de la MnP, su mecanismo catalítico también lo es, ya que combina los sitios activos de las dos enzimas. El ciclo inicia con la sustracción de dos electrones de la enzima en estado basal, por el  $H_2O_2$ . Esto da lugar a la producción del compuesto C-I<sub>A</sub>, que contiene un oxo- $Fe^{4+}=O$  y un radical catiónico de la porfirina. Después, dichos electrones son transferidos desde el sustrato en dos etapas. Primero ocurre una reducción de un electrón que forma el compuesto C-II<sub>A</sub> que contiene un oxo- $Fe^{4+}=O$ , y posteriormente, la reducción del segundo electrón devuelve a la enzima a su estado basal (Pérez-Boada et al., 2005).

El proceso LRET (del inglés *Long-rate electron transfer*) es otro mecanismo por el cual se produce la oxidación del sustrato. Éste involucra un radical proteico que está expuesto sobre la superficie y permite la oxidación de compuestos de alto peso molecular que no pueden llegar al sitio activo de la enzima. La presencia de un radical triptófano (Trp\*) cercano al grupo hemo es el sitio donde se lleva a cabo la oxidación de este tipo de compuestos (Sánchez-Alejandro et al., 2016).



**Figura 2.** Ciclo catalítico de la VP. La enzima en estado basal presenta la oxidación de dos de sus electrones por el peróxido de hidrógeno, y se crea el compuesto C-I<sub>A</sub> que contiene un radical catiónico basado en la porfirina. Posteriormente ocurren dos reducciones sucesivas que crean, primero al compuesto intermediario C-II<sub>A</sub> y después a la enzima en estado basal. En la figura también se observan los compuestos intermediarios C-I<sub>B</sub> y C-II<sub>B</sub> que están involucrados en la oxidación de sustratos de alto potencial redox (Pérez-Boada et al., 2005).

## 1.2 Inmovilización enzimática

Como se mencionó anteriormente, una de las principales limitantes del uso de estas enzimas para la biorremediación de ambientes contaminados son su potencial inactivación en presencia de agentes químicos o biológicos presentes en el ambiente, así como su difícil recuperación y baja estabilidad operacional. Se han desarrollado diversas estrategias para solucionar estos problemas. Una de ellas es la inmovilización enzimática. La inmovilización de una enzima se refiere al hecho de fijar la proteína en un soporte insoluble, con la finalidad de hacer más fácil su separación y reutilización, además de brindarle mayor estabilidad y un mínimo impacto sobre su actividad catalítica (Krajewska, 2004).

Desde hace varias décadas ha ido en aumento la búsqueda de materiales y tecnologías que funcionen como soporte para la inmovilización de enzimas. Una característica importante que debe tener el soporte para la inmovilización es brindar un entorno inerte biocompatible para no interferir en la estructura nativa de la enzima y comprometer su actividad biológica. Se han reportado trabajos donde fueron evaluadas las interacciones entre compuestos minerales y orgánicos presentes en el suelo con diferentes clases de enzimas. Sin embargo, se encontró que, aunque los minerales sirven como soporte natural para la inmovilización, producen cambios significativos en las propiedades catalíticas, disminuyendo su actividad enzimática (Sarkar et al., 1989; Naidja et al., 2000; An et al., 2015).

En general, los métodos de inmovilización de enzimas se dividen en físicos y químicos, o incluso en una combinación de ambos. En los métodos físicos existe una interacción no covalente entre la enzima y el soporte, ya sea por medio de fuerzas electrostáticas o enlaces de hidrógeno. En los métodos químicos se forman enlaces tipo covalente entre el soporte y la enzima. Seleccionar un método para una enzima depende del tipo de enzima, sus características y el propósito de la inmovilización. Entre los métodos físicos se encuentran la adsorción y atrapamiento. Sus desventajas son que puede haber pérdidas de enzima y problemas de difusión. Los métodos químicos como unión covalente y entrecruzamiento con compuestos de bajo peso molecular son efectivos pero resultan costosos debido a que necesitan intermediarios de reacción (Eş et al., 2015).

Los principales factores involucrados que afectan el rendimiento de una enzima inmovilizada son la estructura y las propiedades del material de soporte, ya que éstos tienen gran influencia en la transferencia de masa entre el sustrato y la enzima, las interacciones entre las moléculas enzimáticas inmovilizadas y la transferencia de electrones desde el sitio activo a la enzima (Li et al., 2017).

### **1.2.1 Inmovilización enzimática en nanomateriales**

En años recientes, el avance de la Nanotecnología ha hecho posible el estudio de materiales entre 1 y 100 nm en alguna de sus dimensiones para su potencial uso como soporte en la inmovilización enzimática. Sus aplicaciones no sólo se limitan en la biorremediación, sino que incluye campos como biosensores, en bioelectrónica, celdas de combustible, biorrefinación, química sintética, etc. (Ang et al., 2005).

Los nanomateriales son buenos candidatos como soportes debido a su gran área superficial, misma que sirve para fijar una mayor cantidad de moléculas de enzimas, a diferencia de un material en bulto. Su desventaja es que debido al uso de nanomateriales, la síntesis de éstos puede resultar costosa. En la tabla 2 se presentan algunas de las ventajas y desventajas de su uso.

Se han realizado estudios de inmovilización en nanomateriales como nanotubos de carbono CNTS (del inglés *carbon nanotubes*), nanopartículas de oro, nanopartículas de plata, nanopartículas magnéticas, carbón mesoporoso, etc. (Andreescu et al., 2008; Petkova et al., 2012).

**Tabla 2.** Ventajas y desventajas de la nano-inmovilización (Cipolatti et al., 2014).

<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
Gran área superficial	Costo de los procesos de síntesis
Resistencia a la transferencia de masa	Aplicación a escala industrial
Carga enzimática efectiva	Separación del medio de reacción
Resistencia mecánica	
Minimización de los problemas de difusión	

Por ejemplo, la enzima tirosinasa fue inmovilizada con nanopartículas de oro en una matriz de silicato, por el método de adsorción. El interés particular en utilizar nanopartículas de oro es su biocompatibilidad y que no causa toxicidad *in vivo* o *in vitro*. El objetivo fue evitar la agregación y mejorar la estabilidad de un bioelectrodo (Cipolatti et al., 2014). Otro ejemplo es la inmovilización de la enzima peroxidasa versátil en nanopartículas de quitosano de aproximadamente 120 nm de diámetro, para la eliminación de los contaminantes en aguas residuales. Este estudio reportó un importante incremento en la actividad operacional en un proceso de tratamiento de aguas residuales en condiciones reales (Alarcón-Payán et al., 2017).

Además de las nanopartículas, que generalmente tienen morfologías esféricas, se han reportado nanomateriales con morfologías novedosas que sirven como soportes. Por ejemplo, Li y colaboradores sintetizaron un nanocomposito en forma de flor, *nanoflower*, con fosfato de cobre, enzima lacasa, óxido de grafito y CNTs. Esta estructura mostró una carga enzimática alta y una mejora del 15% de la actividad de la lacasa en la remoción de colorantes solubles en agua. Esto refuerza el panorama acerca de la

importancia de estudiar los nanomateriales en sus diversas morfologías para su uso en la remoción de contaminantes y todas sus potenciales aplicaciones (Li et al., 2017).

### 1.3 Cobre

El cobre es un elemento químico que pertenece al grupo de los metales de transición, su número atómico es 29 y su símbolo químico es Cu. Es un excelente conductor de electricidad y es de los pocos metales que se encuentran de forma nativa en la naturaleza, es decir, sin estar combinados con otros elementos químicos. Es el 25° elemento más abundante en la corteza terrestre, y junto con la plata (Ag) y el oro (Au) pertenecen a la llamada familia del cobre. Fue uno de los primeros metales que el hombre utilizó en la prehistoria para la elaboración de herramientas, monedas, joyas etc. Fue usado además para el tratamiento de infecciones microbianas antes del desarrollo de los antibióticos debido a su naturaleza antimicrobiana inherente (Ingle et al., 2014). Es considerado un oligoelemento, aunque se encuentra en bajas concentraciones en los tejidos biológicos es esencial para la vida (Adrees et al., 2015). Está presente en hormonas, vitaminas, pigmentos respiratorios y enzimas. Actualmente se conocen al menos 25 enzimas que contienen cobre, y entre los procesos en los que está involucrado se encuentran la transferencia de electrones, la oxidación catalítica, y el almacenamiento y transporte de oxígeno. El cobre puede llevar a cabo estas funciones debido a sus siguientes características:

- Los iones de cobre son catalizadores efectivos.
- Los iones de cobre reaccionan con aminoácidos y con proteínas mejor que los iones de otros elementos, formando complejos que son más estables.
- Tiene los estados de oxidación: cero, ( $\text{Cu}^0$ , metal reducido); más uno ( $\text{Cu}^{+1}$ , ion cuproso); más dos, ( $\text{Cu}^{+2}$ , ion cúprico) (Flemming y Trevors, 1989). Y menos frecuente, más tres ( $\text{Cu}^{+3}$ ). Al pasar fácilmente de un estado de oxidación a otro, da lugar a que los compuestos lleven a cabo reacciones de óxido-reducción (Tishchenko et al., 2016).

#### 1.3.1 Nanopartículas de cobre y basadas en cobre

El campo de la nanocatálisis ha tomado gran importancia debido a las nuevas y mejoradas propiedades que tienen estos materiales en escala nanométrica. Este campo busca aumentar la actividad catalítica de

los materiales tomando en cuenta sus características como forma y tamaño. Los nanomateriales de cobre y basados en cobre resultan atractivos debido a su abundancia natural y su menor costo comparado con los metales nobles (Ru, Rh, Pd, Ag, Os, Ir, Pt y Au) que son usados comúnmente en procesos químicos industriales.

Además, su estudio ha facilitado el desarrollo de estrategias que han originado a nanomateriales con diferentes tamaños, formas, composiciones y estructuras (Gawande et al., 2016).

El inconveniente con el uso de los nanomateriales de cobre es su inestabilidad inherente en condiciones atmosféricas, ya que éste tiende a oxidarse. Sin embargo, se han desarrollado diversas estrategias que incluyen el uso de óxidos de cobre ( $\text{CuO}$ ,  $\text{Cu}_2\text{O}$ ) que son más estables, o el uso de soportes como polímeros, materiales a base de carbono, óxidos de hierro, etc. Estos materiales pueden promover diversas reacciones debido a los diferentes estados de oxidación que tiene el cobre, permitiendo que se lleven a cabo por medio de vías de transferencia de uno o dos electrones.

### **1.3.2 Hidróxido de cobre**

El hidróxido de cobre (II), también llamado hidróxido cúprico, cuya fórmula química es  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ , es un hidróxido de color azul pálido. El átomo de cobre se encuentra en un estado de oxidación +2. Este compuesto es estable hasta  $100\text{ }^\circ\text{C}$ , ya que después se oxida formando  $\text{CuO}$ . Tiene diversas propiedades y usos, desde catálisis hasta sensor de glucosa o detección de  $\text{CO}_2$ . El  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  es un buen candidato en la detección de glucosa no enzimática debido a sus propiedades electrocatalíticas, su actividad redox, es barato y es amigable con el ambiente (Shackery et al., 2016).

Lin y colaboradores reportaron la síntesis de nanopartículas de este material, con forma de alambres, cintas, discos, rodillos, placas cuadradas y elípticas, y los usaron como catalizadores en la reacción de oxidación del resorcinol en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Curiosamente, ellos encontraron que las nanopartículas cristalinas tenían mayor actividad catalítica que las amorfas, sin embargo, no propusieron ningún mecanismo que pudiera explicar estos resultados (Lin et al., 2011).

## 1.4 Nanocajas

Los nanomateriales con forma de caja han sido estudiados recientemente debido a las propiedades catalíticas que presentan. Una nanocaja podría definirse como una nanoestructura con una forma cúbica, pero con cavidad hueca. Se han sintetizado nanocajas de Au, Ag, Pt, Pd, Cu, C, etc. (Mahmoud et al., 2010). Muchos de ellos demostraron ser catalizadores más eficientes que otros compuestos ya conocidos, por lo que representan una alternativa viable en el campo de la nanocatálisis, debido a que la morfología de un nanomaterial es un factor clave que determina su rendimiento catalítico.

Los nanomateriales con diferente forma presentan una fracción de átomos distinta en sus bordes y esquinas, así como también distintos defectos, que en conjunto se reflejan en una actividad catalítica distinta para una misma reacción. Por ejemplo, las nanocajas de Au fueron sintetizadas por primera vez por el grupo de Xia y colaboradores en el 2002. Ellos demostraron que éstas tienen una alta actividad catalítica muy similar a la actividad que tienen los nanotubos de Pd para la reacción de acoplamiento de Suzuki (Sun y Xia, 2003).

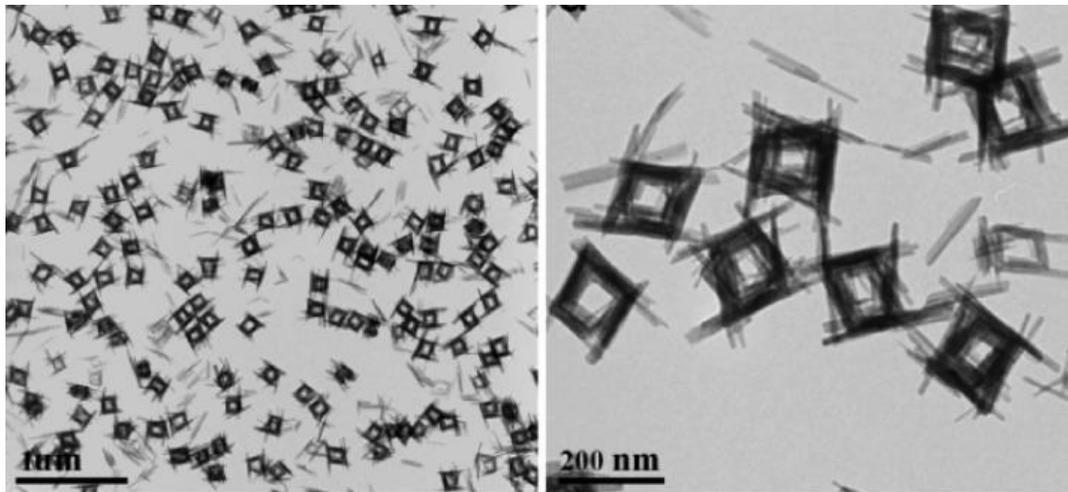
Por otro lado, Mahmoud y colaboradores utilizaron nanocajas de Pt y Pd de 75 nm de longitud como catalizadores en la reacción de reducción del 4-nitrofenol a 4-aminofenol. Propusieron que la reacción catalítica ocurre dentro de la cavidad de la nanoestructura, debido a que los valores obtenidos de las velocidades de reacción, energías de activación, entropías de activación y factores de frecuencia son muy similares a los que tiene el metal puro que se encuentra en el interior de las paredes de la cavidad. Los factores de frecuencia presentaron valores muy altos nunca antes reportados para esa reacción u otras reacciones que hayan sido catalizadas con nanopartículas sólidas o parcialmente huecas de Pt y Pd (Mahmoud et al., 2010).

Además de su reducido tamaño que las vuelve atractivas para el campo de la catálisis, las nanocajas tienen dos tipos de superficie, interna y externa, que incrementa el área superficial disponible para que se lleve a cabo la reacción catalítica. También, el efecto del confinamiento de algunas nanopartículas, como las nanopartículas de Cu, agrega propiedades nuevas de plasmón superficial (Henglein, 1989). Debido a su cavidad hueca, las nanocajas adquieren dos tipos de plasmón superficial, que pueden acoplarse dando lugar a campos mejorados. Esta propiedad es útil en aplicaciones de detección o sensores.

### 1.4.1 Nanocajas de $\text{Cu}(\text{OH})_2$

La síntesis de nanocajas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  fue reportada por LaGrow y colaboradores (2014) utilizando como precursores el  $\text{CuCl}_2$  y el  $\text{NaBH}_4$ . Por medio del método de *química húmeda* obtuvieron nanocajas ramificadas con una longitud de  $221 \pm 28$  nm, y una longitud de las ramificaciones de  $74 \pm 24$  nm. Posteriormente convirtieron las nanocajas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  a  $\text{CuO}$ , debido a que se ha reportado que las nanopartículas de  $\text{CuO}$  son buenos catalizadores en la reacción de acoplamiento C-S entre un grupo tiol y un yoduro de arilo.

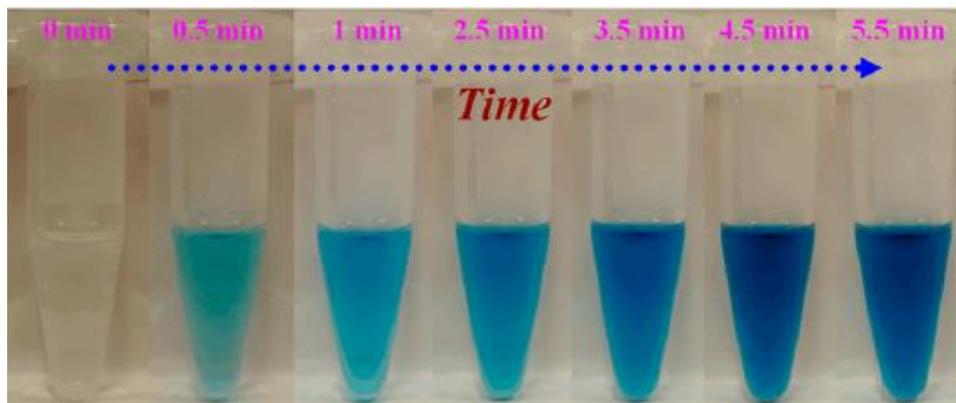
Más tarde, Cai y colaboradores (2015) obtuvieron nanopartículas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  basándose en el método reportado por LaGrow. Además, lograron obtener nanocajas con ramificaciones más cortas y con una cavidad hueca, a las que llamaron *supercages* (Figura 3). Éstas fueron sintetizadas a través de la conversión directa de las nanopartículas amorfas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ , y están compuestas por nanocintas de entre 150 -250 nm de longitud que se apilan una a la otra por medio de enlaces de hidrógeno, formando eventualmente una nanocaja. Este nanomaterial presenta actividad peroxidasa intrínseca, misma que fue evaluada y comparada con la enzima peroxidasa de rábano blanco o HRP (del inglés *Horseradish peroxidase*).



**Figura 3.** Imágenes de TEM de las nanocajas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  reportadas por el grupo de Cai, et al., (2015). En la micrografía de la derecha se puede apreciar que el tamaño de las nanocajas es de aproximadamente 200 nm, y están compuestas por nanocintas apiladas.

#### 1.4.2. Actividad peroxidasa intrínseca de las nanocajas de $\text{Cu}(\text{OH})_2$

Las nanocajas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  catalizan la oxidación del sustrato 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), es decir, exhiben actividad peroxidasa intrínseca (Figura 4). Su actividad catalítica fue evaluada en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a temperatura ambiente. También se evaluó la actividad de la enzima HRP con el mismo sustrato, y se compararon sus parámetros cinéticos. Se encontró que el valor de  $K_m$  de las nanocajas para el TMB como sustrato fue mayor que la  $K_m$  de la HRP. No obstante, también se reportó que la  $K_m$  de las nanocajas para  $\text{H}_2\text{O}_2$  como sustrato fue 20 veces menor que el de la HRP. Es decir, las nanocajas mostraron mayor afinidad al  $\text{H}_2\text{O}_2$  comparadas con la enzima HRP. En conclusión, con un valor inferior de  $K_m$  se obtuvo una  $V_{\text{max}}$  mayor y, por lo tanto, la eficiencia catalítica  $k_{\text{cat}}/K_m$  presentó aproximadamente el mismo valor en las nanocajas y en la HRP. De tal forma que se puede considerar a las nanocajas como un sistema enzimático artificial.



**Figura 4.** Imágenes de la reacción de oxidación del TMB catalizada por las nanocajas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en diferentes tiempos. El TMB se torna de color azul cuando se oxida (Cai et al., 2015).

Debido a sus características como tamaño reducido y actividad peroxidasa intrínseca, es de interés utilizar las nanocajas para la inmovilización de enzimas provenientes de hongos ligninolíticos, para su aplicación en el campo de la biorremediación.

## 1.5 Hipótesis

Las enzimas lacasa y peroxidasa versátil inmovilizadas en nanocajas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  tendrán mayor rendimiento catalítico que las enzimas libres en solución.

## 1.6 Objetivos

### 1.6.1 Objetivo general

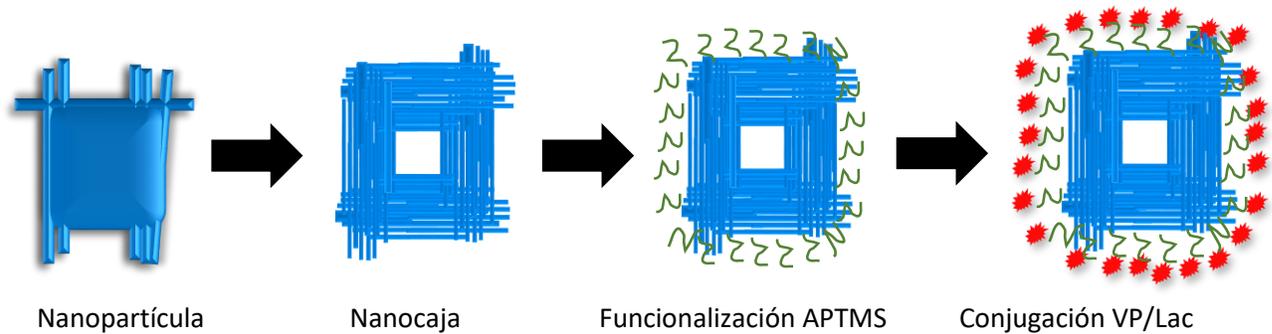
Inmovilizar las enzimas lacasa y peroxidasa versátil en nanocajas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  y evaluar su actividad catalítica.

### 1.6.2. Objetivos específicos

- Sintetizar y caracterizar nanocajas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ .
- Desarrollar estrategias de funcionalización de las nanocajas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ .
- Inmovilizar las enzimas lacasa y peroxidasa versátil en las nanocajas funcionalizadas.
- Caracterizar cinéticamente las nanocajas y las nanocajas biocatalíticas, y comparar su actividad catalítica con la de la enzima libre.

## Capítulo 2. Metodología

El procedimiento de síntesis desde una nanopartícula a una nanocaja biocatalítica de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  se describe a continuación. Dicho proceso se divide en cuatro etapas: síntesis de nanopartículas, síntesis de nanocajas, funcionalización y conjugación con la enzima (Figura 5). Los reactivos y equipos empleados también se presentan.



**Figura 5.** Proceso de conversión de una nanopartícula a una nanocaja biocatalítica de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ .

### 2.1 Enzimas y reactivos

Las enzimas peroxidasa versátil de *Bjerkandera adusta* (EC 1.11.1.16) y la lacasa de *Corioloopsis gallica* (EC 1.10.3.2) fueron aisladas y purificadas en el laboratorio de Bionanotecnología del CNYN de acuerdo a Rodríguez et al. (1999) y Tinoco et al. (2007), respectivamente.

Los siguientes reactivos se obtuvieron como se indica: el nitrato de cobre (II) trihidratado, ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 99%), el borohidruro de sodio, ( $\text{NaBH}_4$ , 98%) y la polivinilpirrolidona (PVP, peso molecular 55,000 y 1,300,000) se adquirieron de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). El cloruro de cobre (II) ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 99%) se adquirió de Fermont (Monterrey, Nuevo León, México). El hidróxido de amonio ( $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 29%) fue adquirido de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). El peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 30%) se compró a FAGALAB (Sinaloa, México). Los compuestos 2,6-dimetoxifenol (DMP), 2,2'-ácido azino-bis (3-etilbenzotiazolina 6-sulfónico diamonio) (ABTS), (3-aminopropil)trimetoxisilano (APTMS), trietilamina y N-hidroxisuccinimida (NHS) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). El N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida hidroclicorizado (EDC) fue adquirido de Fluka. El etanol (99.9%),

acetona (99.8%), metanol (99.9%) y tolueno (99.9%) se adquirieron de Fermont (Monterrey, Nuevo León, México).

## **2.2 Síntesis y caracterización**

### **2.2.1 Síntesis de nanopartículas de Cu(OH)<sub>2</sub>**

Las nanopartículas de Cu(OH)<sub>2</sub> se sintetizaron por el método de química húmeda propuesto por Cai et al. (2015). Se preparó una solución con 17 mg de CuCl<sub>2</sub> y 130.5 mg de PVP (P.M. 55,000) en 40 ml de etanol en un matraz de fondo plano de 100 ml y se resuspendieron en baño de ultrasonido por 10 minutos. Después la solución se colocó en agitación vigorosa durante 30 minutos. En un recipiente aparte se agregó 7.7 mg de NaBH<sub>4</sub> en 10 ml de etanol, y esta solución se agregó rápidamente a la solución anterior. La mezcla resultante se colocó en agitación vigorosa a temperatura ambiente (25°C) durante 72 horas. Para colectar el material, la solución se centrifugó por 8 minutos a 8,000 rpm, a temperatura ambiente en una centrífuga Beckman Coulter Avanti JXN-26. Posteriormente, las nanopartículas fueron recuperadas en el pellet y lavadas tres veces con etanol.

### **2.2.2 Síntesis de nanocajas de Cu(OH)<sub>2</sub>**

Las nanocajas de Cu(OH)<sub>2</sub> también se sintetizaron por el procedimiento reportado por Cai et al. (2015). Se preparó una solución con 10 mg de nanopartículas de Cu(OH)<sub>2</sub> y 20 mg de PVP (P.M. 1,300,000) en 20 ml de agua desionizada. La mezcla fue dispersada en un baño de ultrasonido durante 15 minutos, y se colocó en agitación vigorosa durante 15 minutos más. Se preparó una solución de cobre-amonio, agregando 24.16 mg de Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O en 5 ml de agua desionizada, y 400 µl de NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O (29%) en 14.6 ml agua desionizada. Estas dos soluciones se mezclaron y la solución resultante se agregó a solución inicial de nanopartículas y PVP. Dicha mezcla se agitó por 10 minutos. Después, para colectar los productos, la solución fue centrifugada durante 8 minutos a 8,000 rpm. Finalmente, se lavaron con acetona y metanol tres veces.

### **2.2.3 Caracterización por microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

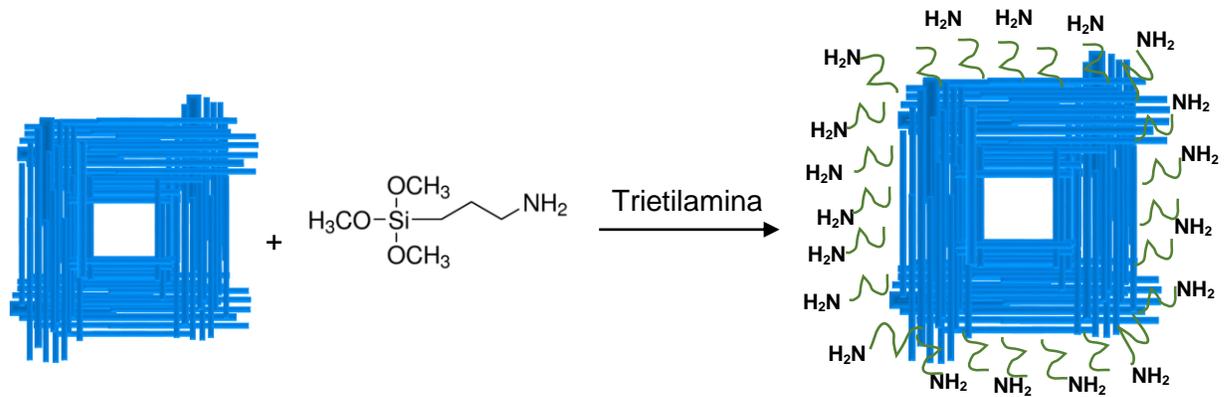
Las nanopartículas y nanocajas fueron analizadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) con el equipo JEOL-JEM 2010. Se utilizó una rejilla 300 mesh de cobre recubierta de carbono. En el caso de las nanocajas con enzima, las muestras se colocaron en una rejilla de cobre con películas de carbono lacey, y fueron teñidas con acetato de uranilo. Se dejaron secar durante 5 minutos. Se obtuvieron múltiples imágenes para determinar la distribución de tamaño de las nanopartículas utilizando el programa Digital Micrograph. Para ello se midió la longitud de borde de cada partícula y el resultado se expresó como un promedio del tamaño de todas las partículas.

### **2.2.4 Caracterización por difracción de rayos X (XRD)**

En esta técnica se incide un haz de rayos X sobre un material; si éste es cristalino se observa una dispersión coherente del haz de rayos X, y una interferencia constructiva de las ondas que se encuentran en fase y que son dispersadas en determinadas direcciones del espacio. El análisis XRD fue realizado en un difractómetro de rayos X de geometría bragg-brentano, modelo Philips X'pert MPD, con radiación Cu K $\alpha$  ( $\lambda=1.5406 \text{ \AA}$ ) para identificar la fase cristalina. Los datos fueron recolectados en el intervalo de  $10^\circ$  a  $80^\circ$ . Se empleó una tasa de escaneo de  $0.02^\circ$  cada 0.5 segundos, a temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ).

## **2.3 Funcionalización de las nanocajas de Cu(OH) $_2$**

Se utilizó el reactivo APTMS como agente ligante. En un tubo eppendorf, se disolvieron 10 mg de nanocajas de Cu(OH) $_2$  en 2 ml de tolueno y se resuspendieron en baño de ultrasonido durante 10 minutos. Después se agregaron 25  $\mu\text{l}$  de APTMS y 15  $\mu\text{l}$  de trietilamina. La solución se pasó a un matraz y se llevó a un volumen de 5 ml con tolueno. El oxígeno fue extraído utilizando atmosfera de nitrógeno, para después sellar el matraz completamente. La mezcla se dejó en agitación durante 6 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó en una micro centrifuga modelo 5415 C por 2 minutos a 8,000 rpm. Se recuperó el pellet, y se lavó con etanol tres veces.



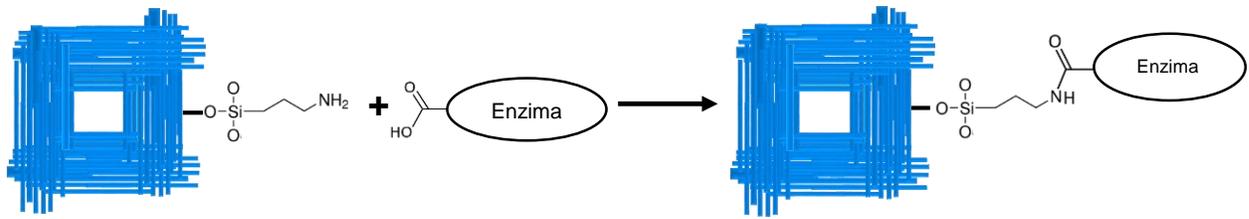
**Figura 6.** Funcionalización de una nanocaja de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  con el reactivo APTMS.

### 2.3.1 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

El análisis por FTIR se utilizó para confirmar la funcionalización de las nanocajas con el reactivo APTMS. Se llevó a cabo en el equipo Nicolet 5700 a temperatura ambiente, de  $400$  a  $4000\text{ cm}^{-1}$ . Las muestras no necesitaron de una preparación previa.

### 2.4 Conjugación de la lacasa y peroxidasa versátil en las nanocajas funcionalizadas

Los grupos amino expuestos sobre la superficie de las nanocajas funcionalizadas permiten la conjugación con la enzima mediante la formación de enlaces covalentes entre los grupos funcionales de la superficie de la enzima y los grupos amino de las nanocajas (Figura 7). Para ello, se colocaron  $5\text{ mg}$  de nanocajas funcionalizadas en un vial y se resuspendieron en  $2\text{ ml}$  de agua destilada. Posteriormente se colocaron en baño de ultrasonido por  $10$  minutos. Se agregó un volumen de la solución de la enzima (lacasa o peroxidasa versátil) y se homogenizó la muestra. Inmediatamente después se agregaron los activadores de carboxilos EDC y NHS en una concentración final de  $10\text{ mM}$  cada uno. El vial se mantuvo en agitación durante  $1$  hora a temperatura ambiente. Después, la solución se centrifugó por  $2$  minutos a  $6,000\text{ rpm}$ . Los productos se recuperaron en el pellet, y se lavaron repetidas veces con agua destilada.



**Figura 7.** Conjugación de las enzimas en nanocajas funcionalizadas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ . Los grupos amino expuestos en la superficie de las nanocajas forman un enlace covalente con los grupos carboxílicos expuestos sobre la superficie de la enzima.

#### 2.4.1 Potencial zeta

La determinación del potencial zeta de las nanocajas, nanocajas funcionalizadas y nanocajas biocatalíticas se llevó a cabo en el Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical). Estas mediciones se realizaron a los materiales recién sintetizados.

#### 2.4.2 Espectroscopía UV-Vis

La espectroscopía UV-Vis se llevó a cabo en el espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis. En una celda de cuarzo se colocaron 25  $\mu\text{l}$  del material, de una solución de 1 mg/ml, y 950  $\mu\text{l}$  de agua desionizada, y se midió su absorbancia de 200 a 700 nm.

#### 2.4.3 Análisis termogravimétrico TGA

El análisis termogravimétrico fue llevado a cabo en el equipo TGA DSC modelo sdt q600 TA Instruments. Se realizó en una atmósfera de oxígeno; la temperatura fue de 25 a 750  $^{\circ}\text{C}$ , con una rampa de calentamiento de 10  $^{\circ}\text{C}$  por minuto, y un flujo de aire de 100 ml/min.

## 2.5 Caracterización catalítica

### 2.5.1 Espectroscopía de Plasma ICP-OES

Se determinó el contenido de cobre en las diferentes preparaciones por medio del plasma de acoplamiento inductivo (ICP, por sus siglas en inglés) junto con el espectrofotómetro de emisión óptico (OES, por sus siglas en inglés) que constituyen el equipo ICP-OES. La medición se realizó en el equipo Vista –MPX CCD Simultaneous ICP-OES. Esta técnica se utiliza para determinar la concentración (en ppm) de algún elemento presente en la muestra. En este caso se realizó para cuantificar la cantidad de cobre. Para ello, la digestión de las muestras se llevó a cabo en una mezcla de HCl y HNO<sub>3</sub> en proporción 1:1 durante 24 h. Después se realizaron diluciones con agua desionizada. El equipo fue calibrado usando 0.5, 2 y 7 ppm de un estándar de cobre, y el blanco fue agua desionizada.

### 2.5.2 Cuantificación de la proteína

La concentración de la proteína lacasa y peroxidasa versátil en las nanocajas se determinó con el ensayo Bio-Rad, el cual se basa en el método Bradford. Primero, alícuotas con diferentes concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) se utilizaron como referencia. A cada una se les agregó 200 µl del reactivo de Bradford, para un volumen total de 1 ml. Se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos, y posteriormente se midió su absorbancia a 595 nm. Los resultados se graficaron en Absorbancia vs. [Proteína] para obtener una curva estándar. Posteriormente, se utilizó el mismo procedimiento para las nanocajas biocatalíticas. Para ello, una cierta cantidad de nanocajas biocatalíticas se colocaron en agua desionizada a un volumen total de 800 µl. La solución se resuspendió y se le agregó 200 µl del reactivo de Bradford. Después de 5 min se midió la absorbancia a 595 nm. La concentración de la proteína se determinó indirectamente a partir de la curva obtenida anteriormente.

### 2.5.3 Perfil de pH

Se evaluó el efecto del pH en la actividad catalítica de las nanocajas, nanocajas biocatalíticas y las enzimas libres en la oxidación del ABTS a 436 nm, utilizando el espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis. Se utilizó como sustrato el ABTS ( $\epsilon_{436} = 29300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) a una concentración final 500 µM, en presencia de

1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (a excepción de nanocajas-Lac y lacasa libre) y las cantidades necesarias de nanocajas, nanocajas biocatalíticas o enzima libre. La reacción se realizó en 1 ml con la solución amortiguadora de acetatos 60 mM al pH deseado: 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 7, 8.

#### 2.5.4 Medición de la actividad catalítica

La actividad catalítica se determinó colorimétricamente utilizando como sustratos el ABTS y DMP (Tabla 3), con el espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis. La reacción se llevó a cabo en 1 ml que contenía el sustrato a diferentes concentraciones, 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (a excepción de las nanocajas-lacasa), las cantidades necesarias de nanocajas y nanocajas biocatalíticas, y solución amortiguadora de acetatos 60 mM pH 4.

Los datos obtenidos se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten con una regresión no lineal de una hipérbola rectangular con el software CurveExpert Professional 2.6, con el cual se calcularon las constantes catalíticas  $k_{cat}$  y  $K_M$ .

**Tabla 3.** Sustratos utilizados en la determinación de la actividad catalítica

Sustrato	$\lambda$ (nm)	$\epsilon$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )
ABTS	436	29,300
DMP	468	49,600

## Capítulo 3. Resultados

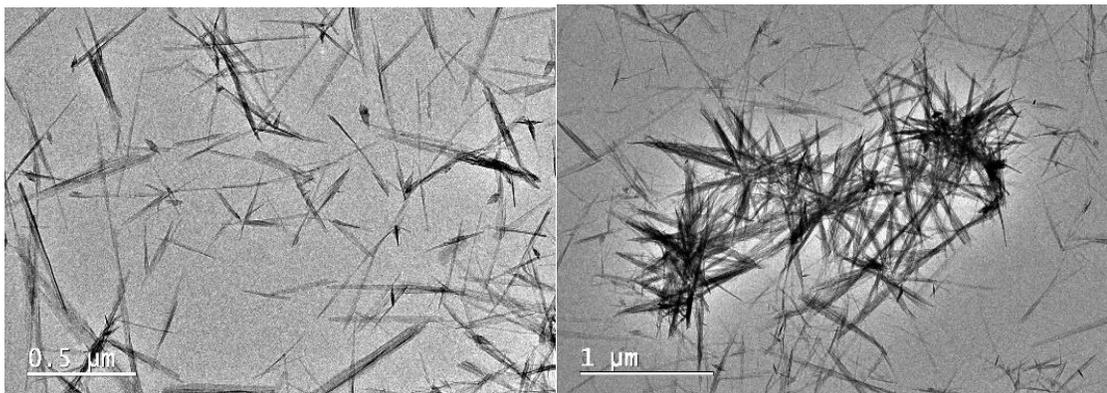
---

Este trabajo tiene como propósito el diseño de nanocajas biocatalíticas mediante la conjugación de enzimas en nanocajas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  y la evaluación de su actividad catalítica. Se realizó la síntesis de nanocajas a partir de nanopartículas amorfas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ , y se inmovilizaron dos enzimas: peroxidasa versátil y lacasa. Sus parámetros cinéticos fueron determinados con los sustratos: 2,6-dimetoxifenol y 2,2'-ácido azino-bis(3-etilbenzotiazolina 6-sulfónico diamonio), y se compararon con los parámetros de la enzima libre en solución. Enseguida se describen los resultados obtenidos.

### 3.1 Caracterización de nanopartículas y nanocajas de $\text{Cu}(\text{OH})_2$

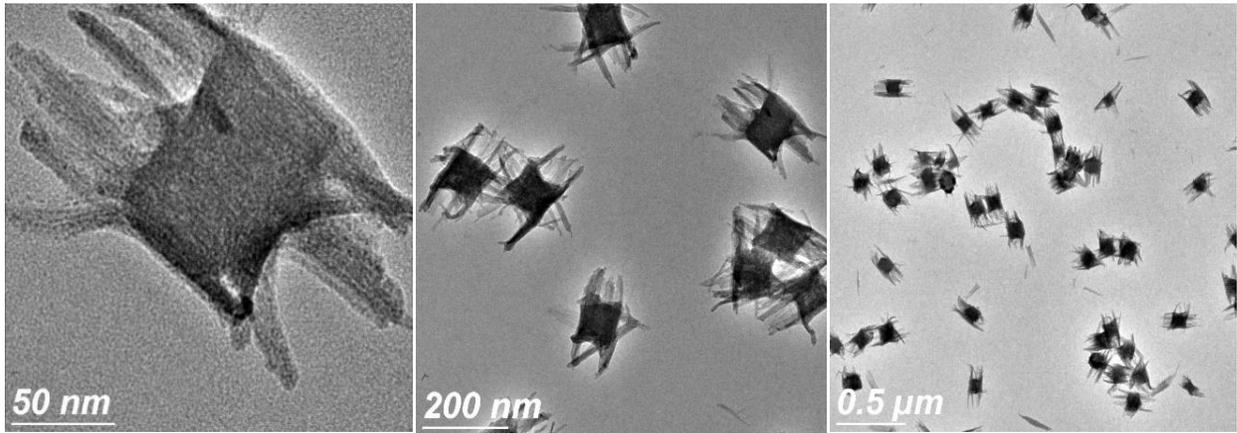
La primera parte del trabajo consistió en la síntesis y la caracterización de nanopartículas y nanocajas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  mediante el método de química húmeda. Las nanopartículas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  fueron sintetizadas a partir de  $\text{CuCl}_2$  y  $\text{NaBH}_4$  en una solución de etanol. El objetivo de sintetizar primero las nanopartículas fue que éstas sirven como precursores para la creación de nanocajas. Por su parte, las nanocajas se sintetizaron utilizando nanopartículas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  y  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Ambas síntesis destacan por su simpleza y que se llevan a cabo a temperatura ambiente.

Una vez obtenidos los materiales, se caracterizaron mediante dos técnicas. La primera fue por microscopía electrónica de transmisión, TEM (del inglés *Transmission electron microscopy*). Primeramente, se confirmó que las nanopartículas tuvieran la morfología y el tamaño esperado. Esta característica es muy importante debido a que da lugar a la formación de las nanocajas. En un primer intento de síntesis de nanopartículas, se obtuvieron nanoestructuras alargadas con forma de agujas, como se observa en la Figura 8.



**Figura 8.** Micrografías de TEM de las nanoagujas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ .

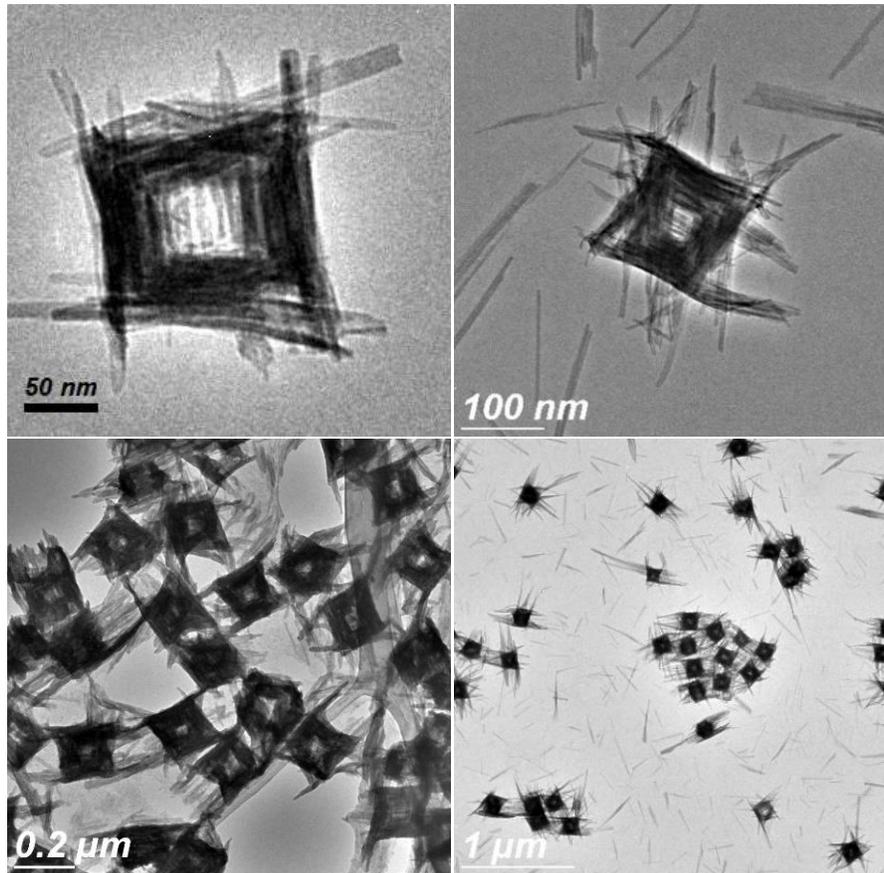
Al cambiar la velocidad de agitación durante la síntesis, de 150 rpm a 1000 rpm aproximadamente, se obtuvieron las nanopartículas con una morfología uniforme (Figura 9), adecuadas para el siguiente proceso de síntesis de nanocajas. Su tamaño promedio fue de 105 nm, como se observa en el histograma de la distribución de tamaño de la Figura 11 a. Además, no hubo aglomeración de partículas, a diferencia de las nanoagujas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ .



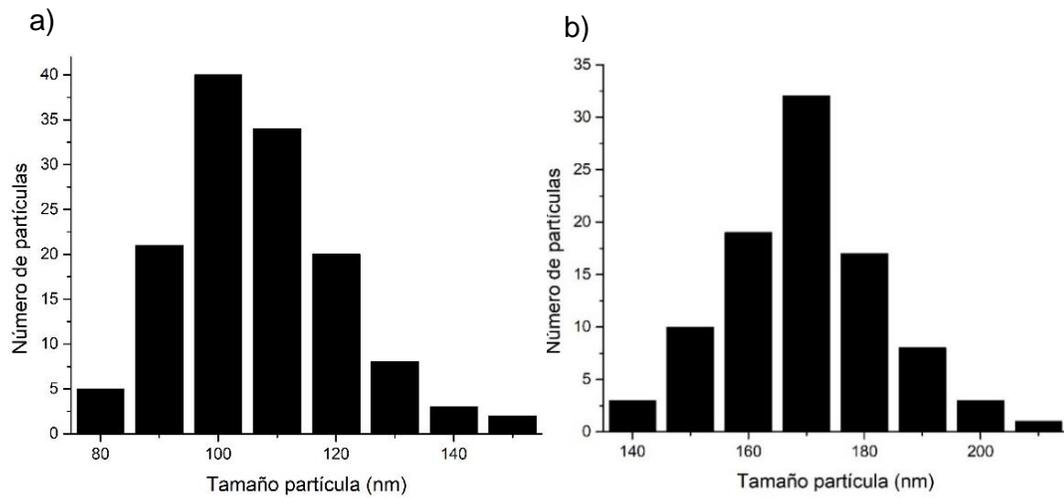
**Figura 9.** Micrografías de TEM de las nanopartículas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ .

Por otro lado, la morfología de las nanocajas se puede observar en la Figura 10. Estas nanoestructuras presentaron una forma cuadrangular con una cavidad en el centro de la partícula. La cavidad es una característica importante que será discutida más adelante. Además, tampoco se observaron aglomeraciones o cúmulos de éstas.

También se puede observar que las nanocajas están compuestas por nanocintas apiladas, debido a que los bordes sobresalientes que presentan tienen esa forma. Finalmente, el tamaño promedio de las nanocajas fue de  $170 \pm 30$  nm (Figura 11 b).

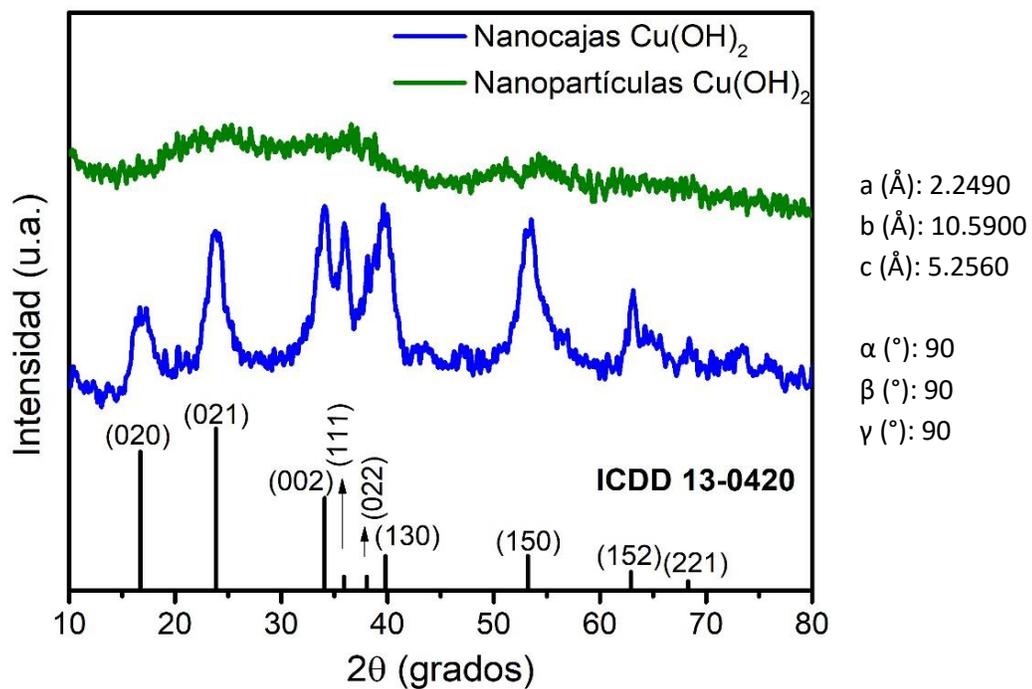


**Figura 10.** Micrografías de TEM de las nanocajas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ .



**Figura 11.** Distribución de tamaño de a) nanopartículas y, b) nanocajas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ .

La segunda técnica utilizada en la caracterización fue difracción de rayos X, XRD (del inglés *X-ray diffraction*). En la Figura 12 se muestran los difractogramas obtenidos de las nanocajas (azul) y las nanopartículas (verde). Las líneas verticales representan los picos de difracción reportados para el  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ . Debido a la coincidencia de los picos de difracción entre el difractograma de las nanocajas y los reportados en la literatura, se afirma que éstas están compuestas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  y que presentan un arreglo cristalino ortorrómbico. A la derecha de la figura 12 se muestran los parámetros de red, así como los ángulos entre los ejes. Por otro lado, las nanopartículas no mostraron ningún pico característico en su patrón de difracción, por lo que estas nanoestructuras no poseen cristalinidad, es decir, son amorfas.

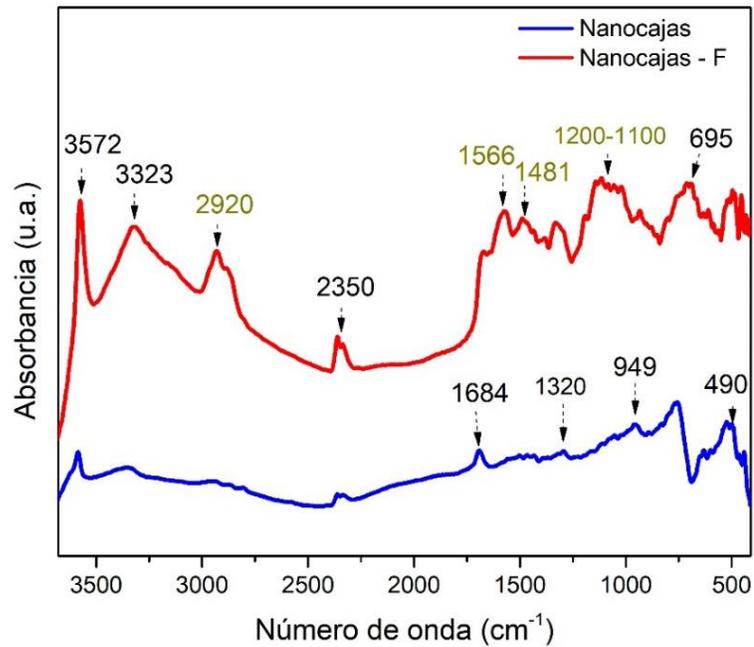


**Figura 12.** Patrón de difracción de rayos X de nanocajas y nanopartículas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ . Abajo se presenta la referencia y se indican los planos asociados a cada pico de difracción. A la derecha se presentan los parámetros de red de las nanocajas y sus ángulos entre ejes.

### 3.2 Funcionalización de las nanocajas de $\text{Cu}(\text{OH})_2$

Las nanocajas y las nanocajas funcionalizadas con APTMS fueron analizadas mediante espectroscopía FTIR (del inglés *Fourier-transform infrared spectroscopy*), con el objetivo de identificar la presencia de la molécula ligante unida al soporte. En la figura 13, se presenta los espectros IR de las nanocajas antes y después de la funcionalización. En la Tabla 4 se presentan los principales picos de estos espectros y los

modos de vibración correspondientes. Es importante resaltar la presencia de vibraciones del O-Si asociados a la molécula de APTMS, por lo que esto confirmaría la funcionalización de las nanocajas.



**Figura 13.** Espectros de IR de las nanocajas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  funcionalizadas con APTMS (línea roja) y de las nanocajas sin funcionalizar (línea azul).

**Tabla 4.** Principales picos característicos obtenidos a partir de FTIR de las nanocajas y nanocajas funcionalizadas.

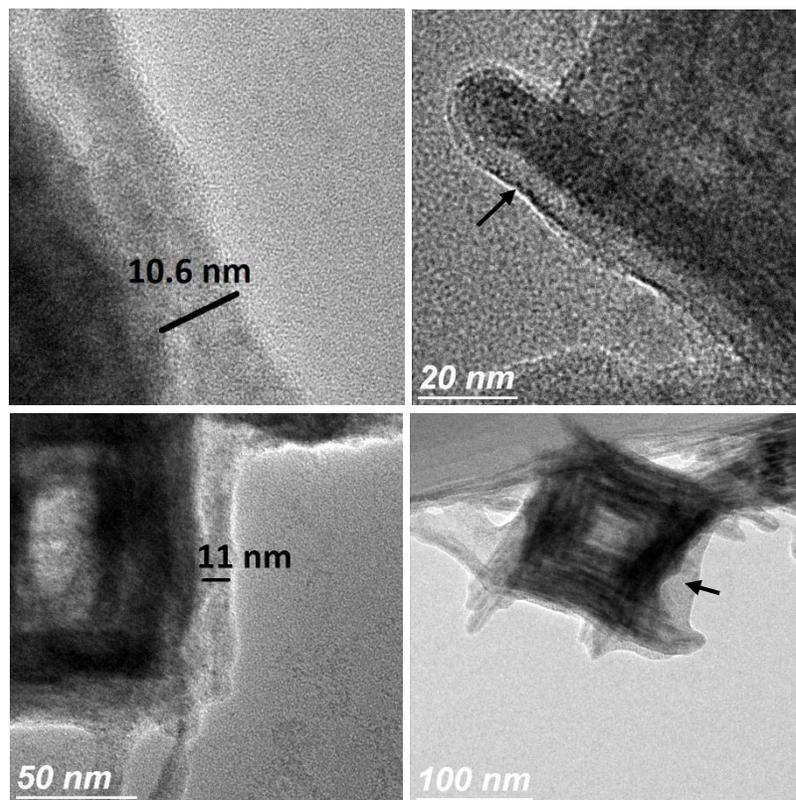
Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Funcionalidad	Referencia
423-949	Vibraciones del enlace Cu-O-H	Cai et al., 2015
949	Catión $\text{Cu}^{2+}$	Pramanik et al., 2014
1100-1200	Vibración asimétrica O-Si	Sabzi et al., 2009
1320	Vibración del enlace Cu-OH	Cai et al., 2015
1481, 1566	Picos característicos principales de los enlaces Si-O	Cheng et al., 2006
1684	Vibración de estiramiento del grupo carboxilato	Cai et al., 2015
2920	Vibración de estiramiento asimétrica del C-H (grupo metileno)	Sabzi et al., 2009
3323, 3572	Modos de estiramiento del grupo $\text{OH}^-$	Pramanik et al., 2014

### 3.3 Conjugación de enzimas en las nanocajas

Una vez obtenidas las nanocajas funcionalizadas con el APTMS, se realizó la conjugación con las enzimas lacasa y peroxidasa versátil. Dicha conjugación se evaluó por varios métodos, entre ellos midiendo la concentración de proteína presente en las nanocajas mediante el ensayo Bio-Rad. También se realizó un TGA, se midió su potencial zeta y se analizaron en el TEM para observar la presencia de las enzimas.

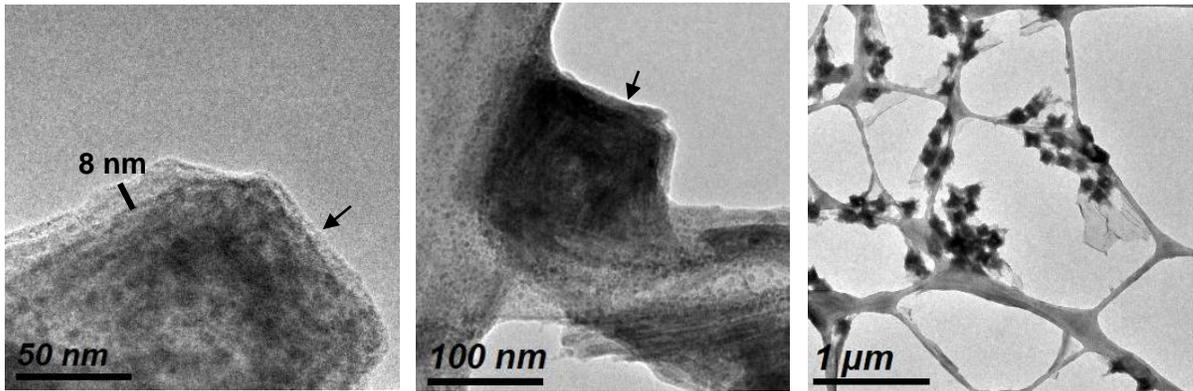
#### 3.3.1 Caracterización por TEM

En la Figura 14 se muestran las micrografías de las nanocajas con la peroxidasa versátil (Nanocajas-VP). Es posible observar la presencia de una capa externa en las nanocajas, cuyo espesor es de  $\sim 11$  nm. Esta nueva capa probablemente se deba a las enzimas conjugadas sobre la superficie del material.



**Figura 14.** Micrografías de TEM de las nanocajas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  después del proceso de conjugación con la enzima peroxidasa versátil. Tinción con acetato de uranilo.

En la Figura 15 se muestran las micrografías de las nanocajas con la lacasa (Nanocajas- Lac). No es posible visualizar de manera clara la capa formada por las enzimas sobre la superficie de las nanocajas, sin embargo, en estas imágenes se puede ver la presencia de un revestimiento. Éste tiene un espesor de 8 nm aproximadamente y se extiende a lo largo de toda la superficie de la partícula.



**Figura 15.** Micrografías de TEM de las nanocajas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  después del proceso de conjugación con la enzima lacasa. Tinción con acetato de uranilo.

### 3.3.2 Potencial Zeta ( $\zeta$ )

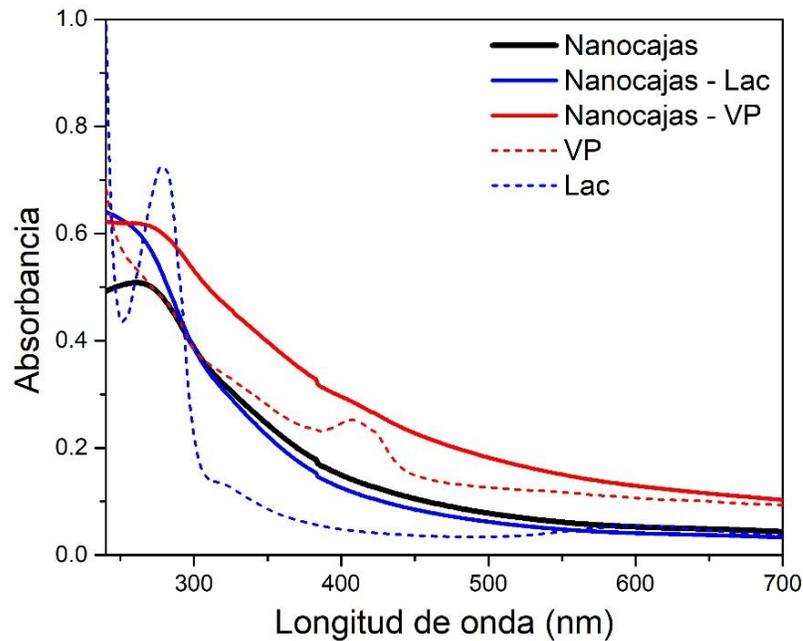
El potencial zeta ( $\zeta$ ) de las nanocajas, nanocajas funcionalizadas, nanocajas-VP y nanocajas-Lac en solución acuosa se muestra en la Tabla 5. La medición del potencial se realizó el mismo día de la síntesis de cada muestra. Las nanocajas funcionalizadas presentaron un valor positivo, +16 mV, dicho valor es diferente al presentado por las nanocajas sin funcionalizar, el cual fue negativo. Como era de esperarse, cuando se conjugaron las enzimas, el valor del potencial zeta también presentó un cambio con respecto al valor de las nanocajas sin enzimas.

**Tabla 5.** Valores de potencial zeta de las muestras en el día 1 de su síntesis.

Material	Potencial Zeta (mV)
Nanocajas	-5
Nanocajas - APTMS	+16
Nanocajas - VP	+ 5
Nanocajas - Lac	-11

### 3.3.3 Espectroscopía UV-Vis

En la Figura 16 se presentan los espectros de UV-Vis de las nanocajas y nanocajas con las enzimas conjugadas. Las nanocajas presentaron una absorción máxima alrededor de los 260 nm. Al analizar las nanocajas- VP y nanocajas-Lac se observó que éstas presentaron un aumento de absorbancia con respecto a las nanocajas sin enzimas. Para el caso de las nanocajas-Lac, su máxima absorbancia fue a los  $\sim 240$  nm.



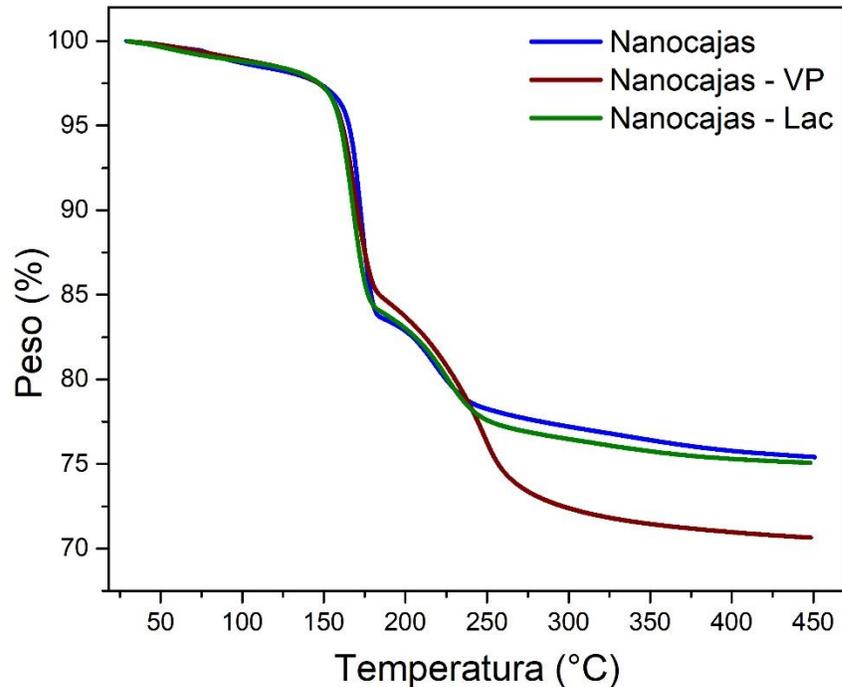
**Figura 16.** Espectros UV-Vis de las nanocajas y las nanocajas con las enzimas conjugadas (nanocajas-VP y nanocajas-Lac).

### 3.3.4 Análisis termogravimétrico TGA

Este análisis se realizó con dos propósitos. El primero fue conocer la temperatura de descomposición de las nanocajas-VP y nanocajas-Lac. Como comparación, el TGA también se realizó a las nanocajas sin enzimas. El segundo propósito fue cuantificar la cantidad de proteína en las nanocajas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ .

Las curvas de TGA de las muestras se presentan en la Figura 17. En la curva azul que corresponde a las nanocajas se observó una pérdida de peso bajo flujo de oxígeno. La pérdida de peso inicial, o pérdida de secado fue de  $\sim 2.3$  %. Posteriormente, la muestra perdió el 18.85 % de su peso total en el intervalo de temperatura de 170 a 245 °C. Este dato es consistente con otros estudios que reportan que a partir de los 170 °C el  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  pierde cerca del 20% de su peso (Durand-Keklikian y Matijevic, 1990). Por otro lado, las

muestras con enzima presentaron un comportamiento semejante. Después del secado, las nanocajas-VP y nanocajas-Lac perdieron el 19 % de su peso. Posteriormente se produjo otra pérdida después de los 250 °C, que se relaciona con la descomposición de la enzima conjugada, dicha pérdida fue del 3.7 % para las nanocajas-VP y del 0.53 % para las nanocajas-Lac.



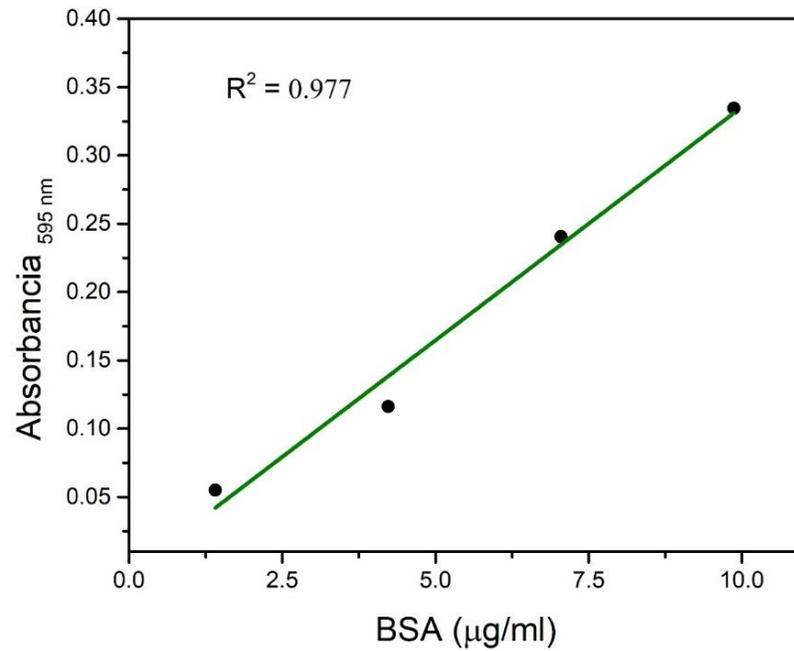
**Figura 17.** Análisis TGA de las nanocajas, y de las nanocajas con enzimas conjugadas.

### 3.4 Caracterización catalítica

#### 3.4.1 Cuantificación de la proteína

La Figura 18 muestra la curva de absorbancia estándar obtenida usando el BSA como proteína estándar y el reactivo colorante del ensayo de proteína Bio-Rad. Se obtuvo una respuesta lineal cuando se graficó la absorbancia medida a 595 nm vs concentración de la proteína. La siguiente ecuación representa el comportamiento lineal de la curva:

$$[\text{proteína}](\mu\text{g/ml}) = 29.90 (\text{Abs}_{595}) \quad (1)$$

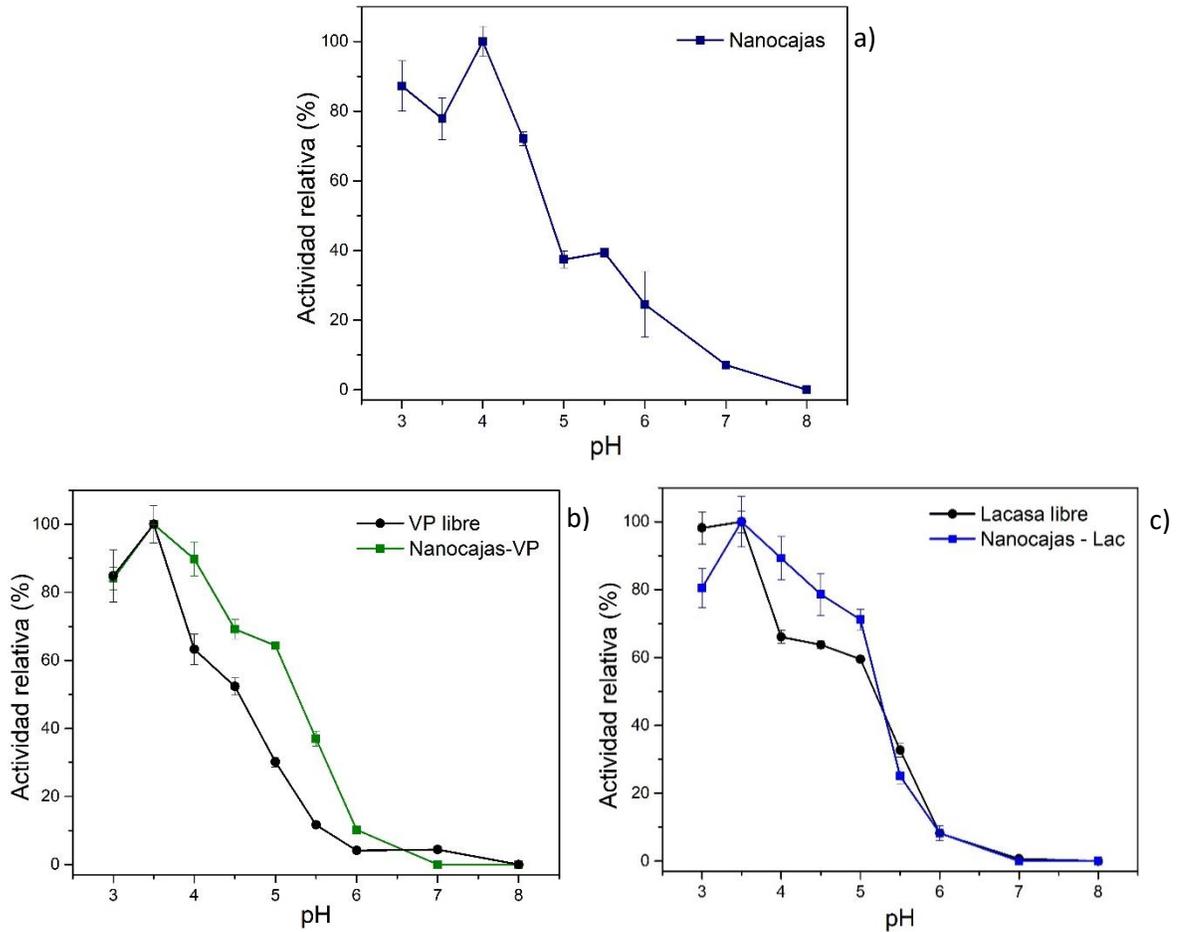


**Figura 18.** Curva de absorbancia estándar del reactivo colorante de Bio-Rad con albúmina de suero bovino (BSA).

La determinación de las concentraciones de las proteínas conjugadas mostró un valor de 139 µg de VP/mg de Cu(OH)<sub>2</sub> para las nanocajas-VP y de 25 µg de Lac/mg de Cu(OH)<sub>2</sub> en las nanocajas-Lac. Experimentos de control de solamente nanocajas no mostraron absorción con el reactivo colorante.

### 3.4.2 Perfil de pH

La actividad enzimática fue evaluada a distintos pH. En la Figura 19 a) se muestra el perfil de pH con las nanocajas de Cu(OH)<sub>2</sub>, éstas tuvieron su mayor actividad a pH 4. En la Figura 19 b) se observa que la mayor actividad de las nanocajas-VP es a pH 3.5, aunque a pH 4, la actividad sigue siendo muy alta, a diferencia de la VP libre que su actividad bajó a poco más del 60 %. Por su parte, las nanocajas-Lac tuvieron mayor actividad a pH 3.5, mientras que a pH 4 su actividad relativa fue del 90%.

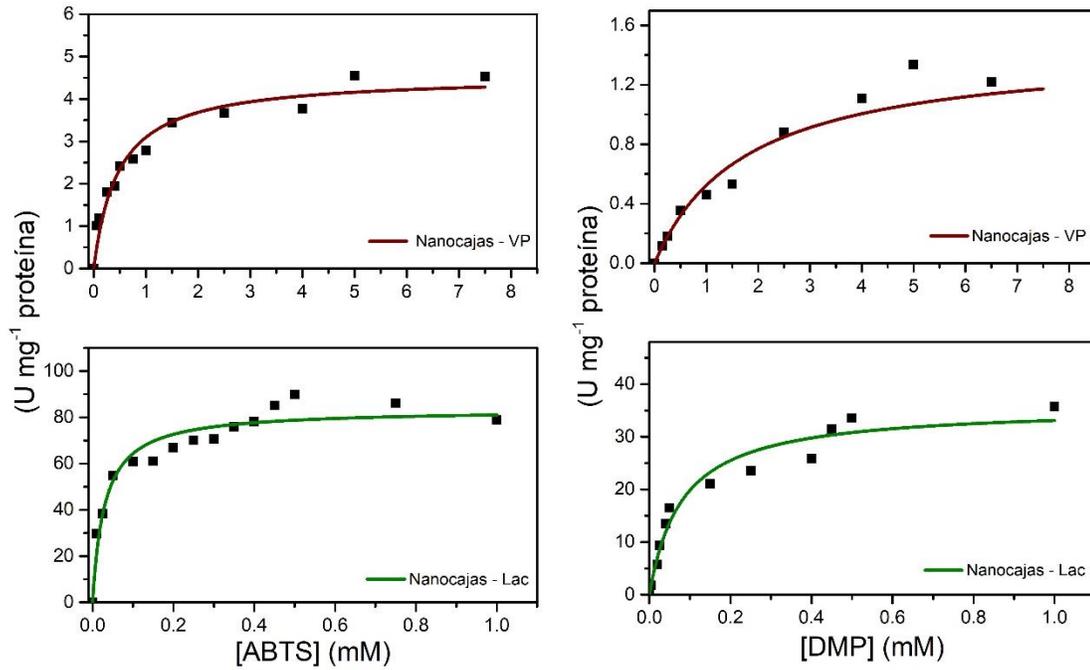


**Figura 19.** Evaluación de la actividad catalítica de las a) nanocajas, b) nanocajas-VP y c) nanocajas-Lac a distintos valores de pH. Como comparación, se muestra la actividad relativa de las enzimas VP y lacasa libre.

### 3.4.3 Medición de la actividad catalítica

Las propiedades catalíticas de las nanocajas y nanocajas-VP y Lac fueron determinadas para dos diferentes sustratos. Para ello se utilizaron diferentes concentraciones de cada sustrato hasta llegar al punto de saturación, y los datos se ajustaron a un modelo de Michaelis-Menten (Figura 20). Los parámetros obtenidos se presentan en la Tabla 6. Primeramente, se determinó la actividad catalítica usando las nanocajas sin enzimas. Éstas presentaron mayor afinidad hacia el sustrato ABTS que al 2,6,-DMP, ya que su valor de  $K_M$  fue menor un orden de magnitud. El valor de  $k_{cat}$  en  $U\ mg^{-1}$  de Cu fue 10 veces mayor con el ABTS, confirmando la mayor afinidad por este sustrato.

Los valores de la  $K_M$  de las nanocajas-VP fueron ligeramente menores a las de las nanocajas, sin embargo, no fueron significativos; en las nanocajas-Lac dichos valores disminuyeron un orden de magnitud con el ABTS, y dos órdenes con el 2,6-DMP. Esta mayor afinidad se reflejó en un aumento de la eficiencia catalítica de las nanocajas-Lac con ambos sustratos, tanto en  $U\ mg^{-1}$  de proteína, como con  $U\ mg^{-1}$  de Cu.



**Figura 20.** Comportamiento cinético de las nanocajas-VP y nanocajas-Lac en la oxidación del ABTS y 2,6-DMP.

**Tabla 6.** Constantes catalíticas de nanocajas y nanocajas-enzima con dos diferentes sustratos.

		ABTS			DMP		
		$k_{cat}$ (U mg <sup>-1</sup> )	$K_M$ (mM)	$k_{cat} / K_M$ (U mg <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )	$k_{cat}$ (U mg <sup>-1</sup> )	$K_M$ (mM)	$k_{cat} / K_M$ (U mg <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )
Nanocajas		-	0.65	-	-	5.6	-
	Cobre	56.5		87	670.0		120
Nanocajas-VP	Proteína	4.52	0.45	10.04	1.93	3.02	0.6
	Cobre	1497.3		3327	638		211.25
Nanocajas-Lac	Proteína	83.43	0.03	2781	35.9	0.082	437.8
	Cobre	1861.5		62050	1067		13012

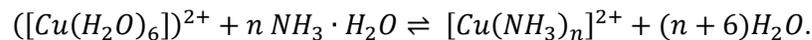
## Capítulo 4. Discusión

---

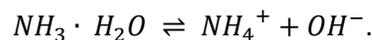
### 4.1 Síntesis de nanocajas de $\text{Cu}(\text{OH})_2$

En el primer intento de síntesis de nanocajas, la morfología que se obtuvo fue de nanoagujas. Esta morfología ha sido muy reportada con el  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  (Durand-Keklikian y Matijevic, 1990; Wu et al., 2005). Las propiedades catalíticas están dadas en parte por el tipo material y el tamaño de partícula, por lo que las nanoagujas también son catalizadores. Sin embargo, se persistió en obtener nanopartículas huecas debido a su actividad peroxidasa intrínseca, que incluso es mayor que la actividad de las nanopartículas amorfas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  (Ver Anexo 1). Una nanopartícula en forma de caja brinda un panorama poco explorado de la catálisis.

Las nanocajas fueron sintetizadas por el método de química húmeda, mediante un proceso *top-down* a partir de nanopartículas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  (Figura 10). Primeramente, se agregó cierta cantidad de PVP a las nanopartículas en solución. Uno de los objetivos de adicionar PVP fue proteger las nanopartículas del crecimiento y la aglomeración debido a que se genera una cubierta sobre su superficie. Sin embargo, la principal razón es que la capa de PVP controla la velocidad de la reacción. Además, se ha reportado que la PVP también sirve como agente que dirige la forma (en inglés *shape-directing agent*), es decir, su concentración y peso molecular es fundamental para controlar la morfología durante la síntesis de los nanomateriales (Koczkur et al., 2015). La siguiente reacción se llevó a cabo con el complejo de cobre-amoniaco:

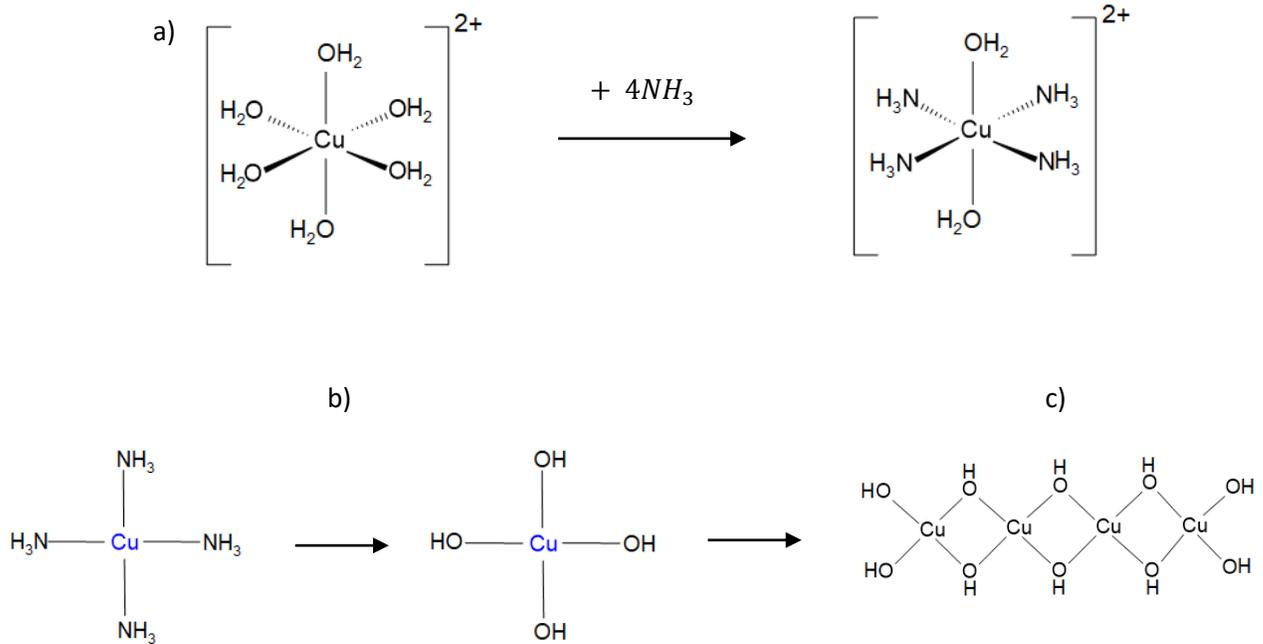


Cuando se agregó el complejo a la solución con las nanopartículas, los iones de  $\text{Cu}^{2+}$  de la superficie de las nanopartículas se coordinaron con el  $\text{NH}_3$ , dando lugar al compuesto  $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_n]^{2+}$  (Figura 20 a). A su vez, también se generaron los grupos  $\text{NH}_4^+$ :



Posteriormente, los grupos  $\text{OH}^-$  reemplazaron los  $\text{NH}_3$  del compuesto  $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_n]^{2+}$  (Figura 20 b). Estos compuestos tienden a coordinarse con una geometría cuadrada plana, generando una cadena que se extiende sobre la superficie de la partícula. La coordinación entre los iones de  $\text{Cu}^{2+}$  y los grupos  $\text{OH}^-$  hace

posible que las cadenas se conecten y generen estructuras laminares más largas, llamadas *nanocintas* (Figura 20 c). Éstas se apilan alrededor de las nanopartículas mediante enlaces de hidrógeno. La generación de estas nanocintas conlleva a que los iones de  $\text{Cu}^{2+}$  migren de la parte interna al exterior de la partícula, dando lugar a una cavidad hueca (Cai et al., 2015).



**Figura 21.** Esquema de la formación de las nanocajas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  mediante la reacción con el complejo cobre-amoniaco: a) los iones de  $\text{Cu}^{2+}$  se coordinan con el  $\text{NH}_3$ , b) los grupos  $\text{OH}^-$  reemplazan los  $\text{NH}_3$  y se organizan con una geometría cuadrada plana, y c) formación de una cadena debido a la coordinación de los iones de  $\text{Cu}^{2+}$  y los  $\text{OH}^-$ .

La cavidad en las nanopartículas ha demostrado cambiar sus propiedades catalíticas con respecto a nanopartículas sólidas. Y es que una cavidad brinda además de mayor área superficial, dos tipos de superficie para que se lleve a cabo una reacción catalítica. Esta estrategia de incrementar la eficiencia de los catalizadores mediante el aumento de la proporción de los átomos expuestos sobre la superficie ha sido muy explorada. Sin embargo, optimizar la síntesis de los nanomateriales mediante el control de sus caras cristalográficas ha resultado difícil (Zhang et al., 2015). De la Figura 10 se puede notar la presencia de las cavidades en las nanocajas, mismas que no están presentes en las nanopartículas amorfas. Debido al tamaño que ambas nanopartículas presentan es posible afirmar que a partir de una nanopartícula amorfa, sin cavidad y con bordes, se formó una nanocaja con una fase cristalina ortorrómbica.

En la figura 12 se observa el difractograma de las nanocajas. La forma de los picos nos da cierta información de las dimensiones que tienen los planos reflejantes. Debido a una interferencia destructiva incompleta en las direcciones en las que los rayos X se desfasan, se produce un ensanchamiento de los picos. Es decir, la forma de los picos nos dice el grado de cristalinidad, y en este caso, las nanocajas presentaron una baja cristalinidad debido a la anchura en sus picos característicos.

## 4.2 Funcionalización de nanocajas de $\text{Cu}(\text{OH})_2$

Después de la síntesis y de la caracterización, se realizó la funcionalización de las nanocajas con el APTMS. Esta molécula presenta en uno de sus extremos un grupo amino, y en el otro un grupo metilo unido a un átomo de oxígeno (Ver Anexo X). La reacción tiene lugar entre los grupos metoxi del APTMS y los grupos  $\text{OH}^-$  de la superficie de las nanocajas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ . El APTMS residual es eliminado cuando el material se lava con etanol. Del análisis FTIR de ambas muestras es posible identificar la presencia de los grupos  $\text{OH}^-$  provenientes de la molécula de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ , así como las vibraciones de los enlaces Cu-OH, Cu-O-H y del catión  $\text{Cu}^{2+}$ . Los picos en  $1684 \text{ cm}^{-1}$  pueden atribuirse a las vibraciones de estiramiento del grupo carboxilato de la PVP que fue absorbida (Cai et al., 2015). Además, en la muestra de las nanocajas funcionalizadas se identificaron las vibraciones del grupo C-H (grupo metileno), y principalmente las de la molécula O-Si, asociados a la molécula de APTMS, por lo que esto confirmaría la funcionalización de las nanocajas (Figura 13). Los picos en  $2350 \text{ cm}^{-1}$  se deben al  $\text{CO}_2$  de fondo durante la medición (Galhotra et al., 2009).

## 4.3 Conjugación de enzimas en nanocajas de $\text{Cu}(\text{OH})_2$

La conjugación de las enzimas y las nanocajas se evaluó por varios métodos. Primeramente, imágenes de TEM de las nanocajas-VP y nanocajas-Lac fueron obtenidas. En estas imágenes fue evidente la presencia de una capa sobre la superficie de las nanocajas, la cual no se había observado en imágenes previas de únicamente nanocajas. El grosor de esta capa fue de 11 y 8 nm para las nanocajas-VP y nanocajas-Lac, respectivamente. Una enzima VP de *Pleurotus eryngii* tiene un tamaño promedio de 9.6 nm (Ruiz-Dueñas et al., 2008), mientras que una enzima lacasa de *Coriolopsis gallica* mide 4.5-6 nm aproximadamente (Ruiz-Arellano et al., 2016). Por lo anterior, muy probablemente la capa formada alrededor de las nanocajas es una capa monomolecular de enzimas conjugadas en su superficie.

### 4.3.1 Potencial zeta

Al modificar la superficie de una partícula, se produce un cambio en su potencial zeta (Tabla 5). Éste es una medida de la magnitud de atracción o repulsión electrostática entre partículas. El potencial zeta puede representar las interacciones electrostáticas que hay entre una enzima y su soporte (Min et al., 2012). El potencial zeta de las nanocajas fue negativo debido a los grupos  $\text{OH}^-$  presentes en su superficie.

Cuando las nanocajas se funcionalizaron con APTMS, el potencial zeta fue positivo, debido a la presencia de los grupos amino que quedaron expuestos. Esto a su vez confirma la unión de la molécula ligando en la superficie de las nanocajas. Por otro lado, la magnitud del valor es un indicador de la estabilidad de una dispersión coloidal, y en este caso, los valores indican que las nanocajas tienen una baja estabilidad. Cuando se conjugaron las enzimas en las nanocajas funcionalizadas el potencial zeta cambió su valor. El cambio confirma la reacción química sobre la superficie de las nanocajas. En el caso de las nanocajas-Lac, el potencial zeta fue de -11 mV, el cual es consistente con el potencial zeta reportado para la lacasa libre (Zhang et al., 2015).

### 4.3.2 Espectroscopía UV-Vis

La caracterización por UV-Vis permitió observar un cambio entre la absorbancia de las nanocajas y las nanocajas-enzima (Figura 16). El aumento de la absorbancia en las muestras se asocia a la unión de las enzimas en el material, el cual provoca que cambie el ambiente químico. No se ha reportado la caracterización UV-Vis de nanocajas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  por lo que no es posible compararla con otros reportes. Por otro lado, es bien sabido que las proteínas tienen un espectro característico de absorción UV a 280 nm, derivado de los aminoácidos aromáticos como la tirosina y el triptófano, y en menor medida de la fenilalanina (Gill y von Hippel, 1989). Ésta sería una posible explicación al aumento de absorbancia cercano a esta longitud de onda, ya que las enzimas contienen residuos de aminoácidos aromáticos en su superficie.

### 4.3.3 Análisis termogravimétrico (TGA)

Las nanocajas presentaron una temperatura de descomposición entre los 170 - 240 °C, la cual es atribuida a la descomposición del  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  a  $\text{CuO}$  y  $\text{H}_2\text{O}$  (Wu y Shi, 2006). Es bien sabido que este material se descompone fácilmente, debido a la tendencia del  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  de perder sus protones en una atmósfera oxidante. Durante este proceso, el color de las nanocajas cambió de azul a negro.

Por su parte, las nanocajas-enzima presentaron dos temperaturas de descomposición (Figura 17). La primera es atribuida a la deshidratación del  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  a los 170 °C, y la segunda se atribuye a la descomposición de las proteínas posterior a los 250 °C. Kurniawan et al. reportaron que la lacasa se descompone a los 300 °C (2013). Esta temperatura es superior a la descomposición observada en este análisis. Una posible explicación es que la fijación en las nanocajas afectó las propiedades térmicas de las enzimas, haciéndolas propensas a la descomposición a una temperatura más baja.

## 4.4 Caracterización catalítica

### 4.4.1 Perfil de pH

Se determinó el efecto del pH sobre la actividad catalítica de las nanocajas, nanocajas-VP y nanocajas-Lac con el sustrato ABTS en un intervalo de pH de 3 a 8 (Figura 19). Además, también se evaluó dicho efecto en las enzimas libres. El pH óptimo de las nanocajas fue de 4, que es menor al reportado por Cai et al. de 4.5 para el sustrato TMB. Las nanocajas-VP y nanocajas-Lac tuvieron un pH óptimo a 3.5, mismo valor que presentó el pH óptimo de la enzima libre VP. La enzima lacasa presentó su máxima actividad en el intervalo de pH de 3 y 3.5. Este valor es consistente con otros trabajos que reportan el pH óptimo de la lacasa libre en la oxidación del ABTS entre 3 y 3.5, además muestran una disminución de entre 35-40% de la actividad relativa cuando el pH es 4 (Fang et al., 2009; Liu et al., 2012). La tendencia de las enzimas libres de reducir su actividad catalítica conforme el pH es más básico se conservó con las nanocajas-Lac y nanocajas-VP. Sin embargo, estas últimas conservaron el 90% de su actividad a un pH 4. Este cambio es debido al efecto de la conjugación en las nanocajas.

#### 4.4.2 Medición de actividad catalítica

Si un material de soporte tiene actividad intrínseca, la medición de los parámetros cinéticos es una buena forma de comprobar que una enzima fue conjugada correctamente, ya que la actividad catalítica aumenta considerablemente, siempre y cuando no se haya producido una alteración en el sitio activo de la enzima. En este trabajo se utilizaron dos tipos de enzimas para la conjugación y dos sustratos diferentes (Tabla 6). También se evaluó la actividad catalítica de las nanocajas sin enzimas.

Como se mencionó anteriormente, las nanocajas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  poseen actividad peroxidasa intrínseca, por lo que actúan como catalizadores en presencia de peróxido de hidrógeno. Ya ha sido demostrada su actividad en la oxidación del TMB por Cai et al., y en este trabajo se comprobó que las nanocajas también pueden catalizar la oxidación del ABTS y el 2,6-DMP. Esta reacción se lleva a cabo debido a la capacidad del cobre de catalizar eficientemente reacciones que involucran mecanismos de uno o dos electrones, dependiendo de su estado de oxidación.

La reacción de oxidación del ABTS catalizada por las nanocajas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  en presencia  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tiene lugar en dos reacciones sucesivas. Primero, el  $\text{Cu}^{2+}$  sustrae un electrón del ABTS, pasando a un estado  $\text{Cu}^{1+}$ , y generando un catión radical  $\text{ABTS}^+$ . El electrón que acaba de adquirir el  $\text{Cu}^{1+}$  es transferido a la molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , regresando a su estado inicial  $\text{Cu}^{2+}$ , mientras que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  se reduce y genera  $\text{H}_2\text{O}$ . Esta reacción se repite para dar lugar al  $\text{ABTS}^{2+}$ , la forma oxidada del ABTS. Una reacción parecida sucede con el 2,6-DMP. Las moléculas de 2,6-DMP sufren una oxidación de un solo electrón y generan las especies radicales 2,6-dimetoxi-fenoxilo. Estas moléculas entran en resonancia con otras especies, y se produce una recombinación de dos especies radicales. El producto de la oxidación del 2,6-DMP es el 3,3',5,5'-tetrametoxi bifenil-4,4'-diol (TMBP).

Adicionalmente, al tener una cavidad hueca, las nanocajas brindan mayor área superficial y por lo tanto mayor contacto entre las moléculas del sustrato y el material, a diferencia de una partícula sólida. Mahmoud et al. propusieron que las reacciones catalizadas con nanopartículas huecas ocurren dentro la cavidad, por lo que puede existir un confinamiento de las moléculas de los sustratos, provocando una interacción más rápida con el catalizador o entre ellas mismas, acelerando la velocidad de la reacción. Según Mahmoud et al., el mecanismo heterogéneo probablemente domina más en la catálisis con nanopartículas huecas, es decir, que las reacciones ocurren en la superficie de la cavidad de las nanopartículas si ésta no presenta defectos. De acuerdo con los resultados de XRD, las nanocajas presentaron baja cristalinidad, por lo que en su estructura presentan defectos cristalinos. Estos defectos

pueden aumentar la participación de la catálisis del tipo homogénea, que tiene lugar en solución mediante complejos que implican iones o átomos metálicos provenientes del material.

Cuando una enzima cataliza una reacción, sustratos de bajo peso molecular pueden ingresar a su sitio activo y ser oxidados. Como se mencionó antes, las nanocajas-Lac presentaron un aumento en la actividad catalítica con ambos sustratos en comparación con las nanocajas. Este aumento es debido a la presencia de las enzimas, que poseen una mayor especificidad. Pero, además, las nanocajas-Lac superaron la eficiencia catalítica reportada para la lacasa libre en la oxidación del ABTS y el 2,6-DMP (Tabla 7).

Se ha reportado que, en ausencia de cobre durante la síntesis de la lacasa, la apoenzima o la enzima conteniendo solo 3 o menos de los 4 cobres presentes en su estructura pueden plegarse correctamente, pero no logran catalizar las reacciones. Sin embargo, al agregar soluciones que liberan iones de cobre como  $\text{CuSO}_4$  en el medio de cultivo se incrementa la actividad lacasa, debido a que la cantidad de moléculas de enzimas activas es mucho mayor (Huber y Lerch, 1987).

Numerosos estudios reportan un incremento en la actividad catalítica de la lacasa si durante su síntesis hubo presencia de cobre, por lo que se ha descrito al cobre como un eficiente inductor de la actividad lacasa (Palmieri et al., 2000; Galhaup y Haltrich, 2001). Recordando que, la lacasa es una enzima multicobre, que presenta cuatro átomos de cobre en tres sitios redox, en los cuales se da la oxidación de los sustratos junto con la reducción del oxígeno molecular a agua. Es posible que el soporte de las nanocajas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  sea una fuente de átomos de cobre que reestablezcan alguna pérdida de cobre en uno de los sitios activos de la enzima. Esto puede explicar la acción del cobre sobre la actividad lacasa (Farnet et al., 1999).

La eficiencia catalítica de las nanocajas-VP resultó ser hasta dos órdenes de magnitud menor comparada con la de la enzima libre. Una de las explicaciones es que el cobre, no ejerce el mismo efecto debido a que la enzima VP posee un átomo de Fe en su sitio activo, el cual no podría ser compensado con los de Cu. Hasta la fecha no hay un estudio que determine el efecto del Cu en la actividad peroxidasa de la VP. Sin embargo, Makela et al. (2013) reportaron que la producción de MnP, otra enzima peroxidasa, sólo fue inducida por cobre en cultivos con alta concentración de nitrógeno en sus nutrientes.

**Tabla 7.** Comparación de los parámetros cinéticos de las enzimas libres lacasa y peroxidasa versátil con los parámetros de las nanocajas-VP y nanocajas-Lac.

	VP libre			Lacasa libre			Referencia
	$k_{cat}$ (U mg <sup>-1</sup> )	$K_M$ (mM)	$k_{cat}/K_M$ (U mg <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )	$k_{cat}$ (U mg <sup>-1</sup> )	$K_M$ (mM)	$k_{cat}/K_M$ (U mg <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )	
<b>ABTS</b>	37	0.21	176.2				Heinfling et al., 1998.
	47	0.19	247.4				Heinfling et al., 1998.
				4.6	0.023	197.4	Zhang et al., 2015.
	4.52	0.45	<b>10.04</b>	83.43	0.03	<b>2781</b>	Este trabajo
<b>DMP</b>	28	0.17	164.7				Heinfling et al., 1998.
	28	0.16	175				Heinfling et al., 1998.
				2.5	0.035	71.4	Martorana et al., 2014.
				2.5	0.046	54.3	Zhang et al., 2015.
		1.93	3.02	<b>0.6</b>	35.9	0.082	<b>437.8</b>

## Capítulo 5. Conclusiones

---

- En este trabajo se lograron sintetizar nanocajas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  a partir de nanopartículas amorfas. A través de los resultados de XRD, se identificó la presencia de la estructura ortorrómbica de las nanocajas y que las nanopartículas no poseen cristalinidad.
- Se funcionalizaron las nanocajas con la molécula de APTMS, y se confirmó su presencia con FTIR.
- Se diseñó un protocolo para la conjugación de las enzimas lacasa y peroxidasa versátil en las nanocajas. Imágenes de TEM mostraron la presencia de las enzimas sobre la superficie de dichas estructuras, con un espesor de capa de 11 nm con la VP y 8 nm con la lacasa.
- Los valores de potencial zeta fueron diferentes en cada paso del diseño, lo que concuerda con la modificación en la superficie de las partículas.
- El ensayo Bio-Rad y el TGA mostraron mayor cantidad de enzima VP conjugada en las nanocajas en comparación con la cantidad de enzima lacasa presente en las nanocajas-Lac.
- Las nanocajas-Lac (nanocajas + enzima lacasa) mostraron mayor rendimiento catalítico que el reportado para la enzima libre con los sustratos ABTS Y 2,6-DMP. Se concluye que la presencia de átomos de cobre aumenta el rendimiento catalítico de la enzima, al tratarse ésta de una enzima multicobre.
- El rendimiento catalítico de las nanocajas-VP (nanocajas + enzima peroxidasa versátil) fue dos órdenes de magnitud menor al reportado para la enzima libre. Esto puede deberse a que el Cu no tiene el mismo efecto en esta enzima ya en su sitio activo presenta un átomo de Fe.

Finalmente, este trabajo representa el primer diseño de síntesis de un nanoconjugado catalítico de nanocajas de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ -enzima oxidoreductasa. Se encontró que hay un efecto positivo en términos de eficiencia catalítica con respecto a la enzima libre en el caso de la lacasa probablemente debido al suministro de átomos de cobre a los sitios activos de la enzima.

## Literatura citada

---

- Adrees, M., Ali, S., Rizwan, M., Ibrahim, M., Abbas, F., Farid, M., Zia-ur-Rehman, M., Irshad, M.K., Bharwana, S.A. 2015. The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review. *environmental science and pollution research* 22 (11): 8148-62. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4496-5>
- Ahmadi, T., Wang, Z.L., Green, T.C., Henglein, A., El-Sayed, M.A. 1996. Shape-controlled synthesis of colloidal platinum nanoparticles. *Science (New York, N.Y.)* 272 (7): 1924-26. <https://doi.org/10.1126/science.272.5270.1924>
- Alarcón-Payán, D.A., Koyani, R.D., Vazquez-Duhalt, R. 2017. Chitosan-based biocatalytic nanoparticles for pollutant removal from wastewater. *Enzyme and Microbial Technology* 100 (5): 71-78. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.02.008>
- An, N., Zhou, C.H., Zhuang, X.Y., Tong, D.S., Yu, W.H. 2015. Immobilization of enzymes on clay minerals for biocatalysts and biosensors. *Applied Clay Science* 114 (9): 283-96. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2015.05.029>
- Andreescu, S., Njagi, J., Ispas, C. 2008. Chapter 7 - Nanostructured materials for enzyme immobilization and biosensors. *The New Frontiers of Organic and Composite Nanotechnology*, 355-94. Amsterdam: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-008045052-0.50009-9>
- Ang, E.L., Zhao, H., Obbard, J.P. 2005. Recent advances in the bioremediation of persistent organic pollutants via biomolecular engineering. *Enzyme and Microbial Technology* 37 (5): 487-96. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.07.024>
- Ayala Aceves, M., Baratto, M.C., Basosi, R., Vazquez-Duhalt, R., Pogni, R. 2001. Spectroscopic characterization of a manganese–lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera adusta* in the absence of manganese: evidence of a protein centred radical by hydrogen peroxide. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 16 (3): 159-67. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(01\)00056-X](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(01)00056-X)
- Baldrian, P. 2006. Fungal Laccases - Occurrence and Properties. *FEMS Microbiology Reviews* 30 (2): 215-42. <https://doi.org/10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x>
- Cai, R., Yang, D., Peng, S., Chen, X., Huang, Y., Liu, Y., Hou, W., Yang, S., Liu, Z., Tan, W. 2015. Single nanoparticle to 3d supercage: framing for an artificial enzyme system. *Journal of the American Chemical Society* 137 (43): 13957-63. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b09337>
- Chen, M., Yao, S., Zhang, H., Liang, X. 2010. Purification and characterization of a versatile peroxidase from edible mushroom *pleurotus eryngii*. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 18 (5): 824-29. [https://doi.org/10.1016/S1004-9541\(09\)60134-8](https://doi.org/10.1016/S1004-9541(09)60134-8)
- Cheng, Q., Li, C., Pavlinek, V., Saha, P., Wang, H. 2006. Surface-modified antibacterial TiO<sub>2</sub>/Ag+ nanoparticles: Preparation and properties. *Applied Surface Science* 252 (12): 4154-60. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2005.06.022>
- Chibwe, L., Davie-Martin, C.L., Aitken, M.D., Hoh, E., Massey Simonich, S.L. 2017. Identification of polar transformation products and high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in

- contaminated soil following bioremediation. *The Science of the Total Environment* 599-600 (12): 1099-1107. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.190>
- Chung, K.T., Stevens, S.E., Cerniglia, C.E. 1992. The reduction of azo dyes by the intestinal microflora. *Critical Reviews in Microbiology* 18 (3): 175-90. <https://doi.org/10.3109/10408419209114557>
- Cipolatti, E.P., A. Silva, M.J., Klein, M., Feddern, V., Feltes, M.M.C., Oliveira, J.V., Ninow, J.L., De Oliveira, D. 2014. Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic Complete* (99): 56-67. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.10.019>
- Collins, P.J., W. Dobson, A.D., Field, J.A. 1998. Reduction of the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-Sulfonate) cation radical by physiological organic acids in the absence and presence of manganese. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (6): 2026-31
- Durand-Keklikian, L., Matijević, E. 1990. Needle-type colloidal copper (ii)hydroxide particles. *Colloid and Polymer Science* 268 (12): 1151–58. <https://doi.org/10.1007/BF01410681>
- Eibes, G., Arca-Ramos, A., Feijoo, G., Lema, J.M., Moreira, M.T. 2015. Enzymatic technologies for remediation of hydrophobic organic pollutants in soil. *applied microbiology and biotechnology* 99 (21): 8815-29. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6872-y>
- Eş, I., Gonçalves Vieira, J.D., Corrêa Amaral, A. 2015. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99 (5): 2065-82. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6390-y>
- Fang, H., Huang, J., Ding, L., Li, M., Chen, Z. 2009. Preparation of magnetic chitosan nanoparticles and immobilization of laccase. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.* 24 (1): 42–47. <https://doi.org/10.1007/s11595-009-1042-7>
- Farnet, A.M, Tagger, S., Petit, J.L. 1999. Effects of copper and aromatic inducers on the laccases of the white-rot fungus *Marasmius quercophilus*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* 322 (6): 499–503. [https://doi.org/10.1016/S0764-4469\(99\)80100-0](https://doi.org/10.1016/S0764-4469(99)80100-0)
- Flemming, C. A., Trevors, J.T. 1989. Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. *water, air, and soil pollution* 44 (1-2): 143-58. <https://doi.org/10.1007/BF00228784>
- Galhaup, C., Haltrich, D. 2001. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *trametes pubescens* in the presence of copper. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56 (1–2): 225–32.
- Galhotra, P., Navea, J.G., Larsen, S.C., Grassian, V.H. 2009. Carbon Dioxide (C16O2 and C18O2) Adsorption in zeolite  $\gamma$  materials: effect of cation, adsorbed water and particle size. *Energy & Environmental Science* 2 (4): 401-9. <https://doi.org/10.1039/B814908A>
- Gawande, M.B., Goswami, A., Felpin, F.X., Asefa, T., Huang, X., Silva, R., Zou, X., Zboril, R., Varma, R.S. 2016. Cu and Cu-based nanoparticles: synthesis and applications in catalysis. *Chemical Reviews* 116 (6): 3722-3811. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00482>
- Gianfreda, L., Rao, M.A. 2004. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enzyme and Microbial Technology* 35 (4): 339-54. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.05.006>

- Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S., Sannia, G. 2010. Laccases: a never-ending story. *cellular and molecular life sciences* 67 (3): 369-85. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0169-1>
- Gill, S.C., Von Hippel, P.H. 1989. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry* 182 (2): 319-26. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90602-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90602-7)
- Guisan, J.M. 2006. Immobilization of enzymes and cells. Springer Science & Business Media.
- Heinfling, A., Martínez, M.A., Martínez, A.T., Bergbauer, M., Szewzyk, U. 1998. Purification and characterization of peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta*. *FEMS Microbiology Letters* 165 (1): 43–50. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13125.x>.
- Heinfling, A., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., Bergbauer, M., Szewzyk, U., Martínez, A.T. 1998. A study on reducing substrates of manganese-oxidizing peroxidases from *Pleurotus eryngii* and *Bjerkandera adusta*. *FEBS Letters* 428 (3): 141–46. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00512-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00512-2).
- Henglein, A. 1989. Small-particle research: physicochemical properties of extremely small colloidal metal and semiconductor particles. *Chemical Reviews* 89 (8): 1861-73. <https://doi.org/10.1021/cr00098a010>
- Huber, M., Lerch, K. 1987. The influence of copper on the induction of tyrosinase and laccase in *Neurospora crassa*. *FEBS Letters* 219 (2): 335–38.
- Ingle, A.P., Duran, N., Rai, M. 2014. Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (3): 1001-9. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5422-8>
- Jones, S.M., Solomon, E.I. 2015. Electron transfer and reaction mechanism of laccases. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 72 (5): 869-83. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1826-6>
- Kadri, T., Rouissi, T., Kaur Brar S., Cledon M., Sarma, S., Verma, M. 2017. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: A review. *Journal of Environmental Sciences* 51 (1): 52-74. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.08.023>
- Koczur, K.M., Mourdikoudis, S., Polavarapu, L., Skrabalak, S.E. 2015. Polyvinylpyrrolidone (PVP) in nanoparticle synthesis. *Dalton Transactions* 44 (41): 17883–905. <https://doi.org/10.1039/C5DT02964C>
- Koyani, R.D., Vazquez-Duhalt, R. 2016. Laccase encapsulation in chitosan nanoparticles enhances the protein stability against microbial degradation. *Environmental Science and Pollution Research International* 23 (18): 18850-57. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7072-8>
- Krajewska, B. 2004. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology* 35 (2): 126-39. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.12.013>
- Kurniawan R.A., Aulanni' am, Shieh F.K., Chu P.P. 2013. Carbon nanotube covalently attached laccase biocathode for biofuel cell. *J. Pure App Chem. Res* 2013;2: 79-88. <http://dx.doi.org/10.21776/ub.jpacr.2013.002.02.143>

- LaGrow, A.P., Sinatra, L., Elshewy, A., Huang, K.W., Katsiev, K., Kirmani, A.R., Amassian, A., Anjum, D.H., Bakr, O.M. 2014. Synthesis of copper hydroxide branched nanocages and their transformation to copper oxide. *The Journal of Physical Chemistry C* 118 (33): 19374-79. <https://doi.org/10.1021/jp503612k>
- Li, H., Hou, J., Duan, L., Ji, C., Zhang, Y., Chen, V. 2017. Graphene oxide-enzyme hybrid nanoflowers for efficient water soluble dye removal. *Journal of Hazardous Materials* 338 (9): 93-101. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.05.014>
- Lin, G., Jia, W., Lu, W., Jiang, L. 2011. Copper hydroxide nano and microcrystal: facile synthesis, shape evolution and their catalytic properties. *Journal of Colloid and Interface Science* 353 (2): 392-97. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.10.003>
- Liu, Y., Zeng, Z., Zeng, G., Tang, L., Pang, Y., Li, Z., Liu, C., Lei, X., Wu, M., Ren, P., Liu, Z., Chen, M., Xie, G. 2012. Immobilization of laccase on magnetic bimodal mesoporous carbon and the application in the removal of phenolic compounds. *Bioresource Technology* 115 (julio): 21-26. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.015>
- Macek, T., Macková, M., Káš, J. 2000. Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnology Advances* 18 (1): 23-34. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00034-8](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00034-8)
- Mahmoud, M.A., Saira, F., El-Sayed, M.A. 2010. Experimental evidence for the nanocage effect in catalysis with hollow nanoparticles. *Nano Letters* 10 (9): 3764-69. <https://doi.org/10.1021/nl102497u>
- Mäkelä, M.R., Lundell, T., Hatakka, A., Hildén, K. 2013. Effect of copper, nutrient nitrogen, and wood-supplement on the production of lignin-modifying enzymes by the white-rot fungus *Phlebia radiata*. *Fungal Biology* 117 (1): 62-70. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.11.006>
- Martorana, A., Vazquez-Duhalt, R., Aguila, S.A., Basosi, R., Baratto, M.C. 2014. Spectroscopic characterization of 2,6-dimethoxyphenol radical intermediates in the *Coriopsis gallica* laccase-mediator system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 107 (septiembre): 100-105. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.05.023>
- Min, K., Kim, J., Park, K., Yoo, Y.J. 2012. Enzyme immobilization on carbon nanomaterials: Loading density investigation and zeta potential analysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 83 (noviembre): 87-93. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.07.009>
- Min, K., Yoo, Y.J. 2014. Recent progress in nanobiocatalysis for enzyme immobilization and its application. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 19 (4): 553-67. <https://doi.org/10.1007/s12257-014-0173-7>
- Mohamad, N.R., Che Marzuki, N.H., Buang, N.A., Huyop, F., Wahab, R.A. 2015. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology, Biotechnological Equipment* 29 (2): 205-20. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>
- Moreira, P.R., Duez, C., Dehareng, D., Antunes, A., Almeida-Vara, E., Frère, J.M., Malcata, F.X., Duarte, J.C. 2005. Molecular characterisation of a versatile peroxidase from a *Bjerkandera* Strain. *Journal of Biotechnology* 118 (4): 339-52. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.05.014>

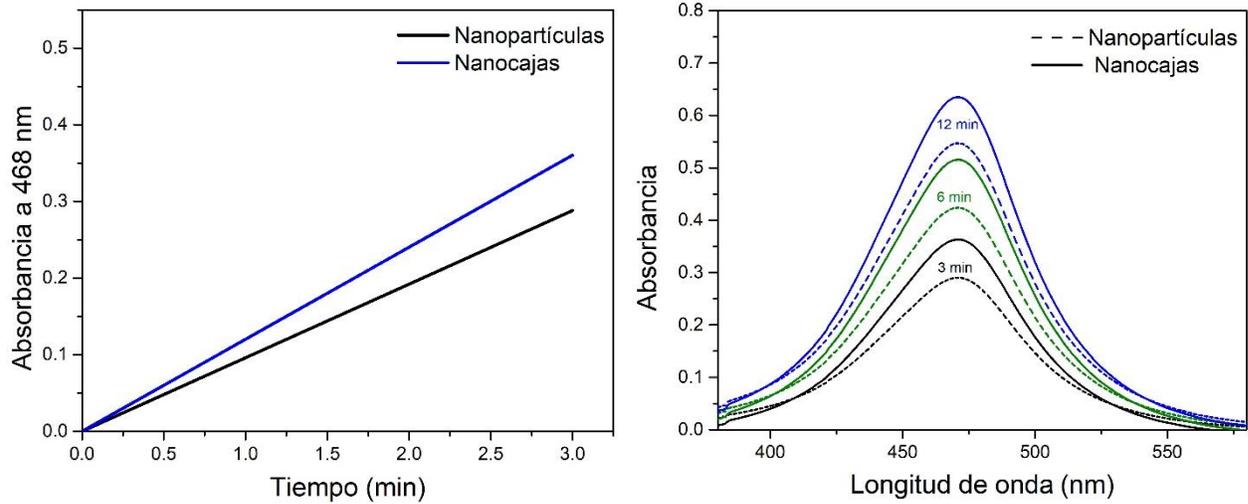
- Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Gorbacheva, M.A., Shleev, S.V., Yaropolov, A.I. 2007. "Blue" Laccases. *Biochemistry. Biokhimiia* 72 (10): 1136-50
- Mukherjee, S., Basak, B., Bhunia, B., Dey, A., Mondal, B. 2013. Potential use of polyphenol oxidases (PPO) in the bioremediation of phenolic contaminants containing industrial wastewater. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 12 (1): 61-73. <https://doi.org/10.1007/s11157-012-9302-y>
- Naidja, A., Huang, P.M., Bollag, J.M. 2000. Enzyme-clay interactions and their impact on transformations of natural and anthropogenic organic compounds in soil. *Journal of Environmental Quality* 29 (3): 677-91. <https://doi.org/10.2134/jeq2000.00472425002900030002x>
- Pérez-Boada, M., Ruiz-Dueñas, F.J., Pogni, R., Basosi, R., Choinowski, T., Martínez, M.J., Piontek, K., 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. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.09.047>
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B., Sannia, G. 2000. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (3): 920-24.
- Petkova, G.A., Cyrillicamil Záruba, C.K., Zvátora, P., Král, V. 2012. Gold and silver nanoparticles for biomolecule immobilization and enzymatic catalysis. *Nanoscale Research Letters* 7 (1): 287. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-7-287>
- Pogni, R., Baratto, M.C., Giansanti, S., Teutloff, C., Verdin, J., Valderrama, B., Lenzian, F., Lubitz, W., Vazquez-Duhalt, R., Basosi, R. 2005. Tryptophan-based radical in the catalytic mechanism of versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*. *Biochemistry* 44 (11): 4267-74. <https://doi.org/10.1021/bi047474l>
- Pramanik, A., Maiti, S., Mahanty, S. 2014. Metal hydroxides as a conversion electrode for lithium-ion batteries: a case study with a Cu(OH)<sub>2</sub> nanoflower array. *Journal of Materials Chemistry A* 2 (43): 18515-22. <https://doi.org/10.1039/C4TA03379E>
- Rao, M.A., Scelza, R., Scotti, R., Gianfreda, L. 2010. Role of enzymes in the remediation of polluted environments. *Journal of soil science and plant nutrition* 10 (3): 333-53. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162010000100008>
- Rodriguez, E., Pickard, M.A., Vazquez-Duhalt R. 1999. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Current Microbiol.* 38: 27-32. <https://doi.org/10.1007/PL00006767>
- Ruiz-Arellano, R.R., Diaz, A., Ayala, M., De la Mora, E., Rudino-Pinera, E. Crystallographic structural determination of a trigonal laccase from *Coriolopsis gallica* (CgL) to 1.5 Å resolution. Protein Data Bank. Consultado el 01 de agosto del 2018, de <http://www.rcsb.org/structure/5A7E>
- Ruiz-Dueñas, F.J., Morales, M., Mate, M.J., Romero, A., Martinez, M.J., Smith, A., Martinez, A.T. 2008. Site-directed mutagenesis of the catalytic tryptophan environment in *pleurotus eryngii* versatile peroxidase. *Biochemistry*, 47, 1685-1695. Consultado el 01 de agosto del 2018, de <http://www.rcsb.org/structure/2VKA>

- Sánchez-Alejandro, F., Juárez-Moreno, K., Baratto, M.C., Basosi, R., Vazquez-Duhalt, R. 2016. Tryptophan-surface modification of versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta* enhances its catalytic performance. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 124 (2): 45-51. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.12.001>
- Sarkar, J.M., Leonowicz, A., Bollag, J.M. 1989. Immobilization of enzymes on clays and soils. *Soil Biology and Biochemistry* 21 (2): 223-30. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(89\)90098-9](https://doi.org/10.1016/0038-0717(89)90098-9)
- Scott, C., Pandey, G., Hartley, C.J., Jackson, C.J., Cheesman, M.J., Taylor, M.C., Pandey, R. 2008. The enzymatic basis for pesticide bioremediation. *Indian Journal of Microbiology* 48 (1): 65-79. <https://doi.org/10.1007/s12088-008-0007-4>
- Seetharam, G.B., Saville, B.A. 2003. Degradation of phenol using tyrosinase immobilized on siliceous supports. *Water Research* 37 (2): 436-40
- Shackery, I., Patil, U., Pezeshki, A., Shinde, N.M., Kang, S., Im, S., Jun, S.C. 2016. Copper hydroxide nanorods decorated porous graphene foam electrodes for non-enzymatic glucose sensing. *Electrochimica Acta* 191 (2): 954-61. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2016.01.047>
- Siddiqui, K.S., Ertan, H., Charlton, T., Poljak, A., Daud Khaled, A.K., Yang, X., Marshall, G., 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 (5): 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.03.002>
- Solís Segura, L., López Arriaga, J. A. 2006. Principios básicos de contaminación ambiental. Primera Edición. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México. ISBN: 9688358134
- Sun, Y., Mayers, B., Xia, Y. 2003. Metal nanostructures with hollow interiors. *Advanced Materials* 15 (7-8): 641-46. <https://doi.org/10.1002/adma.200301639>
- Sun, Y., Xia, Y. 2002. Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. *Science (New York, N.Y.)* 298 (5601): 2176-79. <https://doi.org/10.1126/science.1077229>
- Taboada-Puig, R., Eibes, G., Lloret, L., Lú-Chau, L.A., Feijoo, G., Moreira, M.T., Lema, J.M. 2016. Fostering the action of versatile peroxidase as a highly efficient biocatalyst for the removal of endocrine disrupting compounds. *New Biotechnology* 33 (1): 187-95. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.05.003>
- Tanokura, M., Miyakawa, T., Guan, L., Hou, F. 2015. Structural analysis of enzymes used for bioindustry and bioremediation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 79 (9): 1391-1401. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1052770>
- Thurston, C.F. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140 (1): 19-26. <https://doi.org/10.1099/13500872-140-1-19>
- Tinoco, R., Verdin, J., 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. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2007.01.006>
- Tishchenko, K.I., Beloglazkina, E.K., Mazhuga, A.G., Zyk, N.V. 2016. Copper-containing enzymes: site types and low-molecular-weight model compounds. *Review Journal of Chemistry* 6 (1): 49-82. <https://doi.org/10.1134/S207997801601002>

- Trejo, J.A.V. 2002. Tecnologías de remediación para suelos contaminados. Instituto Nacional de Ecología.
- Tyagi, M., R. da Fonseca, M.M., R. de Carvalho, C.C. 2011. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation* 22 (2): 231-41. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9394-4>
- Upadhyay, P., Shrivastava, R., Agrawal, P.K. 2016. Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. *3 Biotech* 6 (1). <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0316-3>
- Valderrama, B., Ayala, M., Vazquez-Duhalt, R. 2002. Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes. *Chemistry & Biology* 9 (5): 555-65.
- Wong, Dominic W. S. 2009. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 157 (2): 174-209. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8279-z>
- Wu, X., Bai, H., Zhang, J., Chen, F., Shi, G. 2005. Copper hydroxide nanoneedle and nanotube arrays fabricated by anodization of copper. *The Journal of Physical Chemistry B* 109 (48): 22836–42. <https://doi.org/10.1021/jp054350p>
- Wu, X., Shi, G. 2006. Production and characterization of stable superhydrophobic surfaces based on copper hydroxide nanoneedles mimicking the legs of water striders. *The Journal of Physical Chemistry B* 110 (23): 11247–52. <https://doi.org/10.1021/jp056969x>
- WWF. 2017. Pollution. Consultado el 19 de mayo de 2017 de <http://www.worldwildlife.org/threats/pollution>
- Yadav, M., Yadav, H.S. 2015. Applications of ligninolytic enzymes to pollutants, wastewater, dyes, soil, coal, paper and polymers. *Environmental Chemistry Letters*.
- Yair, S., Ofer, B., Arik, E., Shai, S., Yossi, R., Tzvika, D., Amir, K. 2008. Organophosphate degrading microorganisms and enzymes as biocatalysts in environmental and personal decontamination applications. *Critical Reviews in Biotechnology* 28 (4): 265-75. <https://doi.org/10.1080/07388550802455742>
- Yoshida, H. 1883. LXIII.—Chemistry of Lacquer (Urushi). Part I. Communication from the Chemical Society of Tokio. *Journal of the Chemical Society, Transactions* 43 (0): 472-86. <https://doi.org/10.1039/CT8834300472>
- Zhang, L., Roling, L.T., Wang, X., Vara, M., Chi, M., Liu, J., Choi, S. Park, J., Herron, J.A., Xie, Z., Mavrikakis, M., Xia, Y. 2015. Platinum-based nanocages with subnanometer-thick walls and well-defined, controllable facets. *Science* 349 (6246): 412–16. <https://doi.org/10.1126/science.aab0801>
- Zhang, X., Hua, M., Lv, L., Pan, B. 2015. Ionic polymer-coated laccase with high activity and enhanced stability: application in the decolourisation of water containing AO7. *Scientific Reports* 5 (febrero): 8253. <https://doi.org/10.1038/srep08253>

## Anexos

### Anexo 1



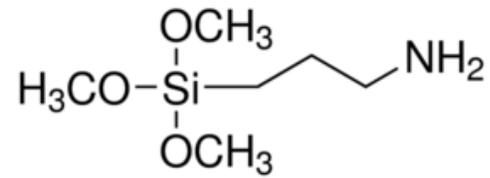
**Figura 22.** En la izquierda se observan las gráficas de actividad de las nanocajas y nanopartículas usando como sustrato 1.5 mM de DMP. A la derecha se muestran los espectros de absorción en la oxidación del DMP con nanopartículas y nanocajas a diferentes periodos de tiempo.

**Tabla 8.** Tabla de la actividad específica obtenida en la oxidación del DMP con 30 $\mu$ g de nanocajas vs nanopartículas. Las nanocajas presentaron  $\sim$  25% mayor actividad por mg de Cu que las nanopartículas para esta reacción.

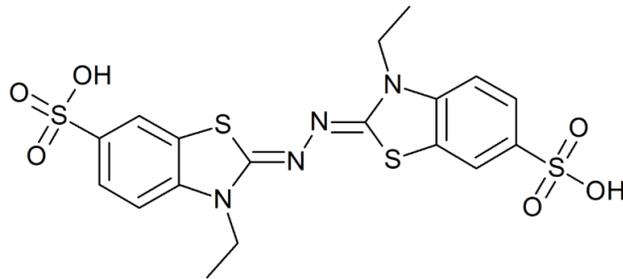
	<b>Actividad específica (U mg<sup>-1</sup> Cu)</b>
<b>Nanopartículas</b>	111.6
<b>Nanocajas</b>	139.6

**Anexo 2**

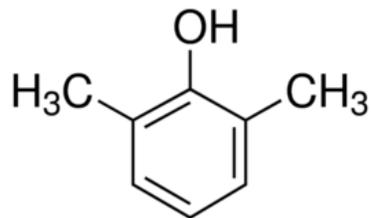
Estructuras



(3-aminopropil)trimetoxisilano (APTMS)



2,2'-ácido azino-bis(3-etilbenzotiazolina 6-sulfónico diamonio) (ABTS)



2,6-dimetoxifenol (DMP)