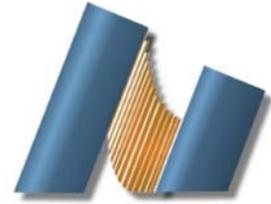




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
CENTRO DE NANOCIENCIA Y NANOTECNOLOGÍA



LICENCIATURA EN NANOTECNOLOGÍA
BIOTECNOLOGÍA

INMOVILIZACIÓN DE LACASA DE *CORIOLOPSIS GALLICA* EN NANOESTRUCTURAS MAGNÉTICAS

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
LICENCIADO EN NANOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
ENRIQUE ARGENIS LÓPEZ OLVERA

DIRECTOR DE TESIS
DR. SERGIO ANDRÉS ÁGUILA PUENTES

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, DICIEMBRE 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hago constar que el trabajo que presento es de mi autoría y que todas las ideas, citas textuales, datos, ilustraciones, gráficas, etc., sacados de cualquier obra o debidas al trabajo de terceros, han sido debidamente identificados y citados en el cuerpo del texto y en la bibliografía y acepto que en caso de no respetar lo anterior puedo ser sujeto a sanciones universitarias.

Afirmo que el material presentado no se encuentra protegido por derechos de autor y me hago responsable de cualquier reclamo relacionado con la violación de derechos de autor.

Enrique Argenis López Olvera

Agradecimientos

Este trabajo no es un reflejo de mi esfuerzo individual, sino que es el reflejo de la marca que un mar de gente ha dejado en mí. A toda esta gente debo de agradecerles.

Primera y principalmente, le agradezco a mis padres, siempre atentos y preocupados por mi bienestar, además de infinitamente pacientes. Gracias a ellos que me han dado tantas cosas, materiales e inmateriales.

A mi director de tesis, Dr. Sergio Águila, por sus valiosas enseñanzas, su apoyo, su atención, su amistad y su paciencia sin parangón. Todo ello me marcará por el resto de mi vida, tanto en el ámbito personal como en el profesional.

A todos mis profesores de la licenciatura, quienes ayudaron a definir el camino que quiero seguir, que sepan que sus enseñanzas no pararon en oídos sordos. A mis compañeros de la licenciatura, todos fieles camaradas, siempre dispuestos a apoyar a quien lo necesitase. A los compañeros de Chile, que me recibieron como si fuera familia.

A la UNAM, por supuesto, por haberme permitido formar parte de ella y haberme ofrecido todo lo que puede ofrecer la mejor universidad del país. A los técnicos e investigadores del CNyN que me apoyaron directa o indirectamente en mi trabajo. Al personal del CNyN, por hacer de estas instalaciones un lugar increíble.

Al proyecto Inmovilización de enzimas del tipo oxidorreductasas en nanopartículas magnéticas y su aplicación en química ambiental, Proyecto 205466 Cooperación Bilateral México-Chile, CONACYT-CONICYT, 2014-2018.

También agradezco al Dr. Francisco José Ipinza Fernández-Dávila, que en paz descanse, quien fue guía y amigo sincero y que me ofreció desde consejos y hasta simples conversaciones.

Resumen

En este trabajo se inmovilizó covalentemente la enzima lacasa del hongo *Corioloopsis gallica* en nanoestructuras magnéticas y se evaluó el efecto en su actividad y en su estabilidad. Se funcionalizó a las nanoestructuras con alcoxisilanos organofuncionales, a saber, 3-aminopropil-, 3-glicidoxipropil- y 3-cloropropiltrimetoxisilano.

Las nanoestructuras utilizadas como soporte para la inmovilización fueron nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) sintetizadas por el método de coprecipitación, y nanotubos de magnetita sintetizados por el método hidrotermal seguido de tratamiento térmico con flujo de hidrógeno. Las nanoestructuras se caracterizaron por difracción de rayos X (XRD) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las nanoestructuras funcionalizadas se caracterizaron por espectroscopía FTIR y UV-vis.

La inmovilización de la enzima se evaluó por el método de Bradford, midiendo la concentración de enzima del medio de reacción luego de haber precipitado los soportes, y sustrayendo el valor de la concentración original del medio. Se determinó que los soportes funcionalizados con el aminosilano inmovilizan mayor cantidad de enzima por miligramo.

La actividad de la enzima se evaluó por espectroscopía UV-vis, midiendo la oxidación de la siringaldazina utilizada como sustrato. Por medio de la construcción de gráficos de Lineweaver-Burk se calculó la constante catalítica de la enzima libre y de la enzima inmovilizada. Se encontró que la enzima inmovilizada en nanopartículas funcionalizadas con el clorosilano presentó la mayor actividad, a pesar de tener la menor cantidad de enzima por miligramo de soporte.

Se midió la caída en la velocidad de reacción de la enzima inmovilizada luego de múltiples usos. Se encontró que la velocidad se conserva mejor (80%) en la enzima inmovilizada en nanotubos funcionalizados con el aminosilano y que para la enzima inmovilizada en nanopartículas, la velocidad cae hasta un 40% de la velocidad original, independientemente del agente de acoplamiento utilizado.

Contenido

Capítulo 1.....	1
1.1 Introducción.....	1
1.2 Antecedentes.....	5
1.2.1 Lacasa.....	5
1.2.2 Compuestos fenólicos.....	8
1.2.3 Pesticidas.....	10
1.2.4 Técnicas de eliminación de contaminantes.....	12
1.2.4.1 Eliminación de fenoles.....	12
1.2.4.2 Eliminación de pesticidas.....	13
1.2.5 Tratamiento enzimático.....	14
1.2.6 Inmovilización enzimática.....	16
1.2.7 Soportes.....	19
1.2.8 Nanoestructuras magnéticas.....	19
1.3 Hipótesis.....	23
1.4 Objetivos.....	23
1.4.1 Objetivo general.....	23
1.4.2 Objetivos particulares.....	23
Capítulo 2.....	24
2.1 Metodología.....	24
2.1.1 Síntesis de nanopartículas magnéticas de magnetita (Fe_3O_4).....	24
2.1.2 Síntesis de nanotubos de magnetita (Fe_3O_4).....	24
2.1.3 Caracterización por difracción de rayos X (XRD).....	24
2.1.4 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	25
2.1.5 Funcionalización de nanoestructuras.....	25
2.1.6 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).....	26
2.1.7 Inmovilización de lacasa en nanoestructuras funcionalizadas.....	26
2.1.8 Cuantificación de proteína.....	27
2.1.9 Ensayo de actividad enzimática.....	28

2.1.10 Evaluación de la estabilidad.....	29
Capítulo 3.....	30
3.1 Resultados y discusión.....	30
3.1.1 Síntesis de nanoestructuras.....	30
3.1.2 Funcionalización de nanoestructuras.....	34
3.1.3 Inmovilización de lacasa.....	39
3.1.4 Ensayos de actividad enzimática.....	42
3.1.5 Evaluación de la estabilidad.....	46
Capítulo 4.....	48
4.1 Conclusiones.....	48
Referencias.....	49
Anexo I.....	55
Anexo II.....	57
Anexo III.....	59
Anexo IV.....	61

Índice de figuras

Figura 1. Estructura tridimensional de la lacasa de <i>Coriolopsis gallica</i>	6
Figura 2. Mecanismo de reducción de oxígeno en el sitio activo de la lacasa.....	7
Figura 3. Estructura general de los fenoles.....	8
Figura 4. Esquema del proceso de bioacumulación de contaminantes en la cadena alimenticia.....	11
Figura 5. Métodos físicos y químicos de inmovilización enzimática más comunes.....	18
Figura 6. Esquema de los tipos de materiales magnéticos de acuerdo a su respuesta antes campos externos.....	20
Figura 7. Comportamiento de los materiales magnéticos y sus respuestas a los campos magnéticos externos.....	22
Figura 8. Mecanismo de funcionalización de las nanopartículas y nanotubos de magnetita con alcoxisilanos.....	26
Figura 9. Mecanismo de inmovilización de lacasa con el uso de alcoxisilanos como agentes de acoplamiento.....	27
Figura 10. Mecanismo de oxidación de la siringaldazina catalizado por la lacasa.....	28
Figura 11. Mecanismo de formación de nanotubos de hematita por el método hidrotermal	31
Figura 12. Difractogramas de las nanopartículas (arriba) y de los nanotubos (abajo).....	32
Figura 13. Diagrama de la estructura cristalina tipo espinela de la magnetita.....	33
Figura 14. Micrografías de las nanopartículas de magnetita sintetizadas por el método de coprecipitación.....	34
Figura 15. Micrografías de los nanotubos de magnetita sintetizados por el método hidrotermal.....	35
Figura 16. Histograma de la distribución de tamaños de los nanotubos de magnetita.....	35
Figura 17. Espectro infrarrojo por transmitancia de las nanopartículas de magnetita sin funcionalizar y funcionalizadas con alcoxisilanos.....	37
Figura 18. Espectro infrarrojo por reflectancia difusa de los nanotubos de magnetita sin funcionalizar y funcionalizados con el 3-APTMS.....	38
Figura 19. Curva de inmovilización de lacasa en nanopartículas de magnetita	

funcionalizadas con alcoxisilanos.....	40
Figura 20. Curva de inmovilización de lacasa en soportes magnéticos funcionalizados con alcoxisilanos.....	42
Figura 21. Curvas de velocidad específica de la oxidación de siringaldazina por lacasa de C.G. libre e inmovilizada.....	43
Figura 22. Diagramas de Lineweaver-Burk de la oxidación de siringaldazina por lacasa de C.G. libre e inmovilizada.....	44
Figura 23. Estabilidad operacional de la enzima inmovilizada en diferentes soportes.....	47

Índice de tablas

Tabla 1. Valores determinados de la constante catalítica para la enzima libre y la enzima inmovilizada.....	46
---	----

Capítulo 1

1.1 Introducción

En el mundo contemporáneo existe una amplia variedad de industrias, de las cuales, la mayoría dependen de la industria química. Esta industria se consolidó como tal a mediados del siglo XVIII, a la par de la revolución industrial y, desde entonces, se ha adaptado, especializado y ampliado continuamente en diversos campos hasta volverse indispensable para la sociedad¹. Uno de estos campos es el de los compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos, también llamados fenoles, son una familia de compuestos orgánicos cuya estructura contiene un grupo hidroxilo unido a un anillo aromático. El fenol es la molécula más simple de esta familia y fue identificado en 1834 por Friedlieb Ferdinand Runde (1795-1896). Los fenoles son compuestos bien estudiados y son utilizados en la fabricación de productos variados, desde plásticos, colorantes y detergentes, hasta insecticidas y medicamentos².

Debido al extenso uso de los fenoles en la industria, inevitablemente se generan enormes cantidades de residuos y derivados. De acuerdo a la *Comisión para la cooperación ambiental* (CEC, por sus siglas en inglés), los fenoles figuran entre los compuestos químicos que generan más desechos en Norteamérica³. Estos residuos son generados principalmente por la industria petroquímica. Otras industrias contribuyentes son la metalúrgica, la del plástico, la farmacéutica y la textil⁴. La mayoría de los fenoles son altamente solubles, por lo que migran a otros ambientes fácilmente. Por esta razón, se pueden encontrar fenoles y sus derivados en distintos cuerpos de agua, incluyendo cuerpos de consumo humano⁵.

El efecto de los fenoles en la salud es diverso debido a que es un grupo muy extenso. En él existen compuestos que actúan como antioxidantes y como anticancerígenos⁵. En cambio, también existen compuestos de toxicidad conocida. Los fenoles simples, por ejemplo, no son bioacumulables y suelen ser biodegradados en cuestión de días. En cambio, los fenoles halogenados son tóxicos y resistentes a la biodegradación⁶. Se sabe que algunos fenoles pueden provocar daños al ADN, mutaciones y otros efectos genotóxicos, motivo por el cual

la contención y eliminación de dichos compuestos es un tema de interés para la sociedad.

Algunas organizaciones se han encargado de identificar y regular diferentes tipos de residuos que puedan poner en riesgo la salud humana, incluidos los fenoles. Una de estas organizaciones es la *Agencia de protección ambiental de Estados Unidos* (US EPA, por sus siglas en inglés). Esta y otras organizaciones han decretado límites para las concentraciones de sustancias y residuos químicos en el ambiente y en medios a los que estén expuestos los humanos. La eliminación de sustancias y residuos es una de las estrategias utilizadas para permanecer debajo de los límites establecidos.

Existen varios métodos para eliminar compuestos fenólicos en agua. En general, se pueden dividir en dos grupos: métodos de recuperación y métodos de inertización, aunque comúnmente se usan en conjunto. Desafortunadamente, los primeros resultan muy costosos o implican procedimientos adicionales. Por su parte, los segundos se vuelven complejos cuando se quiere conseguir cierto grado de pureza en grandes volúmenes⁴.

En 1976 se propuso el tratamiento enzimático como alternativa para la eliminación de compuestos fenólicos. Con esta idea se pretendía tener las ventajas de los tratamientos biológicos, evitando sus dificultades. Adicionalmente, se mostró que los métodos enzimáticos son más rápidos que los métodos químicos convencionales, además de funcionar en condiciones ambientales⁷.

Las enzimas ofrecen otra importante ventaja, su selectividad, por lo que con el tratamiento enzimático no se generan productos secundarios. Por desgracia, el uso de enzimas para eliminación de residuos también tiene sus complicaciones. Debido a su origen, es complicado usarlas en actividades de escala industrial. Asimismo, las enzimas no suelen soportar temperaturas o presiones relativamente altas. Finalmente, las enzimas pueden ser inactivadas por una variedad de sustratos y productos, disminuyendo así su eficiencia⁸.

La inmovilización enzimática surgió como una propuesta para compensar las vulnerabilidades de las enzimas sin perder sus cualidades. La inmovilización enzimática transforma al catalizador soluble en uno insoluble. De esta forma se simplifica su

recuperación y permite que puedan ser utilizadas repetidamente. También se aumenta la estabilidad de la enzima, prolongando su vida media⁹.

Existen grupos de enzimas capaces de oxidar compuestos fenólicos haciendo uso de peróxido de hidrógeno o de oxígeno molecular. Las lacasas son uno de estos grupos. Son enzimas de la familia de las oxidasas multicobre y se identificaron por primera vez en la savia del árbol de la laca japonés *Rhus vernicifera*, en 1883 por el científico japonés H. Yoshida¹⁰.

La mayoría de las lacasas estudiadas y reportadas se han aislado de *hongos superiores*. A este grupo pertenecen los hongos de la podredumbre blanca, los cuales son los productores de lacasa más comúnmente estudiados¹¹. Estas enzimas se caracterizan por su sitio activo, el cual está constituido por cuatro átomos de cobre y no por alguna secuencia de aminoácidos.

Otra característica de estas enzimas es su amplio repertorio de sustratos posibles, el cual incluye polifenoles, fenoles sustituidos, diaminas aromáticas y más¹². Por esta razón, se ha propuesto el uso de lacasas para el diseño de biosensores y eliminación de sustancias y residuos químicos¹¹. Debido a la naturaleza de dichas aplicaciones, su inmovilización suele ser tratada como algo esencial para asegurar su estabilidad operacional y facilitar su uso masivo y repetitivo.

Actualmente se cuentan con varios métodos de inmovilización, que se pueden englobar en dos tipos: físicos y químicos. Cada método tiene ventajas y desventajas respecto a los otros, por lo que es necesario tomar en consideración la aplicación que se desea para la enzima, antes de seleccionar el método adecuado.

El uso de nanomateriales magnéticos para inmovilización de enzimas resulta particularmente atractivo. Estos nanomateriales se alinean a campos magnéticos externos de la misma forma que lo hace un imán convencional, por lo que es sencillo separarlos de un medio de reacción. Además, se dispersan muy bien en varios solventes debido a su tamaño y son muy estables en suspensión, ya que no tienden a alinearse entre sí, a

diferencia de los imanes de mayor tamaño, por lo que no se forman aglomerados¹³. Por estas cualidades, se piensa que su uso como soporte en inmovilización enzimática podría permitir el desarrollo de un tratamiento enzimático de aguas residuales a nivel industrial y con costos reducidos.

1.2 Antecedentes

1.2.1 Lacasa

Las lacasas (bencenodiol oxígeno oxidoreductasa, EC 1.10.3.2) constituyen el mayor subgrupo de las enzimas oxidasas multicobre. Este grupo de enzimas ha sido ampliamente estudiado desde su descubrimiento, mientras se estudiaba la savia del árbol *Rhus vernicífera*¹⁰. A grandes rasgos, las lacasas pueden dividirse en dos grandes grupos: lacasas fúngicas y vegetales, aunque también se han identificado variedades de lacasa en insectos y bacterias¹⁴. De estos grupos, las lacasas fúngicas son el grupo más estudiado.

Estas enzimas cumplen diferentes funciones, dependiendo del organismo del que se originaron. Las lacasas fúngicas, por ejemplo, están involucradas en el entrecruzamiento de las paredes hifales (morfogénesis), en la polimerización de fenoles para el fortalecimiento de las paredes celulares (protección contra el estrés), en la degradación de la lignina y en la biosíntesis de pigmentos¹⁵. Por su parte, las lacasas vegetales participan en la biosíntesis de lignina.

Aunque se conocen varias lacasas producidas por plantas y bacterias, las lacasas fúngicas son las que reciben mayor atención. Una de las razones es porque la mayoría de las lacasas fúngicas suelen ser proteínas extracelulares, por lo que su proceso de purificación es relativamente sencillo, además de ser proteínas naturalmente estables en ambiente extracelular^{12,16}.

La mayoría de lacasas fúngicas son proteínas globulares monoméricas, con una masa molecular de entre 60 y 70kDa. Por lo general son proteínas glicosiladas entre un 10 y 25%, aunque en algunos casos el grado de glicosilación llega a más de 30%¹². Las lacasas provenientes de plantas tienen mayor porcentaje de glicosilación, por lo que su masa molecular es mayor. Las lacasas fúngicas suelen tener un punto isoeléctrico de 4 y pH óptimo ácido, de entre 3 y 5. En cambio, el punto isoeléctrico de las lacasas vegetales es de alrededor de 9, y su pH óptimo es neutro (7). Respecto a la temperatura óptima de trabajo, para la mayoría de las lacasas es de entre 20 y 80°C, aunque las de origen bacteriano son

las más estables^{16,17}.

Estas enzimas se distinguen por la conformación de su sitio activo, el cual está constituido por cuatro átomos de cobre. Estos átomos se clasifican en tres tipos, según sus propiedades espectroscópicas. El cobre tipo 1 (T1) se caracteriza por un fuerte pico de absorción en los 600nm, aproximadamente. El cobre tipo 2 (T2) no muestra picos de absorbancia. Finalmente, el cobre tipo 3 (T3), es un tipo de cobre binuclear con un pico de absorbancia en los 330nm; además, sus átomos están ligados antiferromagnéticamente¹⁸. En la Figura 1 se muestra la estructura de la lacasa del hongo *Coriolopsis gallica*, con los átomos de cobre resaltados.

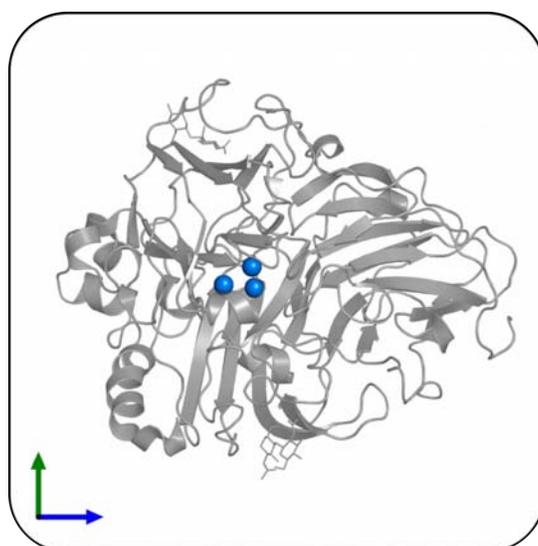


Figura 1. Estructura tridimensional de la lacasa de *Coriolopsis gallica*(Imagen tomada de de la Mora et al¹⁹.)

Es por medio de los átomos de cobre en su estructura que la enzima cataliza la oxidación de una variedad de sustratos junto con la reducción de oxígeno molecular a agua. De acuerdo a los modelos propuestos, los grupos funcionales del sustrato, grupos hidroxilo o amino, son dirigidos por fuerzas electrostáticas hacia el cobre T1, en donde el sustrato es oxidado y desprotonado. Este es el paso limitante de la velocidad de reacción, pues un ciclo catalítico requiere la sustracción de cuatro electrones, que es lo mismo que la oxidación de cuatro sustratos. Los electrones sustraídos son transferidos al grupo trinuclear de átomos de cobre T2/T3, por el tripéptido His-Cys-His, facilitando la reducción de los cuatro átomos y

haciendo posible la reducción del oxígeno^{17,18,20}.

La estructura de la enzima tiene dos canales que conducen al grupo trinuclear T2/T3. Uno de ellos se dirige a los cobres T3 y se piensa que permite el acceso del oxígeno a la enzima. Por su parte, se cree que el segundo canal permite la salida de las moléculas de agua¹⁷. Se piensa que el oxígeno se reduce en dos pasos: primero con la formación de peróxido como intermedio y luego su reducción final a agua. Se ha sugerido que los protones necesarios para la reducción se consiguen del medio de reacción. El transporte de protones propuesto para la reducción se consiguen del medio de reacción. El transporte de protones propuesto involucra la formación de una red de enlaces de hidrógeno entre un par de aminoácidos bien conservados y moléculas de agua, la cual actúa como un distribuidor de protones^{18,20}. En la Figura 2 se muestra un esquema simplificado del mecanismo de acción de la lacasa.

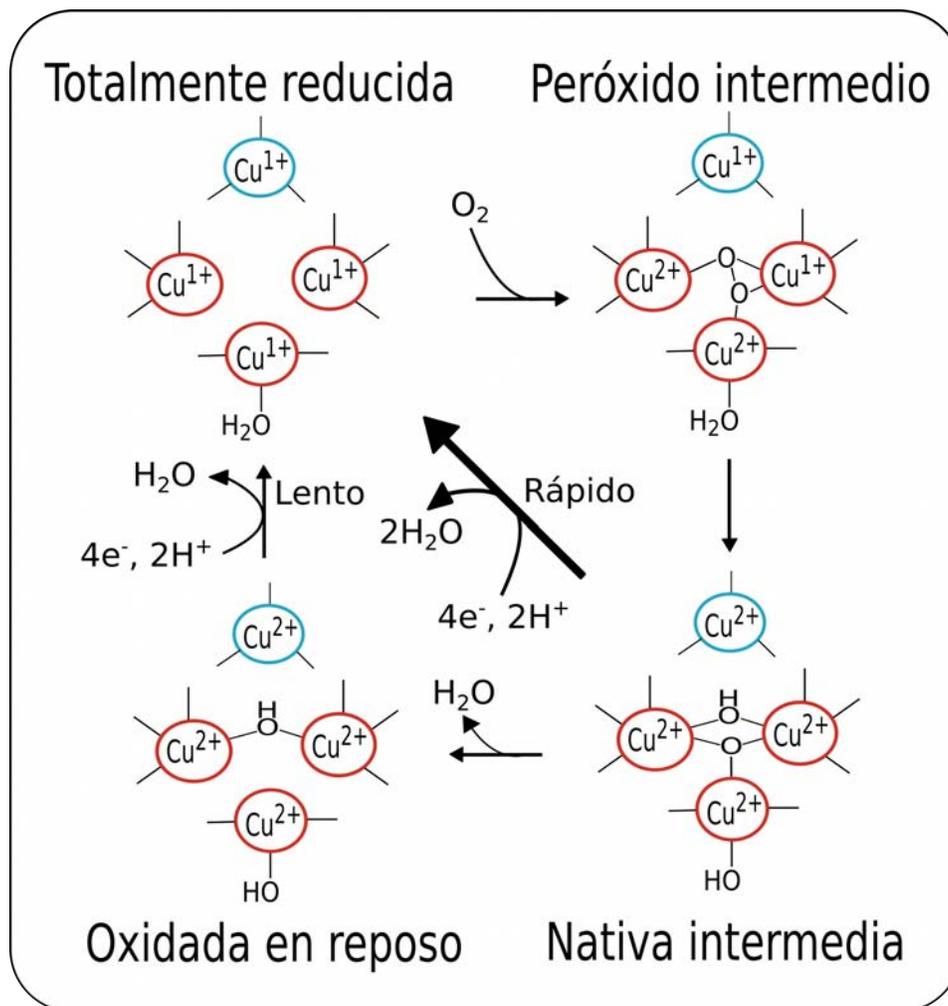


Figura 2. Mecanismo de reducción de oxígeno en el sitio activo de la lacasa¹⁸.

Las lacasas disponen de un amplio repertorio de sustratos, en el que se incluyen varios compuestos aromáticos, como fenoles sustituidos, polifenoles, aminas aromáticas y otros. Además, las lacasas tienen la capacidad de oxidar algunos compuestos inorgánicos, como yodo e iones de ferrocianuro. Esta cualidad se debe, en parte, al potencial rédox de la enzima el cual oscila entre 0.4 y 0.8V, dependiendo del organismo de procedencia. Se cree que la eficiencia catalítica de la lacasa es directamente proporcional a su potencial rédox, por lo que usualmente se prefieren las de mayor potencial. Adicionalmente, es posible expandir el repertorio de sustratos de las lacasas utilizando compuestos de baja masa molecular como mediadores de transferencia de electrones¹⁶.

1.2.2 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos (fenoles) son un grupo abundante de moléculas con una estructura general constituida por al menos un grupo hidroxilo enlazado a un anillo aromático, tal como se muestra en la Figura 3. La estructura general conforma una molécula por sí misma, el fenol, que es el más simple de los fenoles²¹. Pese a que existen diferentes clasificaciones para los fenoles, la más extendida es la propuesta por Harborne y Simmonds, en 1964, que divide a los fenoles de acuerdo al número de carbonos con los que cuenta la molécula²².

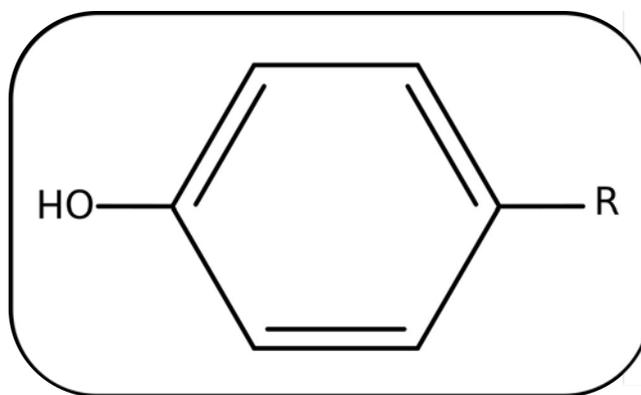


Figura 3. Estructura general de los fenoles.

Los fenoles tienen origen natural y antropogénico. En plantas, por ejemplo, los fenoles están considerados como uno de los metabolitos secundarios más comunes, con funciones variadas que abarcan desde las propiedades sensoriales y estructurales de las plantas, hasta

procesos de polinización, defensa contra depredadores, desarrollo y reproducción, entre otros²³. Los fenoles encontrados en la naturaleza pueden clasificarse de forma alternativa en tres grupos. Fenoles poco distribuidos, como fenoles simples, hidroquinona y resorcinol. Fenoles ampliamente distribuidos, como flavonoides, cumarina y ácidos fenólicos. Y fenoles poliméricos, como taninos y lignina^{22,23}.

En cuanto a los fenoles de origen antropogénico, la lista incluye varias industrias. Son utilizados para la síntesis de plásticos, explosivos, detergentes, colorantes, pesticidas e incluso medicamentos. Asimismo, tienen fuerte presencia en la industria petroquímica y son un producto de la combustión de materia orgánica y combustibles^{24,25}. Es debido al extenso uso de los fenoles que su presencia en el medio ambiente es de preocupación para la sociedad. Además, se sabe que algunos grupos de fenoles son tóxicos, lo que aumenta el interés sobre ellos.

El efecto de los fenoles sobre el agua de consumo humano abarca desde afectar su sabor u olor, hasta volver su consumo riesgoso. La toxicidad de los fenoles es un tema complicado de estudiar debido a que sus efectos sobre los organismos son tan variados como el grupo mismo. Sin embargo, si se centra la atención sobre el fenol y sus derivados, que además son los fenoles más utilizados, es más sencillo hablar de su toxicidad^{23,24}.

En el caso del fenol, su toxicidad está relacionada a su solubilidad y a la formación de radicales libres. En cuanto a los fenoles sustituidos, su efectos son diversos y de severidad variable. Su grado de toxicidad es dependiente de la posición en la que se encuentran los sustituyentes (orto, meta o para)²⁶. Los efectos relacionados a su consumo van desde fatigas, dolor de cabeza e irritación, hasta alteraciones endócrinas y cáncer²⁴.

La concentración y el tiempo al que se está expuesto también son un factor importante para determinar el impacto que tienen en la salud. El fenol, por ejemplo, se ha encontrado en el agua para consumo y en alimentos, como carne de cerdo, en concentraciones de 1µg/L y de hasta 28.6µg/kg, respectivamente²⁶.

Los clorofenoles son los fenoles sustituidos con mayor presencia en cuerpos de agua. Se ha

identificado policlorofenoles en agua para consumo y otros cuerpos de agua, en concentraciones de hasta $0.3\mu\text{g/L}$, incluso después de haberse sometido a procesos de purificación. También se han detectado rastros de clorofenoles en algunos vegetales y en carne de pollo. Se asume que estos rastros son consecuencia del uso y degradación de reguladores de crecimiento y pesticidas. Todos estos factores resultan en una exposición a clorofenoles hasta cuatro veces mayor en zonas con mayor urbanización respecto a las zonas rurales²⁶.

Casos semejantes existen para otros fenoles sustituidos, incluyendo catecoles, nitrofenoles, metilfenoles, alquilfenoles, bisfenoles y aminofenoles. Naturalmente, las concentraciones de los diferentes fenoles son mayores en zonas cercanas a instalaciones industriales o expuestas a sistemas de drenaje. Igualmente, las concentraciones suelen ser mayores cerca de terrenos dedicados a la agricultura²⁶.

1.2.3 Pesticidas

Un pesticida, por definición, es una sustancia química que resulta muy tóxica para algunas formas de vida, mientras que es poco tóxica o no tóxica para el resto. Los pesticidas son introducidos al ambiente por varias vías, por ejemplo, durante su producción, como desecho luego de su uso, en derrames accidentales o negligentes e, incluso, introducidos en cuerpos de agua intencionalmente para eliminar organismos acuáticos no deseados²⁷.

Parte importante de los pesticidas utilizados están constituidos por compuestos aromáticos halogenados, principalmente compuestos clorados. Los compuestos utilizados incluyen a los fenoles, los ácidos fenoxi alcanóicos, derivados de ácidos benzoicos, entre otros²⁸.

El fenol por sí mismo puede funcionar como insecticida, fungicida, bactericida o herbicida; sin embargo, su potencial como pesticida se incrementa cuando tiene sustituyentes, típicamente halógenos. Como caso general, su actividad alcanza su máximo con la adición de un segundo sustituyente. La alquilación de los fenoles también contribuye al aumento de

sus actividad, tanto insecticida como herbicida²⁹.

Los pesticidas en general constituyen un problema ecológico, no solo los pesticidas fenólicos. Los pesticidas suelen estar compuestos por moléculas recalcitrantes a la biodegradación. Además, en determinados casos, la degradación natural de pesticidas da como resultado compuestos tóxicos para los organismos responsables de su degradación³⁰.

Características como la volatilidad o la solubilidad de los pesticidas son factores que determinan la facilidad con la que se pueden mover por el ecosistema, así como la exposición a la que están sujetos diferentes organismos, entre ellos los humanos. La persistencia es otra de las características cruciales de los pesticidas para entender su destino en el medio ambiente. Esta característica se refiere a la duración que pueden tener en el medio ambiente sin ser degradados. Por lo tanto, un organismo tendrá más oportunidad de interactuar con un pesticida con alta persistencia³¹.

Una característica más, igualmente relevante y relacionada a las mencionadas anteriormente es la bioacumulación. Esta característica se refiere a la cantidad de material, en este caso de pesticidas, que se acumula en los organismos expuestos y a la tendencia de sumarse esa cantidad conforme progresa la cadena alimenticia, como se esquematiza en la Figura 4. Esto es de particular interés para la sociedad debido a la posición de los humanos en la cadena alimenticia³¹.

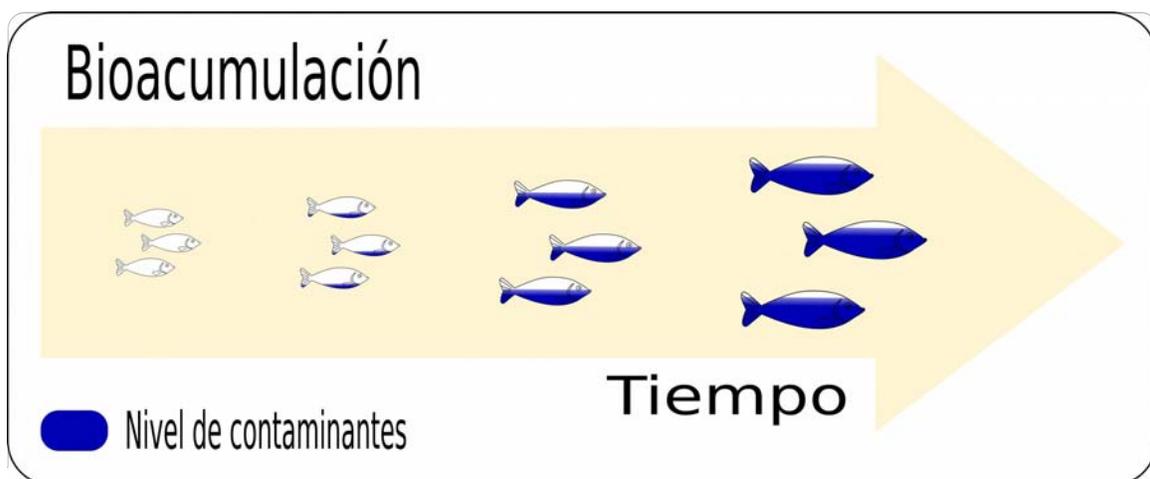


Figura 4. Esquema del proceso de bioacumulación de contaminantes en la cadena alimenticia³².

Por estas razones, es de interés general la comprensión e innovación de técnicas y estrategias para la eliminación de esta clase de contaminantes.

1.2.4 Técnicas de eliminación de contaminantes

1.2.4.1 Eliminación de fenoles

Debido a que se posee un profundo conocimiento sobre las propiedades del fenol y de sus derivados, es natural que exista una amplia cantidad de información respecto a su eliminación. Sin embargo, aún resulta complicado lidiar con los fenoles residuales en las industrias con los métodos convencionales³³.

En términos generales, los métodos de eliminación de fenoles en líquidos se pueden separar en dos clases: métodos de separación y métodos de destrucción.

Los métodos de separación son todos métodos físicos. Algunos de los métodos aprovechan las propiedades físicas del fenol y sus derivados. Otros métodos aprovechan fenómenos físicos, particularmente la adsorción y la permeabilidad³⁴.

Casi todos los métodos de destrucción de fenoles implican su oxidación. Algunos de los métodos utilizan al oxígeno en el aire para realizar la oxidación de los fenoles. Otros métodos utilizan peróxido de hidrógeno como agente oxidante. En ambos casos, se ha integrado el uso de catalizadores³⁴. Otros métodos de eliminación, son la oxidación electroquímica, electrocoagulación, oxidación fotocatalítica, oxidación con ozono, etc³⁴⁻³⁶.

Además de los métodos físicos y químicos ya mencionados, también se han desarrollado procesos bioquímicos para eliminación de fenoles. Estos procesos se involucran el uso de microorganismo, hongos o enzimas.

La biodegradación de los fenoles no es trivial debido a que su toxicidad inhibe el crecimiento de la mayoría de microorganismos. Sin embargo, se conoce un conjunto de

organismos, bacterias y hongos filamentosos, capaces de asimilar fenoles como fuente de carbono. Estos organismos mantienen su actividad en concentraciones de fenol de hasta 3 o 4 g/l³⁷.

La degradación de los fenoles se puede realizar por las vías aeróbica y anaeróbica. La ruta aeróbica es bien conocida, y sus primeros reportes datan desde los 1900s. Los organismos emplean un conjunto de enzimas para metabolizar a los fenoles³⁷. El mecanismo para la degradación del fenol y de los fenoles sustituidos puede estudiarse en la literatura³⁸.

La ruta anaeróbica fue dilucidada más recientemente. El modelo propuesto para este mecanismo está basado en la ruta de degradación anaeróbica del benzoato propuesta para la bacteria *Paracoccus denitrificans*. El mecanismo detallado puede consultarse en la literatura^{38,39}.

Otro de los métodos bioquímicos de eliminación estudiados es la polimerización. Este método implica el uso de enzimas oxidoreductasas, entre ellas las peroxidasas y lacasas. Estas enzimas catalizan la síntesis de polifenoles por medio de reacciones de acoplamiento oxidativo. Los detalles del mecanismo de la reacción pueden estudiarse en la literatura^{40,41}.

1.2.4.2 Eliminación de pesticidas

Al igual que para la eliminación de fenoles, existen métodos físicos, químicos y biológicos de eliminación de pesticidas. Sin embargo, debido a que idealmente los métodos de eliminación de pesticidas deben de ser accesibles para quienes los consumidores, la lista de métodos comúnmente utilizados es menor.

Los métodos físicos generalmente consisten en la adsorción de los pesticidas, ya sea utilizando adsorbentes orgánicos o inorgánicos. Aunque son métodos simples y accesibles, tienen como desventaja que los pesticidas no son eliminados, por lo que el adsorbente debe recibir un tratamiento posterior. Típicamente, estos métodos son acompañados de tratamientos biológicos para completar la degradación de los contaminantes^{42,43}.

Los métodos químicos pueden categorizarse en tres grupos, métodos de hidrólisis, de deshalogenación y de oxidación. En los métodos de hidrólisis se usan soluciones con pH elevado para hidrolizar enlaces éster, y se tiene la posibilidad de usar óxidos y iones metálicos como catalizadores⁴³. Los métodos de deshalogenación consisten en eliminar los halógenos de las moléculas. El método más popular es el tratamiento con KPEG; desgraciadamente, este es un método mejor utilizado en pequeña escala^{42,44}.

Respecto a los métodos de oxidación, los tratamientos disponibles son semejantes a los disponibles para la oxidación de fenoles. Entre estos métodos se cuentan la oxidación con peróxido de hidrógeno y con ozono, así como tratamientos híbridos con el uso de luz UV y catalizadores metálicos⁴². En algunas fuentes, la fotodegradación es una clasificación más dentro de los métodos químicos. En estos métodos se aprovecha la luz solar para degradar las moléculas de los pesticidas, generalmente por la formación de radicales⁴⁵.

Los métodos biológicos de eliminación de pesticidas han recibido mucha atención debido a su menor costo, a la facilidad del transporte, a su simpleza técnica y a su impacto social favorable. Estos métodos están ideados para ser utilizados en *in situ*. Los métodos biológicos incluyen el compostaje, bioestimulación, fitorremediación, “*landfarming*” y bioaumentación (uso de microorganismos o enzimas)^{42,43}. Los mecanismos de biodegradación dependerán de la naturaleza física, química y biológica de la tierra tratada y de las propiedades químicas del pesticida a degradar. Algunos ejemplos y detalles pueden consultarse en la literatura⁴⁶.

1.2.5 Tratamiento enzimático

Para profundizar en los detalles del tratamiento enzimático, es pertinente definir lo que es una enzima. Las enzimas son moléculas proteicas, salvo algunas excepciones, que facilitan la conversión de sustratos en productos al generar condiciones que disminuyen la energía de activación de la reacción; por lo que se consideran catalizadores biológicos⁴⁷. Actualmente sabemos que una infinidad de enzimas son las responsables de las

transformaciones bioquímicas que ocurren en la naturaleza.

El uso de enzimas para la eliminación de contaminantes es una tecnología reciente en comparación a las técnicas convencionales. Sin embargo, hay motivos para darle continuidad al desarrollo de esta tecnología. Algunos motivos están relacionados a dificultades técnicas intrínsecas al uso de microorganismos, como disponibilidad de oxígeno y otros nutrientes o vulnerabilidad ante la población nativa de organismos^{48,49}.

Por su parte, las enzimas muestran varias cualidades atractivas: poseen diferentes grados de especificidad, mantienen su actividad en presencia de inhibidores del metabolismo microbiano y de poblaciones de microorganismos, resisten una variedad de condiciones ambientales, incluso algunas que sus organismos de origen no toleran, catalizan transformaciones químicas para los cuales no existen otros procesos eficientes, etc^{48,49}. Por estas y otras características, el uso de enzimas es un campo prometedor para el desarrollo sostenible y la química verde.

La totalidad de enzimas conocidas están clasificadas en seis categorías principales, de acuerdo al tipo de reacción que catalizan. De estas categorías, son tres las más comunes para su uso en biorremediación: transferasas y, especialmente, hidrolasas y oxidorreductasas. Una subclasificación de enzimas también recibe especial atención, las deshalogenasas^{47,49}.

El papel de las oxidorreductasas en el medio ambiente, la detoxificación, las hace candidatas lógicas para su uso en biorremediación. Estas enzimas contribuyen a la humificación de compuestos fenólicos de origen natural. Más aún, su característica más llamativa es su capacidad de detoxificar xenobióticos tóxicos por medio de mecanismos de polimerización^{47,49}. Algunas enzimas incluidas en este grupo son las monooxigenasas, las peroxidasas y las lacasas.

La especificidad de este grupo de enzimas es más bien amplia, por lo que tienen la cualidad de usar diferentes moléculas como sustrato. Esta propiedad suele estar ligada, mayormente, a la magnitud del potencial redox de las enzimas. La lista de sustratos posibles incluye

fenoles, polifenoles, fenoles sustituidos, bifenilos policlorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos, colorantes y colorantes azóicos^{49,50}.

El subgrupo de las lacasas pertenece a las oxidorreductasas. Este grupo recibe mucha atención en el campo de la biorremediación por su habilidad para catalizar la oxidación de sustratos en concomitancia a la reducción de oxígeno molecular. Al día de hoy, existe una amplia lista de reportes sobre la degradación de moléculas xenobióticas, desde fenoles sustituidos y pesticidas, hasta hidrocarburos aromáticos y colorantes. Además, es posible expandir la lista de sustratos posibles mediante el uso de mediadores de radicales libres^{49,51,52}.

Los mediadores de radicales libres, o rédox, son compuestos de baja masa molecular que facilitan algunas reacciones de oxidación al conducir electrones del donador primario al aceptor de electrones. A grandes rasgos, esto se consigue con su oxidación, lo que genera especies radicales de mayor potencial rédox que el de las enzimas, y que son capaces de oxidar a los sustratos más resistentes a la vez que vuelven a su estado reducido⁵³. Existe una enorme cantidad de compuestos que pueden funcionar como mediadores rédox; entre ellos se puede enlistar: siringaldehido, acetosiringona, ácido cinámico, ABTS, entre otros⁵⁴.

1.2.6 Inmovilización enzimática

Ya se han mencionado muchas características de las enzimas que las hacen muy atractivas para su uso como biocatalizadores y otras tecnologías. Estas características vienen ligadas a su origen biológico, sin embargo, este mismo origen trae consigo una serie de dificultades para su uso en actividades industriales. Entre estas dificultades se incluyen su difícil recuperación, su baja estabilidad operacional y su tendencia a ser inhibidas por altas concentraciones de ciertos componentes de las reacciones⁵⁵.

Existen muchas propuestas y estrategias para lidiar con las dificultades inherentes al uso industrial de enzimas. Entre ellas destaca la inmovilización enzimática por ser una de las

estrategias mejor estudiadas. Básicamente, la inmovilización consiste en convertir a la enzima soluble en un biocatalizador insoluble, usualmente, al unirla a un soporte insoluble en el medio de reacción. Para profundizar en la inmovilización, se deben de considerar dos tipos de funciones. Primero, las funciones no catalíticas, específicamente la separación y reutilización del biocatalizador. Segundo, las funciones catalíticas, que involucran el impacto sobre la actividad y estabilidad enzimática⁵⁶.

Al día de hoy se han desarrollado diferentes métodos para la inmovilización de enzimas, que pueden ser clasificados en dos grupos: métodos físicos y métodos químicos. En los métodos físicos, la enzima es inmovilizada por medio de interacciones no covalentes, principalmente enlaces de hidrógeno y/o fuerzas electrostáticas; o bien, por contención mecánica dentro del soporte. En los métodos químicos se busca la formación de enlaces covalentes entre la enzima y el soporte^{55,56}.

Las cuatro técnicas de inmovilización más comunes son: adsorción física, atrapamiento, entrecruzamiento e inmovilización covalente, ilustradas en la Figura 5. Los métodos de adsorción y atrapamiento son físicos. El primero tiene como ventaja su simplicidad y bajo costo, y como desventaja tiene la pérdida de enzima por diferentes cambios en las condiciones del medio. El segundo soluciona parcialmente el problema de la pérdida de enzima, sin embargo se presenta transferencias de masa limitadas del sustrato^{55,56}.

Los métodos de entrecruzamiento e inmovilización covalente son métodos químicos. En el método de entrecruzamiento no se utilizan soportes para la inmovilización, sino que se forman enlaces covalentes entre las enzimas por medio de reactivos bi o multifuncionales, lo que aumenta la masa molecular del conjunto y lo vuelve insoluble. Por su parte, en el método de inmovilización covalente, se forman enlaces entre los grupos funcionales en la superficie de un soporte y los de los aminoácidos de la enzima. Este método mejora significativamente la estabilidad de las enzimas, sin embargo, hay muchos factores durante la formación de enlaces que pueden llegar a volver al método contraproducente⁵⁵.

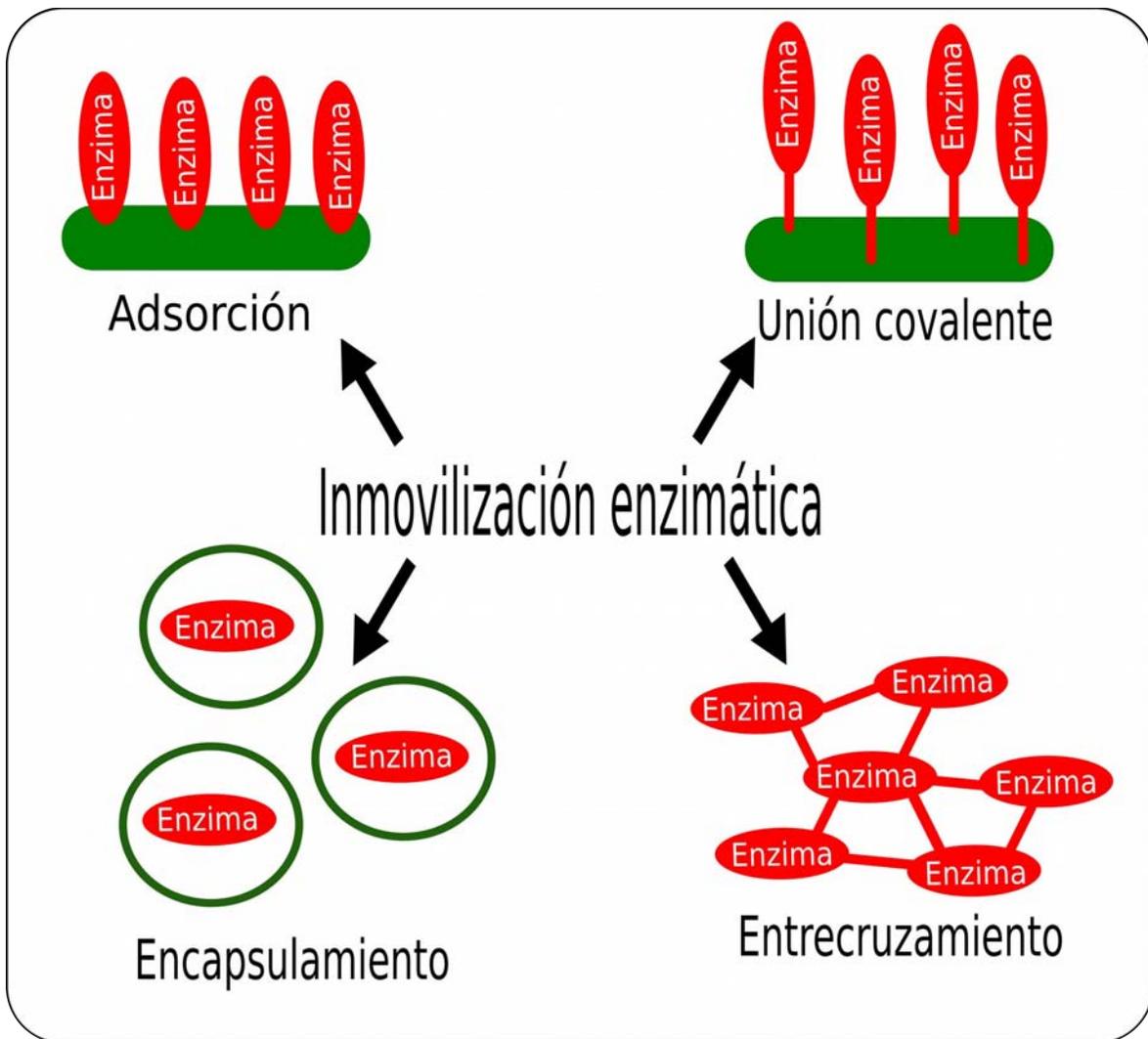


Figura 5. Métodos físicos y químicos de inmovilización enzimática más comunes.

La naturaleza del efecto que tienen los soportes sobre la estabilidad de la enzima varía de acuerdo al método utilizado. Los métodos físicos de atrapamiento o encapsulamiento aumentan la estabilidad de la enzima al confinarla en un microambiente que la protege de interacciones no deseadas con otras moléculas. En algunos casos, incluso es posible mejorar la actividad de la enzima, al proveerla de un microambiente con condiciones óptimas de reacción⁵⁷.

El efecto de los métodos químicos sobre la estabilidad es muy diferente. Con estos métodos lo que se consigue es darle rigidez a la enzima por medio de la formación de varios enlaces covalente en distintos puntos de su superficie. Este aumento en su rigidez evita que la

enzima experimente cambios conformacionales ante cambios físicos o químicos en el medio de suspensión⁵⁷.

1.2.7 Soportes

La elección de un soporte adecuado para la inmovilización de una enzima no es un proceso trivial, particularmente cuando se pretende inmovilizar covalentemente a la enzima. Un buen soporte debe tener algunas cualidades útiles, entre ellas, tener una alta densidad de grupos reactivos y que sean suficientemente estables en el tiempo y en el medio de reacción. Así mismo, es preferible que un soporte cuente con grupos funcionales que reaccionen fácilmente con los grupos presentes en la superficie de la enzima⁵⁷.

Por otra parte, al considerar la posible aplicación tecnológica de las enzimas inmovilizadas, la lista de requerimientos del soporte se expande. Como regla general, un soporte debe ser hidrofílico, inerte para las enzimas, biocompatible, resistente al ataque microbiano, resistente a la compresión mecánica y, además, de bajo costo⁵⁵.

Recientemente, se ha explorado el uso de diversas nanoestructuras como soporte para la inmovilización de enzimas. Debido a las cualidades de las nanoestructuras, como elevada área superficial y propiedades mecánicas sobresalientes, se consideran soportes atractivos y se cree que podrían mejorar la eficiencia de los biocatalizadores. Además, con el uso de nanoestructuras se simplifica la separación y reutilización de los biocatalizadores, ya sea por simple filtración o, por precipitación con campo magnético, en el caso de nanopartículas magnéticas⁵⁵.

1.2.8 Nanoestructuras magnéticas.

El magnetismo es un fenómeno físico generalmente interpretado como la interacción entre polos magnéticos separados cierta distancia y que guarda un alto parecido con la

electroestática. La respuesta de la materia a los campos magnéticos varía de acuerdo a sus propiedades magnéticas, las cuales tienen orígenes atómicos⁵⁸. Esto ha permitido su distinción en varios grupos.

Existen cinco clases principales de materiales de acuerdo a su interacción con los campos magnéticos, representados en la Figura 6. Los materiales diamagnéticos y paramagnéticos se caracterizan porque al aplicárseles un campo magnético, se les induce un momento magnético. La dirección del momento es opuesta en diamagnéticos y paralela en paramagnéticos. El resto de las clases están determinadas de acuerdo a la alineación de los iones del material o, más precisamente, de los momentos magnéticos de espín^{58,59}.

En los materiales antiferromagnéticos, la alineación de los momentos es tal que los se anulan entre sí, generando un momento magnético neto de cero. En los ferrimagnéticos, los momentos se anulan parcialmente, de modo que los momentos no anulados contribuyen al momento magnético neto diferente de cero. Finalmente, en los ferromagnéticos, los momentos se alinean paralelamente entre sí, contribuyendo a momentos magnéticos netos mayores que en los otros tipos de materiales. Cabe destacar que este comportamiento es dependiente de la temperatura^{58,59}.

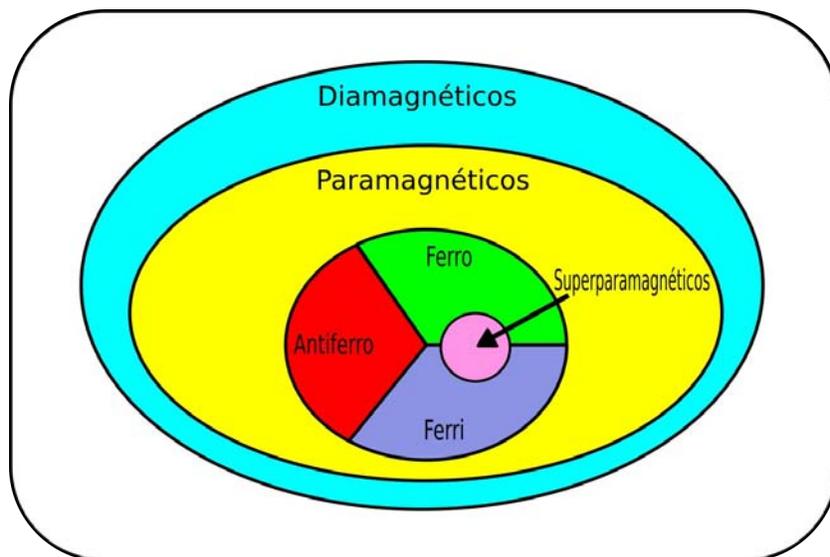


Figura 6. Esquema de los tipos de materiales magnéticos de acuerdo a su respuesta antes campos externos.

Tanto los materiales ferromagnéticos como los ferrimagnéticos pueden ser desmagnetizados, o bien, presentar momento magnético neto de magnitud cero. Esto se debe a la existencia de dominios magnéticos, que son regiones espaciales con magnetización total (momento magnético diferente de cero). Se originan como consecuencia de fenómenos de anisotropía, cristalinidad y minimización de la energía del material^{58,60}. Una de las consecuencias más representativas de su existencia son las curvas de histéresis que describen la magnetización de los materiales ferro- y ferrimagnéticos⁶¹.

Al cambiar el tamaño del material, cambian también las contribuciones energéticas que influyen en la formación de dominios. Si las partículas de un material magnético son suficientemente pequeñas, presentan un dominio magnético único debido a la proporción entre la energía magnetoestática (E_{MS}) y la energía de pared de dominio (E_w). El tamaño para que esto suceda depende tanto del material como de la forma de las partículas. Para partículas esféricas de magnetita (Fe_3O_4), el diámetro debe ser menor de 120nm, aproximadamente¹³.

El superparamagnetismo es un fenómeno observado únicamente en nanopartículas magnéticas de un solo dominio y que se observa en la forma en la que se comportan antes campos magnéticos externos. En ellas, su magnetización se alinea a lo largo de un “*eje de fácil magnetización*”, energéticamente favorable, fenómeno denominado anisotropía magnética uniaxial. Ambas direcciones del eje son direcciones de alineación favorables, y están separadas por una barrera energética dependiente del volumen de las partículas. Para nanopartículas, la energía térmica suele ser suficiente para superar la barrera e inducir cambios aleatorios en su dirección de magnetización en un tiempo determinado (tiempo de relajación)^{13,62}. En la Figura 7 se representa la respuesta de los materiales magnéticos ante campos magnéticos.

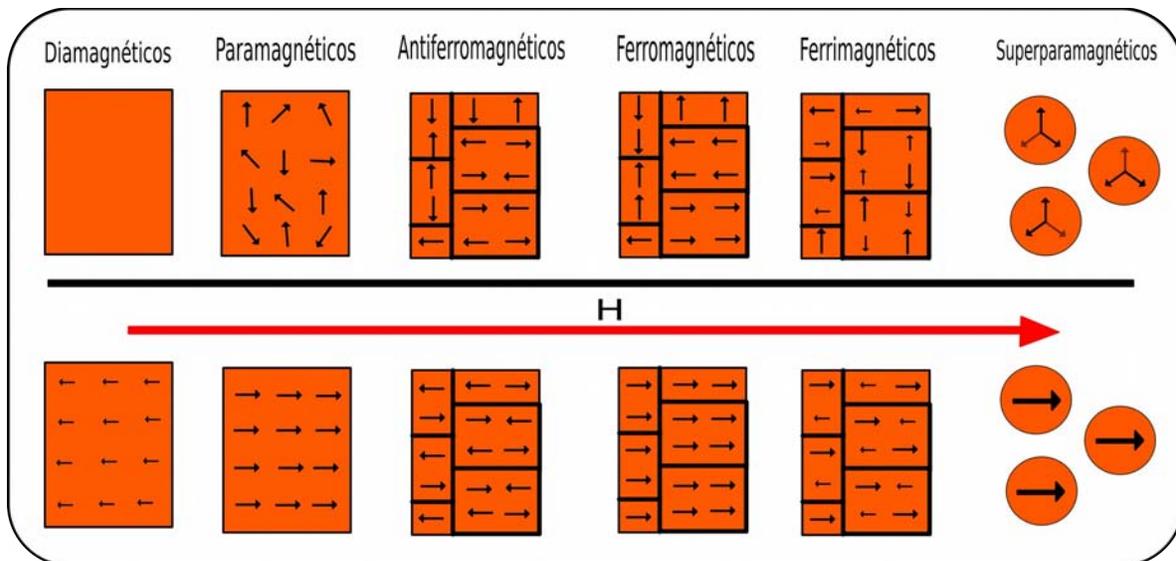


Figura 7. Comportamiento de los materiales magnéticos y sus respuestas a los campos magnéticos externos.

El tiempo de medición de la magnetización determina si un material se percibirá como superparamagnético o no. Si el tiempo de medición es menor al tiempo de relajación, las partículas se perciben en un “estado bloqueado” con orientación bien definida, y su magnetización se describe con una curva de histéresis, como en un ferromagnético. En cambio, si el tiempo de medición es mayor, la magnetización se describe con una curva sigmoidea, correspondiente al estado superparamagnético. En este estado, las partículas están en equilibrio termodinámico y su momento magnético neto es cero. Al ser expuestas a un campo magnético externo, se comportan como un material paramagnético, con susceptibilidad magnética significativamente mayor^{63,64}.

Debido a este conjunto de características, las nanopartículas magnéticas son de interés para la biotecnología y las ciencias ambientales, específicamente en el campo de la biorremediación. La combinación de su reducido tamaño y su alta susceptibilidad magnética a temperatura ambiente las hacen candidatas ideales para la inmovilización de enzimas, aprovechando su alta dispersabilidad y fácil separación de medios acuosos.

1.3 Hipótesis

La inmovilización covalente de la lacasa en nanopartículas y nanotubos de magnetita aumentará su estabilidad operacional.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Inmovilizar lacasa covalentemente en nanopartículas y nanotubos de magnetita y evaluar su actividad enzimática.

1.4.2 Objetivos particulares

- Sintetizar y caracterizar nanopartículas y nanotubos de magnetita.
- Funcionalizar a las nanopartículas y a los nanotubos con amino, glicidoxi y clorosilanos.
- Inmovilizar lacasa covalentemente en las nanopartículas y los nanotubos funcionalizadas.
- Evaluar la actividad de la enzima inmovilizada en términos de su constante catalítica y compararla con la de la enzima libre.
- Evaluar la estabilidad operacional de la enzima inmovilizada en nanopartículas y nanotubos de magnetita.

Capítulo 2

2.1 Metodología

2.1.1 Síntesis de nanopartículas magnéticas de magnetita (Fe_3O_4)

Las nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) se sintetizaron por el método de coprecipitación con atmósfera inerte a 80°C . Se preparó una solución de cloruro ferroso (FeCl_2) y cloruro férrico (FeCl_3) en agua destilada con una relación molar de 1:2 y se agitó la solución. La agitación se mantuvo constante durante toda la reacción. Después de treinta minutos, se agregó solución de hidróxido de amonio al 26% como agente precipitante. Pasados treinta minutos más se dejó enfriar el sistema. Las nanopartículas se precipitaron con un campo magnético y se lavaron con agua y etanol. Se secaron las nanopartículas y se almacenaron.

2.1.2 Síntesis de nanotubos de magnetita (Fe_3O_4)

Los nanotubos de magnetita se sintetizaron por el método hidrotermal seguido de su reducción por tratamiento térmico con flujo de hidrógeno. Se preparó una solución de cloruro férrico, fosfato de amonio y sulfato de sodio en agua destilada con concentraciones de 0.02molL^{-1} , $6.0 \times 10^{-4}\text{molL}^{-1}$ y $5.5 \times 10^{-4}\text{molL}^{-1}$, respectivamente. Se vertieron 80ml de esta solución en un vaso recubierto de teflón y se agitó por 10 minutos. Se colocó el vaso dentro de un autoclave y se calentó a 220°C durante 48 horas. El sólido obtenido se recuperó y se lavó con agua destilada y etanol. Se hizo pasar un flujo de hidrógeno de 50ml/min sobre el sólido seco durante cinco horas, con un gradiente de calentamiento de $2^\circ\text{C}/\text{min}$, hasta los 360°C . Se dejó enfriar el sistema.

2.1.3 Caracterización por difracción de rayos X (XRD)

Los nanotubos y las nanopartículas se caracterizaron por difracción de rayos X (XRD), por

sus siglas en inglés) para verificar que su patrón de difracción corresponde al de la magnetita. El análisis se realizó en el equipo *Philips X'pert MPD*, dentro del rango de 2θ de 10° a 80° , en modo de adquisición continuo. Los difractogramas obtenidos con el análisis se compararon con referencias tomadas de otras fuentes.

2.1.4 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las nanoestructuras se analizaron por microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) en el equipo JEOL JEM-2010. Las muestras se prepararon en rejillas de cobre con películas de carbono lacey. Se generaron múltiples micrografías para determinar morfología y distribución de tamaño. Se compararon las imágenes obtenidas de los materiales funcionalizados, sin funcionalizar y con enzima inmovilizada.

2.1.5 Funcionalización de nanoestructuras

Se agregó 60mg del agente de acoplamiento por cada 100mg de sólido en 50mL de agua/etanol (razón de volumen 1:1). El sistema se mantuvo con calentamiento entre 80 y 90°C y a reflujo por 3 horas, con agitación constante. Durante la primera hora se ajustó el pH de la solución entre 2 y 3 agregando ácido clorhídrico (HCl) y en las dos horas restantes se llevó a entre 8 y 9 agregando hidróxido de sodio (NaOH). Al terminar las 3 horas se detuvo la reacción y se dejó enfriar la mezcla. Se separó el sólido con un campo magnético y se lavó con agua destilada y etanol varias veces. Finalmente el material se secó en horno a 60°C por una noche. En la Figura 8 se muestra el mecanismo de funcionalización de las nanoestructuras.

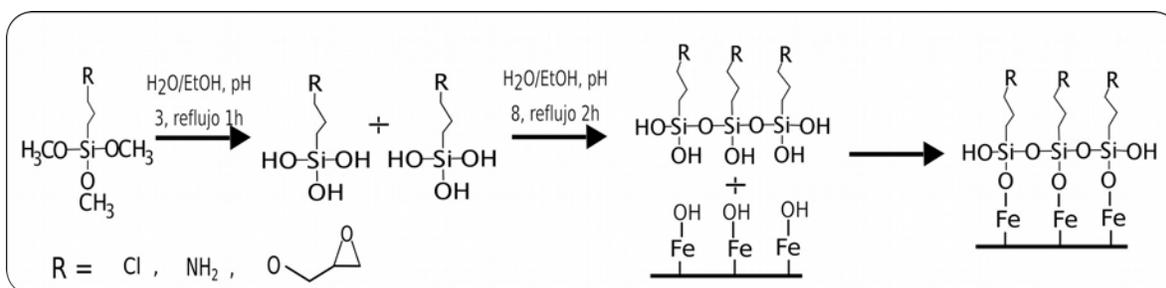


Figura 8. Mecanismo de funcionalización de las nanopartículas y nanotubos de magnetita con alcoxisilanos.

2.1.6 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

Se analizaron las nanoestructuras por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés) en la modalidad de transmisión para verificar su correcta funcionalización. El análisis se realizó en el equipo Bruker Tensor 27, en el rango de 400 a 4000 cm^{-1} . Las muestras se prepararon por el método de la pastilla de KBr. Los espectrogramas generados en cada caso se analizaron y compararon.

Alternativamente, se realizó el análisis en la modalidad de reflectancia difusa. Para el análisis solo se instaló el accesorio correspondiente en el equipo. Las muestras no necesitaron de ningún método de preparación.

2.1.7 Inmovilización de lacasa en nanoestructuras funcionalizadas

Se colocó una masa determinada de nanopartículas o nanotubos funcionalizados en un vial de 4mL y se suspendieron en buffer fosfato (PBS) 60mM, de pH6.0 y se resuspendieron con baño de ultrasonido por 15 minutos. Se agregó un volumen de solución de enzima al vial y se homogeneizó la mezcla. El vial se mantuvo en agitación durante 4 horas a temperatura ambiente. Para detener la reacción, se separó el sólido y se lavó repetidas veces. Finalmente, se resuspendió el sólido en el buffer para almacenaje. En la Figura 9 se esquematiza las reacciones de inmovilización para los alcoxisilanos utilizados.

Alternativamente, se realizó la reacción de inmovilización enzimática asistida por carbodiimida. En este método se añadió a la mezcla una masa de 1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) y de N-Hidroxisuccinimida (NHS) equivalente a la de las nanoestructuras. Este método está limitado para las nanoestructuras funcionalizadas con 3-APTMS. El mecanismo detallado de este método puede consultarse en la literatura⁶⁵.

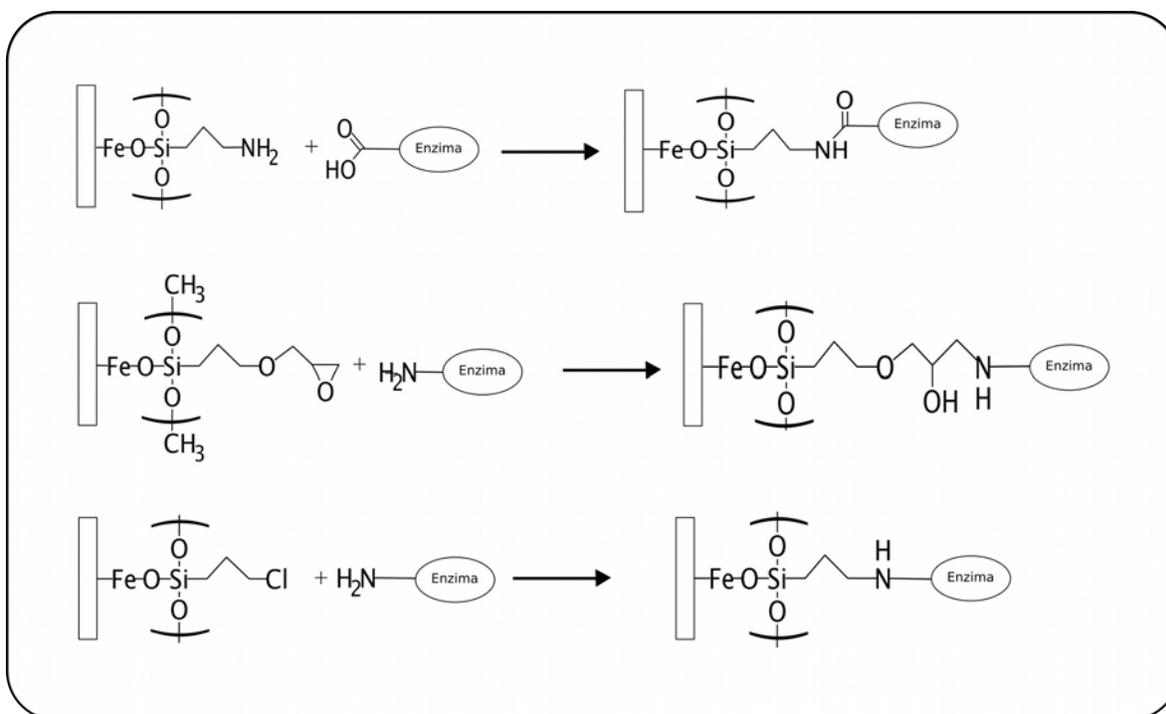


Figura 9. Mecanismo de inmovilización de lacasa con el uso de alcoxisilanos como agentes de acoplamiento.

2.1.8 Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína se realizó por espectroscopía UV-Vis, por el método de Bradford, usando una referencia de albúmina de suero bovino (BSA). Para la cuantificación de enzima inmovilizada se siguió el método de microensayo sugerido por el proveedor del colorante (reactivo Bradford: *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate*). Se midió la concentración a alícuotas tomadas del medio de inmovilización en intervalos de tiempo definidos para evaluar el progreso de la inmovilización. La cantidad de enzima

inmovilizada se determinó indirectamente a partir de la resta de la concentración de enzima original y de la del sobrenadante de la reacción de inmovilización.

2.1.9 Ensayo de actividad enzimática

La actividad enzimática de la lacasa se evaluó por espectroscopía UV-Vis. Se midió la oxidación de siringaldazina (sustrato) a temperatura ambiente (Figura 10). Se prepararon soluciones del sustrato en buffer fosfato y se agregó la enzima libre o la enzima inmovilizada. La oxidación del sustrato se determinó midiendo el aumento en la absorbancia de la solución a 525nm, longitud de onda a la que el producto oxidado de la siringaldazina tiene su máxima absorbancia. La concentración del sustrato en las soluciones se varió para determinar el valor de la constante catalítica k_{cat} , con la construcción de curvas de velocidad de reacción.

Para la enzima libre, se midió el cambio de la absorbancia de la solución de forma continua por dos minutos. Para la enzima inmovilizada se midió a diferentes tiempos de la reacción por 4 minutos, siendo el tiempo cero la solución sin enzima. Para los siguientes puntos, se detuvo la reacción precipitando las enzimas con un campo magnético y se midió la absorbancia a la solución.

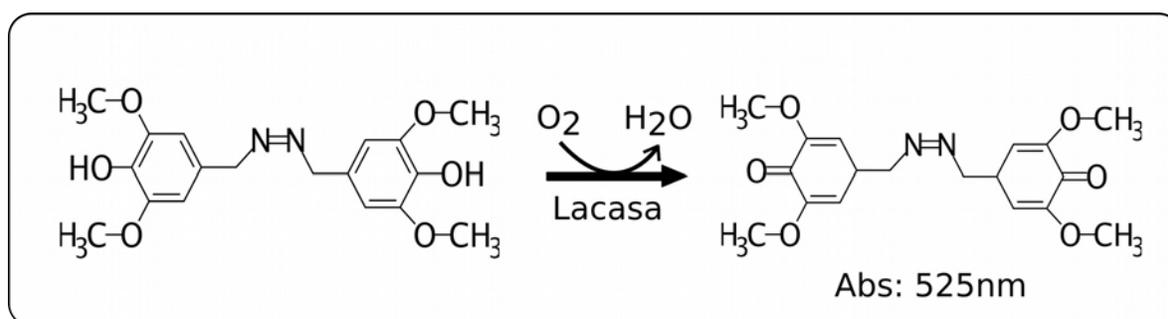


Figura 10. Mecanismo de oxidación de la siringaldazina catalizado por la lacasa.

2.1.10 Evaluación de la estabilidad

Se evaluó la estabilidad de las enzimas inmovilizadas midiendo la velocidad de reacción

inicial de la oxidación de siringaldazina y la velocidad remanente al reutilizar la enzima. La oxidación del sustrato se midió por espectroscopía UV-Vis a 525nm. La concentración de enzima y de sustrato fue la misma para cada reacción. Las reacciones se prepararon en celdas de plástico para espectrofotómetro y luego de cada reacción, se precipitó el sólido con un imán y se lavó con agua destilada.

Capítulo 3

3.1 Resultados y discusión

3.1.1 Síntesis de nanoestructuras

La primera parte de este trabajo consistió en la síntesis y caracterización de las nanoestructuras que se utilizaron como soporte. Las nanoestructuras sintetizadas fueron nanopartículas y nanotubos de magnetita ($\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4$), uno de los óxidos de hierro que pueden ser magnetizados.

Para la síntesis de las nanopartículas se utilizó el método de coprecipitación, que se destaca por su simplicidad. Este se basa en la preparación de mezclas muy finas, mezclas atómicas, de los constituyentes del material y su condensación por medio del uso de agentes precipitantes. Para la síntesis de nanopartículas de magnetita, los constituyentes son los iones de hierro 2+ y 3+, los cuales se piensa que forman complejos acuosos de hierro hidroxilado^{66,67}. Los agentes precipitantes usualmente utilizados son hidróxido de sodio y de amonio, los cuales cambian el pH de la solución e inducen la condensación de los complejos mencionados. El tamaño de las nanoestructuras resultantes es fuertemente dependiente del pH de la solución. Para nanopartículas de magnetita se ha observado que entre mayor es el pH de la solución, menor es su diámetro⁶⁶.

La síntesis de nanotubos se realizó siguiendo una metodología de dos pasos descrita por Jia et al⁶⁸. El primer paso consta de la síntesis de nanotubos de hematita por el método de síntesis hidrotermal. En este método se somete a los precursores a altas temperaturas y presiones, afecto su solubilidad y el transporte de sólidos en el medio. Los diferentes métodos hidrotermales disponibles son utilizados para diferentes funciones, entre ellas el crecimiento de cristales y nanoestructuras de óxidos metálicos. La formación de las nanoestructuras sigue un mecanismo simple, los iones metálicos de la solución reaccionan con iones precipitantes para formar un precipitado, luego el precipitado se deshidrata y forma la nanoestructura cristalina del óxido metálico. También es posible agregar “aditivos” a la solución, los cuales son usados para controlar la morfología y otras

propiedades de la nanoestructura⁶⁹. En la Figura 11 se esquematiza el mecanismo de formación de los nanotubos.

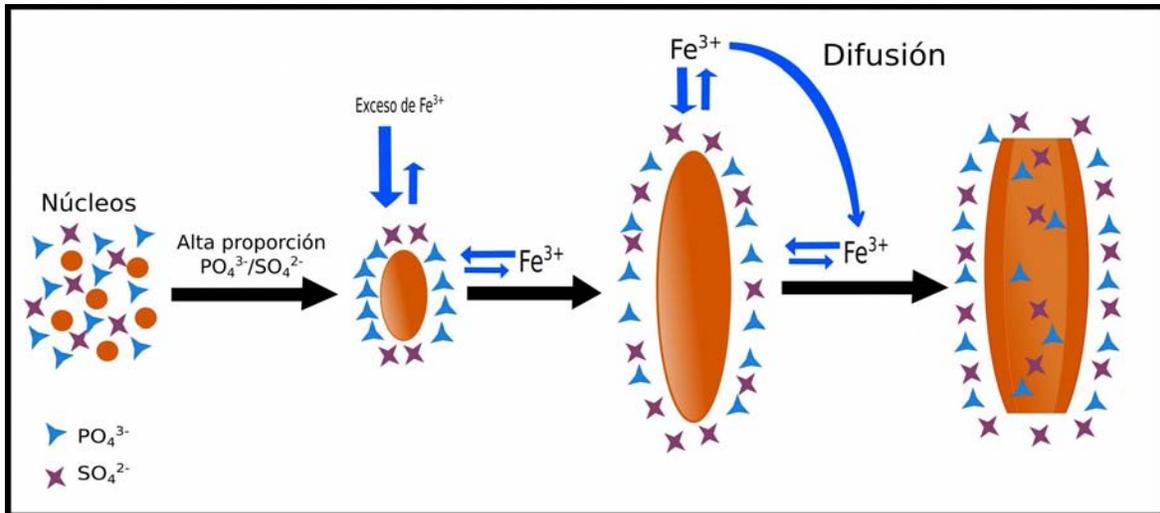


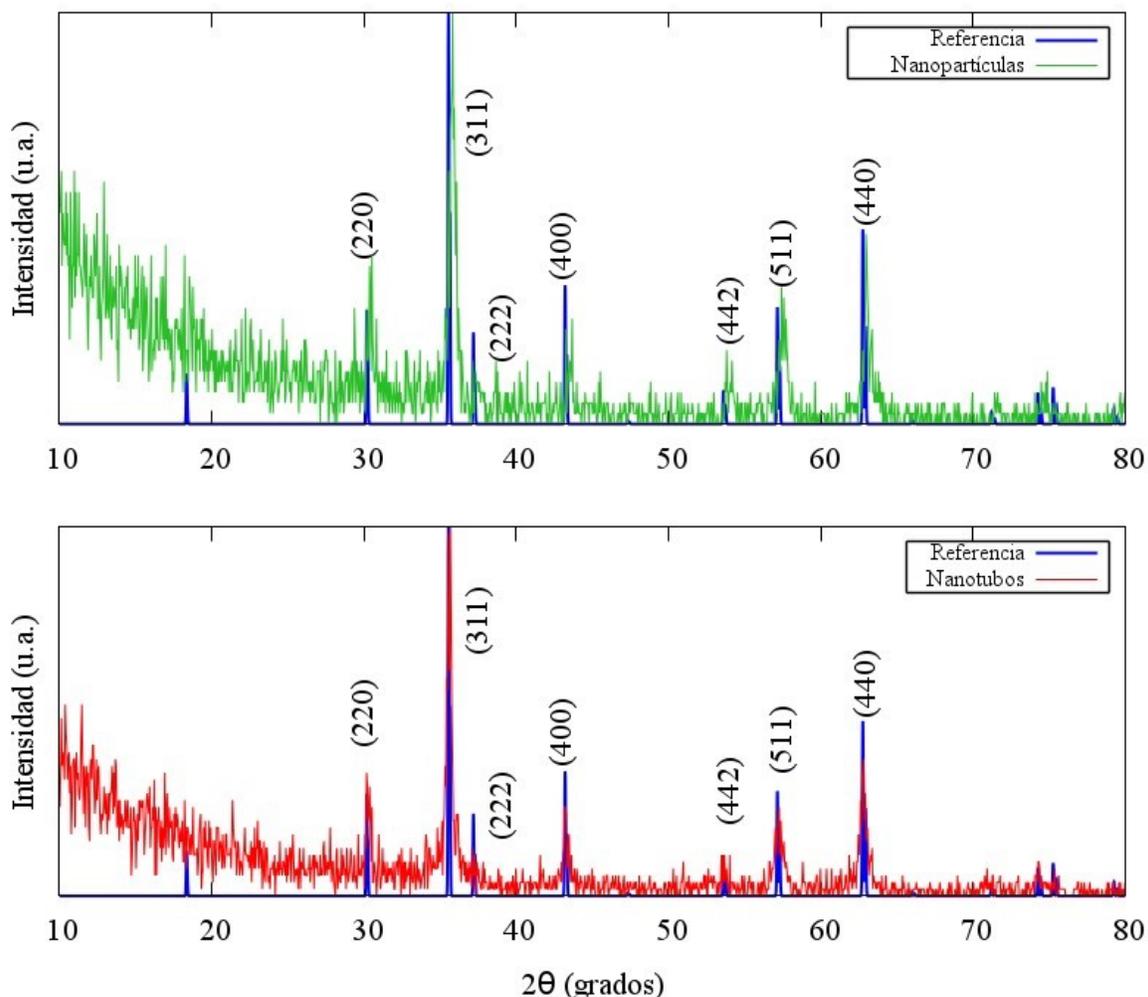
Figura 11. Mecanismo de formación de nanotubos de hematita por el método hidrotérmal (Imagen adaptada de Jia et al⁶⁸).

El segundo paso consistió en un tratamiento térmico con flujo de gas reductor con el que se reducen los nanotubos de hematita a magnetita. Usualmente, el gas reductor utilizado para este proceso es una mezcla de CO y CO_2 ; sin embargo, al utilizar esta mezcla de gases se suele contaminar el material con impurezas de carbono, además de emitir CO_2 como residuo. Con el uso de hidrógeno como gas reductor se evita la contaminación del material y se tiene la ventaja adicional de que el residuo del proceso es agua. Durante la reducción de la hematita, uno de sus oxígenos es “arrancado” por el hidrógeno, lo que cambia la proporción de seis átomos de hierro por nueve de oxígeno a seis de hierro por ocho de oxígeno, lo que provoca el cambio de la estructura cristalina junto con un incremento en el volumen del material⁷⁰.

Los materiales obtenidos de ambas síntesis fueron caracterizados por XRD. En esta técnica se hace incidir un haz de rayos X sobre una muestra y, si la muestra es cristalina, se detectan los rayos X difractados por su estructura cristalina. Esta difracción se da cuando se satisface la ley de Bragg (ec. 1), ley que relaciona la longitud de onda de la radiación electromagnética con el ángulo de difracción y la distancia de separación interplanar. Esta

técnica es útil para identificar materiales cristalinos debido a que este tipo de materiales produce patrones de difracción característicos de su estructura.

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (1)$$



.Figura 12. Difractogramas de las nanopartículas (arriba) y de los nanotubos (abajo). En azul está graficada la referencia y se indicaron los planos asociados a los picos de difracción.

En la Figura 12 se muestran los difractogramas obtenidos para las nanopartículas y los nanotubos, en conjunto con la referencia que tomada de la base de datos del proyecto *RRUFF* (ID: R061111.9). En primera instancia se nota que la forma de los difractogramas es semejante entre sí. Asimismo, se ve claramente que los picos de los difractogramas se corresponden con los picos más intensos de la referencia (en 30°, 35.5°, 43°, 57° y 62°), y

menos claramente con los picos menos intensos. Estos picos son asociados a la estructura de espinela de la magnetita (JCPDS 19-0629)⁷¹. Cabe mencionar que la maghemita (γ - Fe_2O_3) tiene un patrón de difracción muy parecido y hasta casi idéntico al de la magnetita, ya que esta fase del óxido de hierro también tiene una estructura de espinela. Sin embargo, aunque comparten esta característica es sencillo diferenciar ambos materiales, pues la magnetita es de color negro, mientras que la maghemita es de color rojo. En la Figura 13 se muestra un esquema de la estructura cristalina de la magnetita.

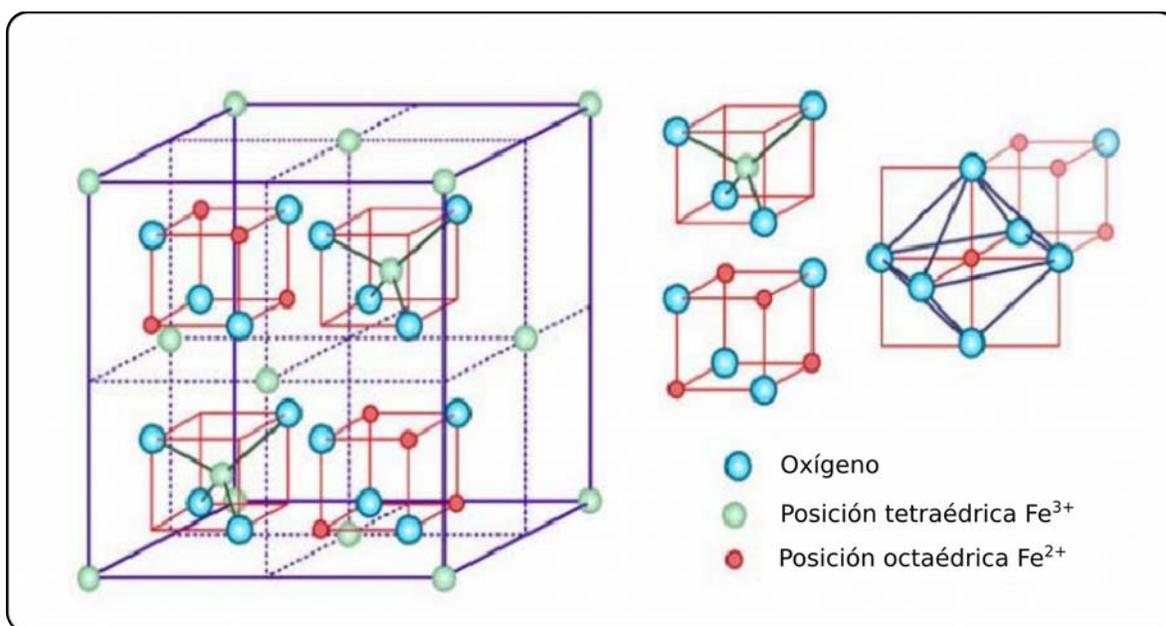


Figura 13. Diagrama de la estructura cristalina tipo espinela de la magnetita⁷².

Otra de las técnicas de caracterización empleadas fue la microscopía electrónica de transmisión (TEM). Esta técnica permitió determinar el tamaño de las nanoestructuras y verificar su morfología. Al analizar las micrografías de la Figura 14 se determinó que las nanopartículas sintetizadas tienen un diámetro de entre 10 y 20nm. Además, se encontró que las nanopartículas tienden a agruparse en cúmulos. Estas agrupaciones de partículas podrían formarse al momento de preparar las muestras en las rejillas de cobre; sin embargo, de acuerdo a la literatura⁷³, lo más probable es que las nanopartículas tiendan a agruparse mientras están en suspensión.

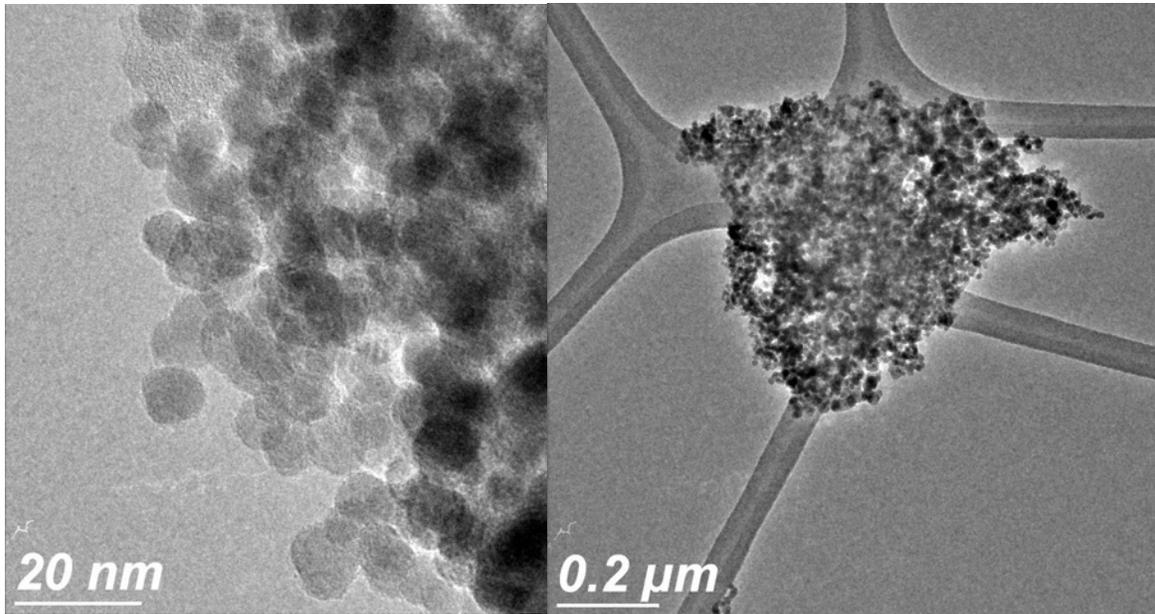


Figura 14. Micrografías de las nanopartículas de magnetita sintetizadas por el método de coprecipitación.

Por su parte, analizando la Figura 15, se verificó la forma tubular de los nanotubos de magnetita y se pudo determinar sus dimensiones, con lo que se construyó un par de histogramas representativos de su distribución de tamaño (Figura 16). La longitud de los nanotubos se centró en los 400nm, con variaciones importantes de ± 50 nm. Por su parte, la distribución de su diámetro externo se centró en los 175nm y la de su diámetro interno en los 140nm, aproximadamente. Otra característica observada fue que, aunque se observan grupos de nanotubos, estos no forman cúmulos como lo hacen las nanopartículas, por lo que el uso de surfactantes sería innecesario para lograr una buena dispersión de las nanoestructuras.

3.1.2 Funcionalización de nanoestructuras

Se funcionalizaron las nanopartículas de magnetita con tres alcoxisilanos organofuncionales, los cuales cumplieron el papel de agentes de acoplamiento para la inmovilización enzimática. Los silanos utilizados fueron el 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTMS), 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano (GPTMS) y 3-cloropropiltrimetoxisilano (CPTMS).

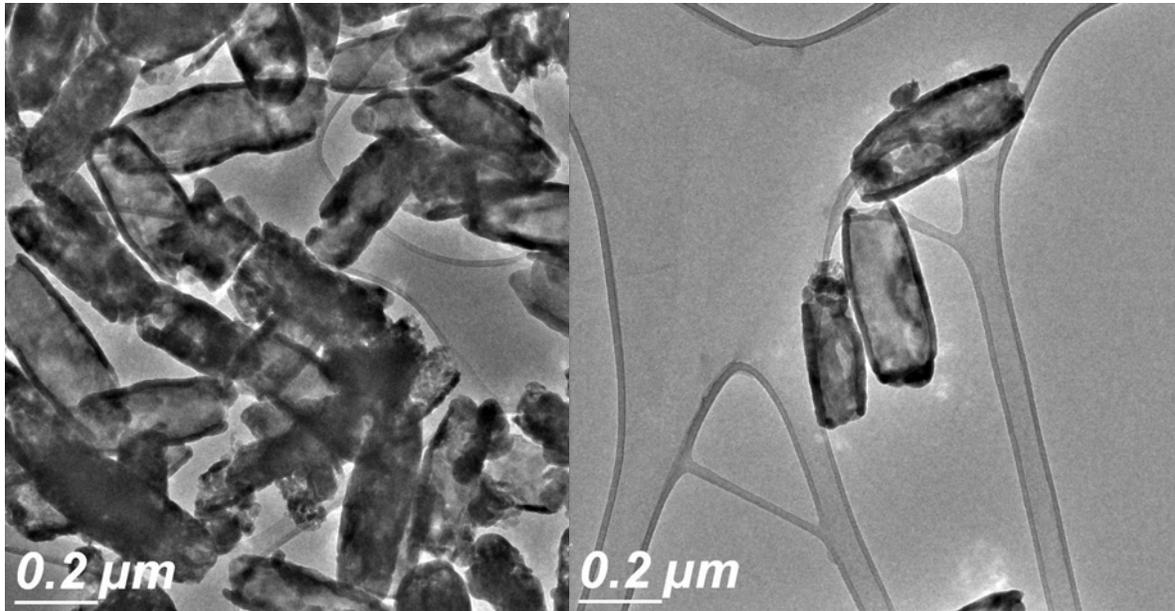


Figura 15. Micrografías de los nanotubos de magnetita sintetizados por el método hidrotermal.

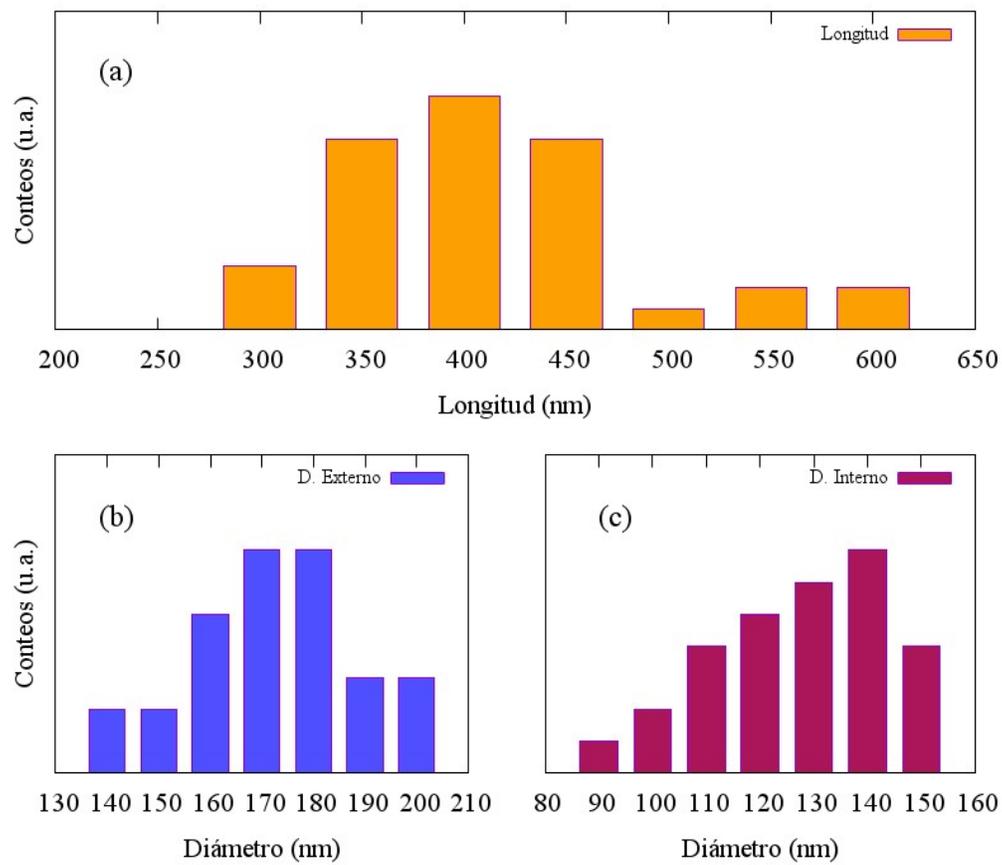


Figura 16. Histograma de la distribución de tamaños de los nanotubos de magnetita. (a) Corresponde a su longitud, (b) a su diámetro externo y (c) a su diámetro interno.

Los alcoxisilanos son moléculas bastante comunes en el mercado y son utilizadas para recubrir distintas superficies, por lo que la metodología de recubrimiento con silanos es bien conocida. En este trabajo se tomó como referencia la metodología descrita por Palimi et al⁷⁴. En este método se promueve la hidrólisis de los silanos al ajustar el pH a 3, transformándolos en silanoles. Al ajustar el pH de la solución a 8 se favorece la condensación de los silanoles, los cuales forman oligómeros, a la par que se promueve su unión con la superficie hidroxilada de los soportes por medio de reacciones de deshidratación.

Las nanoestructuras funcionalizadas se analizaron por espectroscopía FTIR, técnica que sirve para identificar a las moléculas en los analitos. La identificación de moléculas es posible debido a que los espectros de absorción infrarroja describen los estados energéticos vibracionales y rotacionales en términos de bandas de absorción⁷⁵. Generalmente, los espectros IR son considerados “huellas digitales” de las moléculas, lo que es especialmente útil para identificar grupos funcionales en la estructura de un compuesto analizado.

En esta técnica se hace incidir un haz de radiación IR sobre la muestra, en el intervalo de número de onda (el inverso de la longitud de onda) de 400 a 4000 cm^{-1} . La energía asociada a este intervalo suele ser la necesaria para provocar la transición de estados rotacionales y vibracionales de baja energía a estados de mayor energía⁷⁶. Cuando la energía coincide, se da un fenómeno de absorción por parte del material analizado y del haz tiene una caída en su intensidad. Esta caída de intensidad es lo que se detecta en el equipo y lo que permite identificar rasgos estructurales de los materiales analizados. Los datos obtenidos por esta técnica presentan en un plano xy, llamado espectrograma, con el número de onda en el eje horizontal y la intensidad en el eje vertical. También es común presentar los resultados en términos de absorbancia o transmitancia, ya que en este formato es posible obtener información sobre la concentración del material por medio de la ley de Beer-Lambert (ec. 2). En la Figura 17, se muestran los espectrogramas de las nanopartículas funcionalizadas y de las nanopartículas sin funcionalizar.

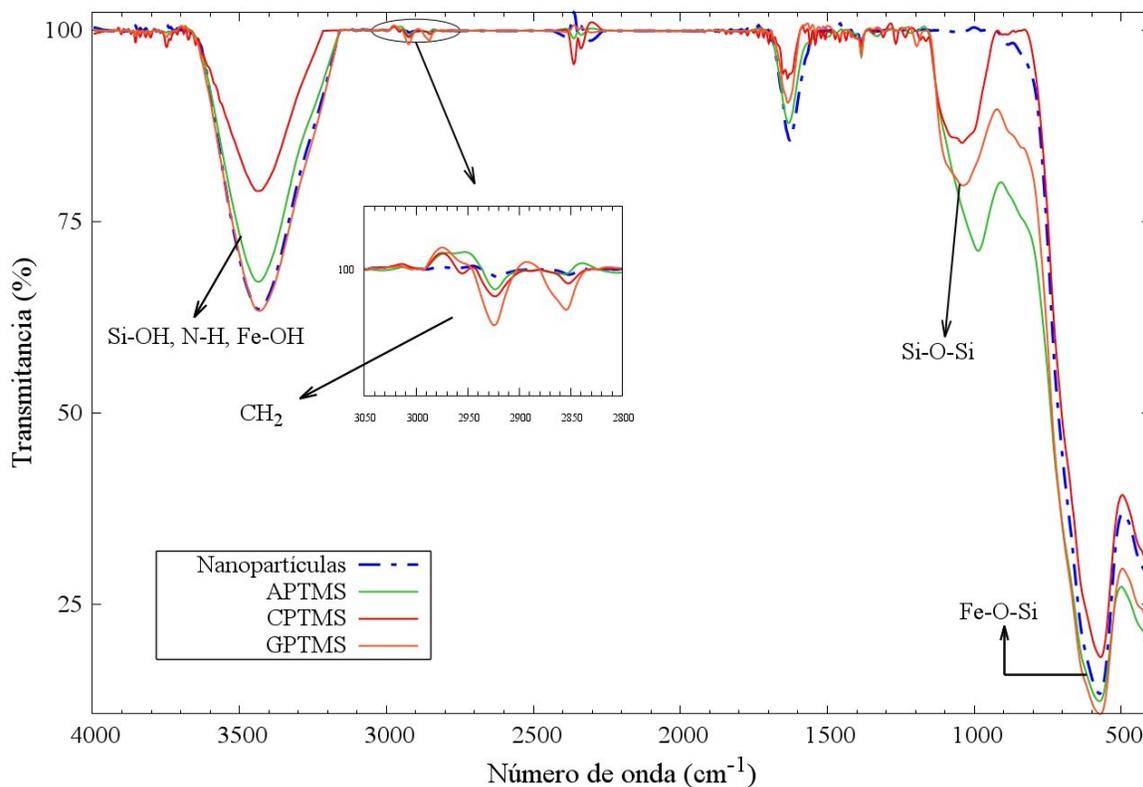


Figura 17. Espectro infrarrojo por transmitancia de las nanopartículas de magnetita sin funcionalizar y funcionalizadas con alcoxisilanos.

En la Figura 17 se pueden observar algunas diferencias entre el espectrograma de las nanopartículas sin funcionalizar (en azul) y las nanopartículas funcionalizadas. En el extremo derecho de la Figura 17, entre los 500 y 600 cm^{-1} , está el pico de mayor tamaño del espectrograma, correspondiente a los enlaces hierro-oxígeno-silicio que deberían haber resultado de la formación de enlaces entre los alcoxisilanos y las nanopartículas. Sin embargo, también existe un pico asociado a la vibración de enlaces hierro-oxígeno que se traslapa en la misma posición, por lo que es difícil utilizarlo para confirmar la funcionalización de las nanopartículas. La diferencia más notoria entre las nanopartículas funcionalizadas y sin funcionalizar es la aparición de un pico entre los 900 y los 1200 cm^{-1} . Este pico está relacionado a las vibraciones de enlaces silicio-oxígeno-silicio, como los que cabría esperar encontrar en nuestro material debido al proceso de formación de oligómeros durante la reacción de funcionalización. Otro pico de interés es el que aparece entre los 2800 y 3000 cm^{-1} , que corresponde al grupo CH_2 presente en la estructura de los alcoxisilanos utilizados. Un caso semejante al de los enlaces Fe-O-Si es el del pico en los

3400-3500 cm^{-1} . Este pico está asociado a los enlaces Si-OH y N-H, además de estar asociados a los enlaces Fe-OH, por lo que podrían asociarse tanto a la estructura de los silanos como a las nanopartículas. Al considerar todos los picos mencionados, se puede afirmar que las nanopartículas fueron funcionalizadas.

La funcionalización de los nanotubos de magnetita siguió el mismo protocolo que el de las nanopartículas. Sin embargo, para los nanotubos solo se utilizó uno de los silanos, el que mostró el mejor desempeño en la inmovilización enzimática, el 3-APTMS. Igualmente, los nanotubos fueron funcionalizados por espectroscopía FTIR y se construyeron los espectrogramas correspondientes, mostrados en la Figura 18.

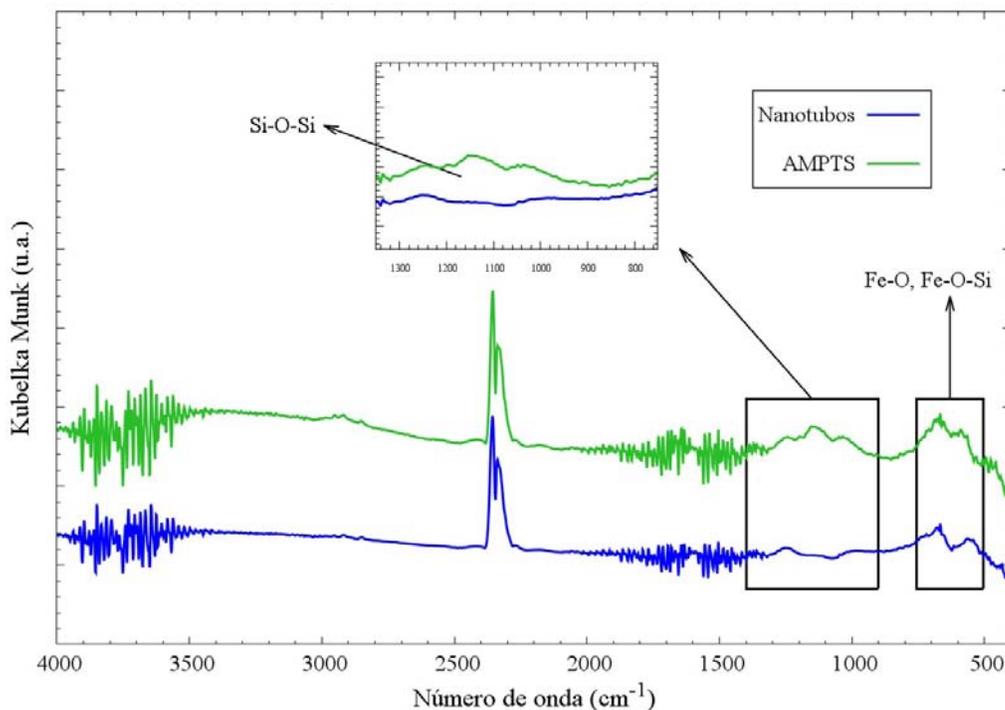


Figura 18. Espectro infrarrojo por reflectancia difusa de los nanotubos de magnetita sin funcionalizar y funcionalizados con el 3-APTMS.

Los nanotubos de magnetita fueron analizados en la modalidad de reflectancia difusa. En esta modalidad se obtiene información tanto de la absorbancia como de la dispersión del haz IR. Por esta razón la información obtenida en esta modalidad se maneja de acuerdo a la función Kubelka-Munk (ec. 2), la cual contempla una proporción entre los coeficientes de absorción y de dispersión. Al usar la función Kubelka-Munk la posición y grosor de las

bandas de absorción aportan información más fiable que la intensidad de los picos⁷⁷. Este método suele ser sensible al tamaño de grano, a la homogeneidad y a la anisotropía del material.

$$f(r) = \frac{(1 - R_\infty)^2}{2 R_\infty} = \frac{k}{s} \quad (3)$$

La interpretación de los espectrogramas de la Figura 18 es menos clara que la de los espectrogramas de la Figura 17. Sin embargo, en esta también es posible ver el pico correspondiente a los enlaces silicio-oxígeno-silicio entre los 1100 y 1200cm⁻¹. En estos espectrogramas no es claro si se detectó el pico correspondiente a los grupos CH₂. Al igual que en la Figura 17, el pico correspondiente a los enlaces Fe-O-Si está traslapado con el correspondiente a los enlaces Fe-O. En el caso de los nanotubos, la funcionalización efectiva no es muy clara; sin embargo, en conjunto con la información obtenida en la evaluación de la inmovilización y de actividad de enzima se puede confirmar que se dio la reacción de funcionalización en cierto grado.

3.1.3 Inmovilización de lacasa

La metodología para la inmovilización de la enzima fue bastante simple, ya que solo implicó la agitación de la mezcla preparada. Además, el protocolo se simplificó aún más debido a la robustez de la lacasa del hongo *Coriolopsis gallica*, ya que eliminó la necesidad de mantener la reacción a bajas temperaturas.

La inmovilización de enzima se evaluó midiendo concentración de proteína por el método de Bradford, de acuerdo al protocolo del fabricante del colorante. En esta técnica la absorbancia máxima del colorante cambia de 465 a 595nm cuando se forman enlaces con proteínas. La absorbancia de la solución en la nueva longitud de onda depende de la concentración de proteína, por lo que, haciendo uso de una referencia, permite medir la concentración de soluciones de proteína.

La enzima inmovilizada no se puede cuantificar directamente por espectroscopía UV-Vis debido a que las nanopartículas en la suspensión no permiten el paso del haz electromagnético. Por esta razón, para cuantificar la proteína inmovilizada se midió la concentración del medio de suspensión y se restó el valor a la concentración inicial del medio. La diferencia en las concentraciones de proteína corresponde a la enzima inmovilizada.

Se realizaron varias reacciones de inmovilización, en las que se variaron las cantidades de enzima y/o de soporte agregado y el tiempo de reacción. Se comenzó trabajando con 10mg de soporte (nanopartículas) y 1.5nmol de enzima. La reacción de inmovilización se mantuvo durante 90 minutos. La inmovilización se evaluó en varios puntos de tiempo, con lo que se construyó la gráfica de la Figura 19, el cual muestra la cantidad de enzima inmovilizada por unidad de masa del soporte. Tomando estos datos como base, se evaluó la actividad de las enzimas inmovilizadas.

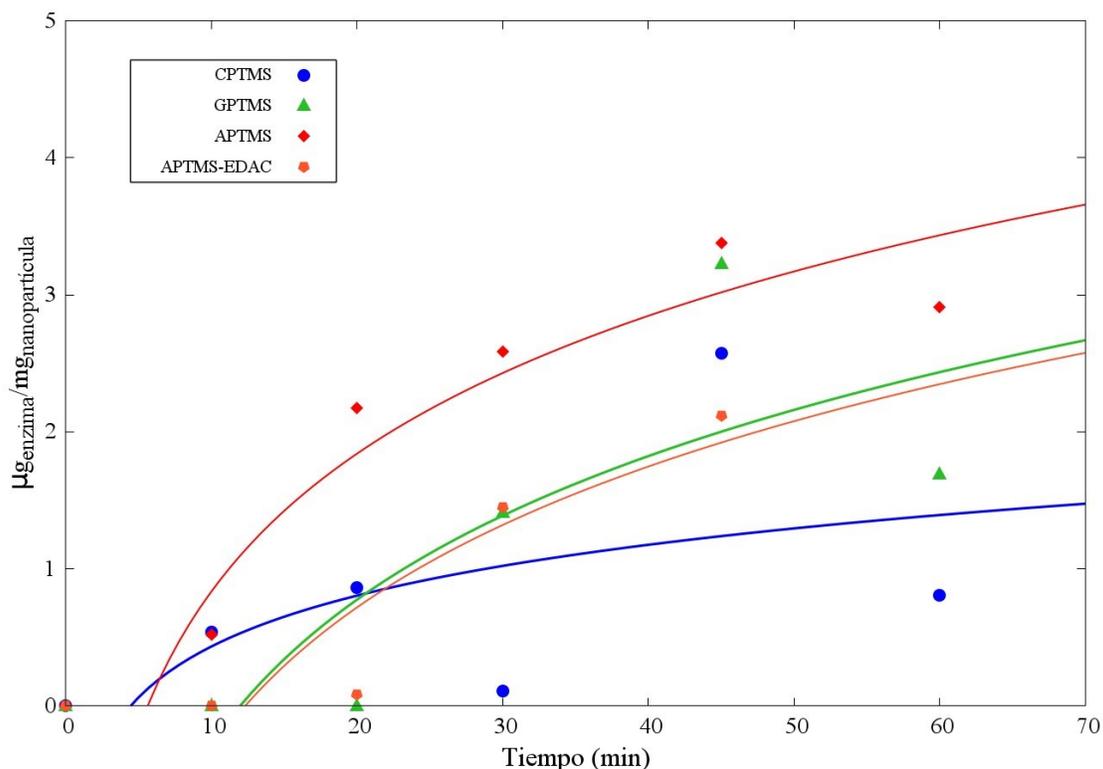


Figura 19. Curva de inmovilización de lacasa en nanopartículas de magnetita funcionalizadas con alcoxisilanos (Información suplementaria en Anexo I).

Según lo observado en las pruebas de inmovilización preliminares, en las nanopartículas funcionalizadas con el aminosilano hubo mayor inmovilización de enzima. Cuando se siguió el método de inmovilización asistido por EDAC con las partículas con el aminosilano se consiguió menor inmovilización que con el método convencional y semejante a la obtenida con el uso de las partículas con el glicidoxisilano. Las partículas funcionalizadas con el clorosilano tuvieron la menor inmovilización de todos los soportes.

De acuerdo con lo observado durante los ensayos de actividad, se descartó el uso del glicidoxisilano como agente de acoplamiento ya que la enzima no mostró actividad. A su vez, se seleccionó al aminosilano para su uso como agente de acoplamiento para los nanotubos de magnetita, debido a que fue el agente con el que hubo mayor inmovilización de enzima. Asimismo, se determinó usar el método asistido por EDAC con los nanotubos y las nanopartículas con aminosilanos, ya que hubo menor pérdida de actividad que con el método convencional.

Se cambió la cantidad de enzima utilizada a 4.5nmol y 20mg de soporte. Se utilizaron nanopartículas y nanotubos funcionalizados con el aminosilano y nanopartículas funcionalizadas con el clorosilano. La reacción de inmovilización se mantuvo durante 4 horas. En la Figura 20 muestra el progreso de la inmovilización.

En la Figura 20 se puede observar que la inmovilización en nanopartículas funcionalizadas con el clorosilano tiene un comportamiento diferente al de los otros soportes. Durante la primera media hora parece haber un aumento en la cantidad de enzima inmovilizada, pero luego de este punto da la impresión de haber una caída en esta cantidad. Este comportamiento más bien indicaría que el soporte llegó a la cantidad máxima de enzima que puede inmovilizar durante la primera hora.

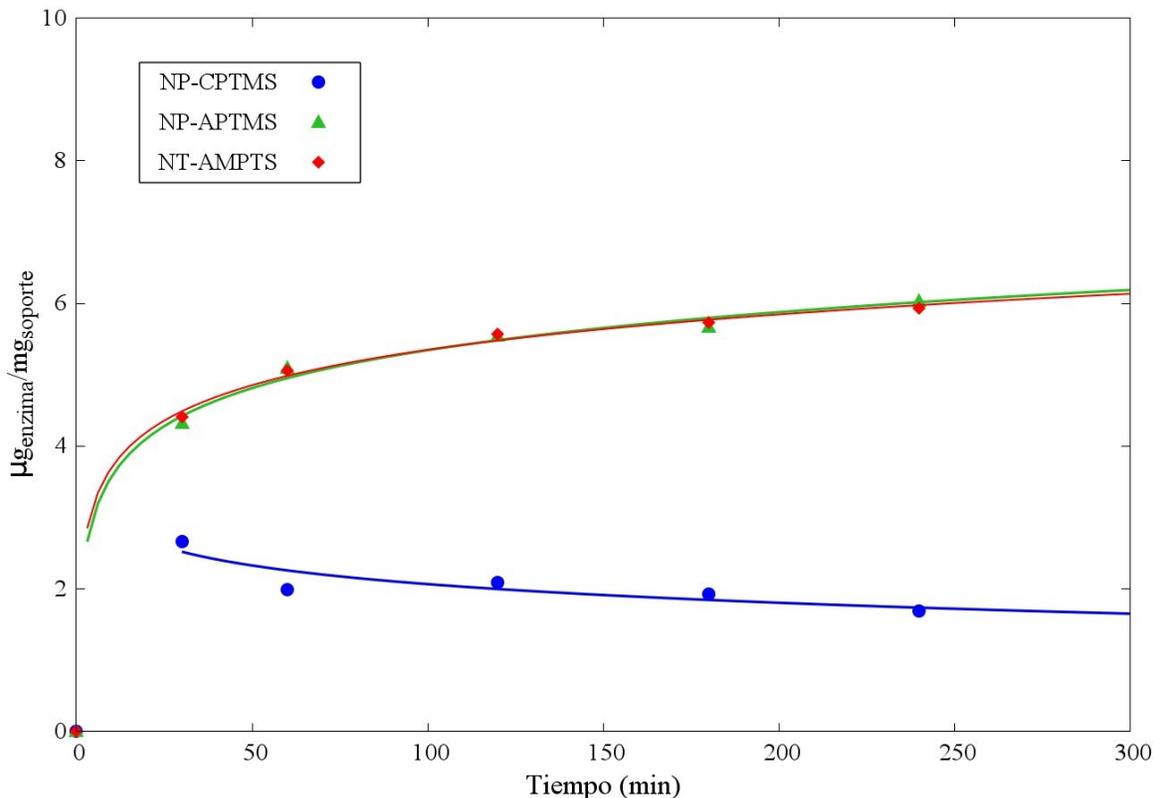


Figura 20. Curva de inmovilización de lacasa en soportes magnéticos funcionalizados con alcóxidos de silicio (Información suplementaria en Anexo II).

Respecto a los soportes funcionalizados con aminosilanos, mostraron un comportamiento muy parecido entre sí. Debido a la similitud entre ambos casos, se asume que la adsorción en el interior de los nanotubos no tuvo una contribución importante en el proceso de inmovilización. Sin embargo, ya que las nanopartículas tienden a agruparse, también es posible que una fracción de enzima haya quedado atrapada en estos grupos de partículas y, por lo tanto, tener una contribución en el proceso de inmovilización semejante al de la adsorción en los nanotubos. Esta posibilidad es mera especulación y se necesitaría diseñar metodologías que permitan verificar esta posibilidad.

3.1.4 Ensayos de actividad enzimática

Para la evaluación de la actividad se midió la oxidación de siringaldazina por espectroscopía UV-Vis, midiendo el cambio de absorbancia en los 525nm, longitud de onda

a la que el producto oxidado de la siringaldazina tiene absorbancia máxima.

El parámetro que se buscó obtener al medir actividad de la enzima inmovilizada es la constante catalítica (k_{cat}). Esta constante indica el número máximo de moléculas de sustrato que pueden ser convertidas por enzima por unidad de tiempo. Para determinar el valor de esta constante es necesario evaluar la oxidación de múltiples concentraciones de sustrato respecto al tiempo, manteniendo la concentración de enzima constante. La velocidad de reacción para cada concentración de sustrato evaluada fue utilizada para construir un gráfico de velocidad específica, en el cual se asume que la enzima sigue el modelo de cinética enzimática de Michaelis-Menten. Las curvas de velocidad específica construidas para la lacasa libre y para la lacasa inmovilizada se muestran en la Figura 21.

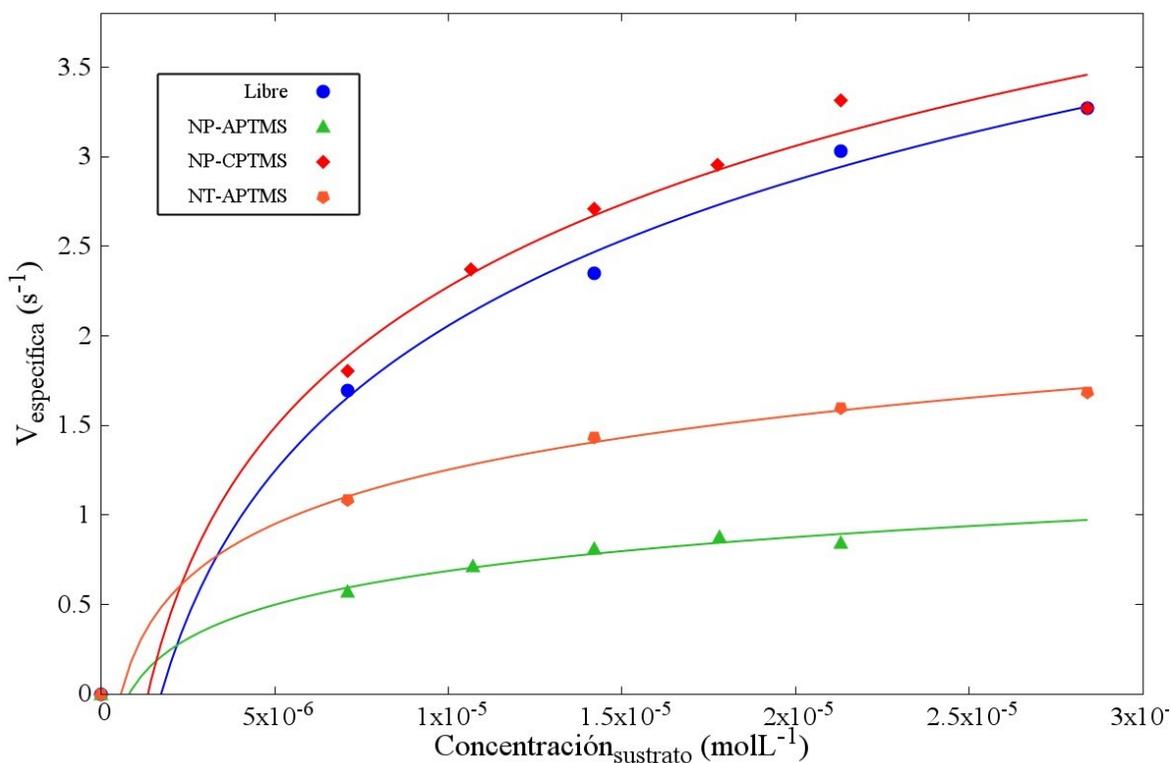


Figura 21. Curvas de velocidad específica de la oxidación de siringaldazina por lacasa de C.G. libre e inmovilizada (Información suplementaria en Anexo III).

Para la construcción de las curvas de velocidad es necesario trabajar en unidades de concentración sobre tiempo en lugar de las unidades de absorbancia sobre tiempo que nos proporciona el espectrofotómetro. Para hacer esta conversión recurrimos a la ley de Beer-

Lambert (ec. 3), la cual relaciona la atenuación de la luz con las propiedades del material que atraviesa. La ley se expresa como sigue:

$$A = \epsilon cl \quad (3)$$

Donde A es la absorbancia, ϵ es el coeficiente de extinción molar, c es la concentración del material en moles por litro y l es la distancia que atraviesa la luz. Al trabajar con celdas de 1 cm, el factor l se mantiene constante. El valor del coeficiente de extinción molar está bien reportado, por lo que se tomó de la literatura⁷⁸. Por lo tanto, no se necesita más que un simple cálculo para convertir los datos a las unidades necesarias.

El siguiente paso para determinar el valor de la constante catalítica es transformar las curvas de velocidad específica en diagramas de Lineweaver-Burk, que solo es una linealización de las mismas. Este tipo de diagramas permiten encontrar de una forma sencilla y gráfica el valor de la constante catalítica, o de la velocidad máxima, si no se trabaja con velocidad específica. Al linealizar las curvas de la Figura 21, se generaron los diagramas de la Figura 22.

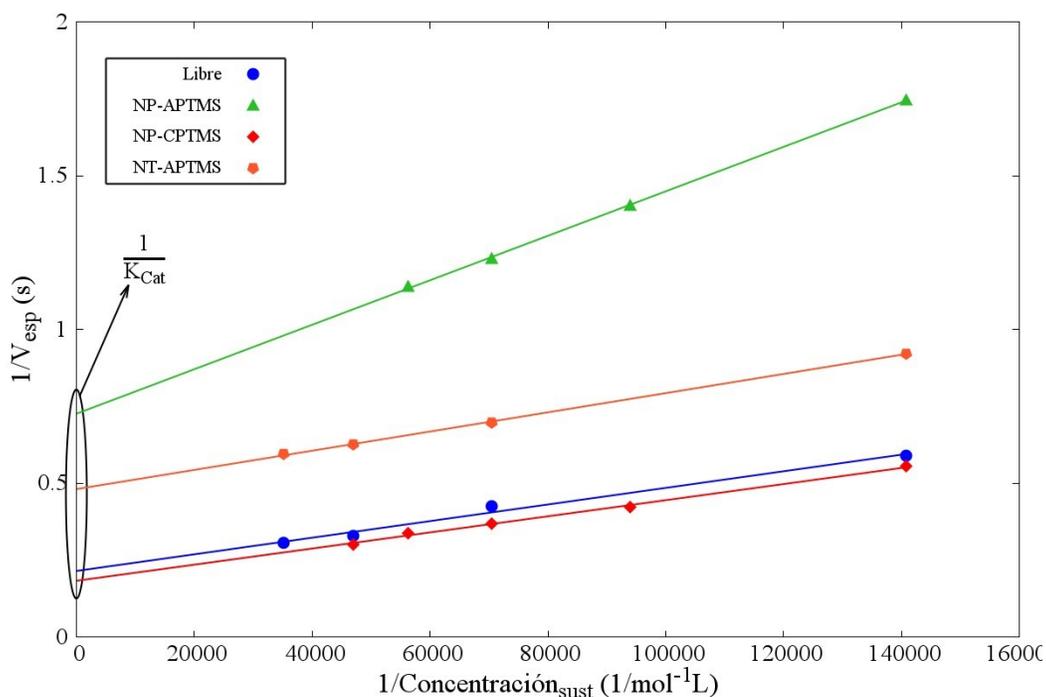


Figura 22. Diagramas de Lineweaver-Burk de la oxidación de siringaldazina por lacasa de C.G. libre e inmovilizada.

En la Figura 22 se muestra como con el uso de diagramas de Lineweaver-Burk se puede determinar el valor de la constante catalítica (k_{cat}). De esta forma se determinaron los valores de las constantes para la enzima libre y para la enzima inmovilizada, enlistadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores de la constante catalítica para la enzima libre y la enzima inmovilizada.

	E. Libre	NP-CPTMS	NP-APTMS	NT-CPTMS	NT-APTMS
k_{cat} (s ⁻¹)	4.65	5.46	1.37	*	2.08

* Dato no obtenido.

Como se establece en la Tabla 1, la enzima inmovilizada en nanopartículas funcionalizadas con el clorosilano mostraron la mayor constante catalítica, ligeramente mayor que la de la enzima libre. Este hecho es interesante debido a que típicamente uno espera encontrar pérdida de actividad en las enzimas inmovilizadas covalentemente y en este caso la actividad se mantuvo a la par de la enzima libre. Además, este soporte fue el que menor cantidad de enzima inmovilizó. En primera instancia, este valor de actividad significa que la enzima inmovilizada no formó enlaces en las zonas cercanas al sitio activo, particularmente cerca del cobre T1, que bloquearan el acceso de los sustratos. De igual forma, se puede intuir que no hubo formación de enlaces cerca de los canales que conducen al grupo trinuclear de cobre T2/T3.

Por su parte, la enzima inmovilizada en nanopartículas y nanotubos funcionalizados con el aminosilano conservaron actividad, pero el valor de la constante catalítica se redujo a menos de la mitad. A diferencia de lo observado con las nanopartículas funcionalizadas con el clorosilano, la caída en el valor de la constante catalítica podría atribuirse a una orientación poco favorable en la inmovilización, de modo que se ha obstruido el acceso del sitio activo al sustrato. Para determinar la veracidad de esta explicación es necesario profundizar en el mecanismo de inmovilización y en la estructura superficial de la enzima, para así identificar los sitios de la enzima en los que es más probable que se hayan formado enlaces, teniendo en consideración las condiciones de reacción.

También existieron diferencias entre la pérdida de actividad de acuerdo al soporte utilizado. El valor de la constante catalítica de la enzima en nanopartículas cayó más que el de la enzima en nanotubos. Esta diferencia en la actividad puede atribuirse a la morfología del soporte, debido a que se utilizó el mismo agente de acoplamiento (3-APTMS). La morfología del soporte puede tener un efecto importante en la funcionalización, teniendo en cuenta la formación de oligómeros durante el proceso. De la misma forma, la aglomeración de las nanopartículas puede tener importantes efectos negativos sobre la actividad de las enzimas, por ejemplo si una fracción de las enzimas queda atrapada dentro de los grupos de partículas. Para determinar los orígenes de esta diferencia es necesario profundizar en el mecanismo de inmovilización.

3.1.5 Evaluación de la estabilidad

Para evaluar la estabilidad de las enzimas inmovilizadas se midió la velocidad de reacción de la enzima en cinco ciclos de uso. Para todas las reacciones se mantuvo fija la cantidad de sustrato utilizada. La velocidad medida para cada número de reacción se expresó en términos de porcentaje, tomando la velocidad de la reacción inicial como el 100%. La caída de la velocidad para cada soporte se muestra en la Figura 23.

De acuerdo a lo observado en la Figura 23, la velocidad de reacción de la enzima inmovilizada en nanotubos funcionalizados con el aminosilano se conserva en mayor porcentaje, hasta un 80% aproximadamente. Por su parte, la enzima inmovilizada en nanopartículas bajó hasta cerca del 40% para ambos agentes de acoplamiento, aunque se conservó ligeramente mejor en las partículas funcionalizadas con el aminosilano. Esta diferencia en la conservación de la velocidad puede ser debido a la forma alargada de los nanotubos, lo cual podría permitir la formación de más enlaces con la enzima, dándole más rigidez a su estructura e incrementando su estabilidad. Por lo tanto, la inmovilización de lacasa en nanotubos magnéticos parece ser mejor opción para la inmovilización de lacasa.

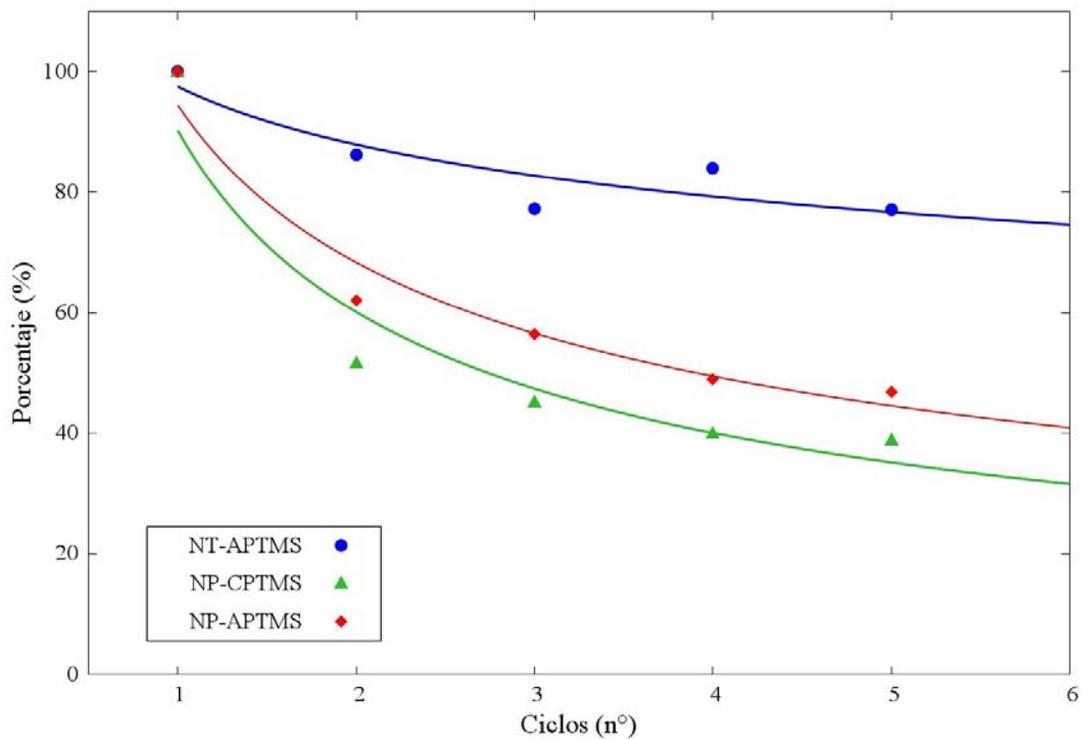


Figura 23. Estabilidad operacional de la enzima inmovilizada en diferentes soportes (Información suplementaria en Anexo IV).

Es necesario verificar cuál es el mejor agente de acoplamiento en términos de actividad enzimática y estabilidad.

Capítulo 4

4.1 Conclusiones

El métodos de síntesis por coprecipitación dio como resultado la producción de nanopartículas de 15nm de diámetro con una distribución de tamaño estrecha. Sin embargo, las nanopartículas tienden a agruparse en cúmulos. El método de síntesis hidrotermal en conjunto con la reducción por tratamiento térmico permitió obtener nanotubos de 400nm longitud con una distribución de tamaño relativamente amplia.

El uso de alcoxisilanos como agentes de acoplamiento en la inmovilización enzimática es una estrategia efectiva. Las nanoestructuras funcionalizadas con 3-APTMS inmovilizaron mayor cantidad de enzimas por unidad de masa, mientras que las nanopartículas funcionalizadas con 3-CPTMS inmovilizaron la menor cantidad.

A pesar de la baja cantidad de enzima inmovilizada en las nanopartículas funcionalizadas con el clorosilano, éstas tuvieron la mayor constante catalítica. Para la enzima inmovilizada en nanoestructuras funcionalizadas con el aminosilano este valor fue menor a la mitad que el de la enzima libre. Por su parte, el 3-GPTMS no es útil como agente de acoplamiento para la inmovilización de la lacasa, ya que la enzima inmovilizada con este agente de acoplamiento perdió su actividad.

La enzima inmovilizada en nanotubos conservó mayor actividad en comparación a la enzima inmovilizada en nanopartículas, hecho reflejado en el valor de la constante catalítica.

El uso de nanotubos como soporte para la inmovilización mantuvo el 80% de la actividad enzimática después de cinco ciclos de medición de actividad, mientras que la enzima inmovilizada en nanopartículas solo mantuvo el 40% de la actividad luego del mismo número de ciclos.

Referencias

1. Heaton, A. *The Chemical Industry*. (Springer Netherlands, 1994). doi:10.1007/978-94-011-1318-2
2. Pinkus, A. G. Synthetic and Natural Phenols. Studies in Organic Chemistry #52. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 5991–5991 (1997).
3. Seetharam, G. B. & Saville, B. A. Degradation of phenol using tyrosinase immobilized on siliceous supports. *Water Res.* **37**, 436–440 (2003).
4. Mahajan, S. P. *Pollution Control In Process Industries*. (Tata McGraw Hill Publishing Company, 1985).
5. Rappoport, Z. *The chemistry of phenols*. (Wiley, 2003).
6. Jørgensen, S. *Encyclopedia of ecology*. (Elsevier, 2008).
7. Munnecke, D. M. Enzymatic hydrolysis of organophosphate insecticides, a possible pesticide disposal method. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**, 7–13 (1976).
8. Guisán, J. M. *Immobilization of Enzymes and Cells*. (Humana Press, 2006).
9. Spahn, C. & Minteer, S. D. Enzyme immobilization in biotechnology Enzyme Immobilization in Biotechnology. *Recent Patents on Engineering* **2**, 195–200 (2008).
10. Yoshida, H. LXIII.—Chemistry of lacquer (Urushi). Part I. Communication from the Chemical Society of Tokio. *J. Chem. Soc., Trans.* **43**, 472–486 (1883).
11. Fernández-Fernández, M., Sanromán, M. Á. & Moldes, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnol. Adv.* **31**, 1808–1825 (2013).
12. Baldrian, P. Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**, 215–242 (2006).
13. Lu, A. H., Salabas, E. L. & Schüth, F. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **46**, 1222–1244 (2007).
14. Solomon, E. I., Sundaram, U. M. & Machonkin, T. E. Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chem. Rev.* **96**, 2563–2606 (1996).
15. Moore, D. *Fungal Morphogenesis*. (Cambridge University Press, 2002).
16. Christopher, L. P., Yao, B. & Ji, Y. Lignin Biodegradation with Laccase-Mediator Systems. *Front. Energy Res.* **2**, (2014).
17. Giardina, P. *et al.* Laccases: a never-ending story. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 369–385 (2010).

18. Jones, S. M. & Solomon, E. I. Electron transfer and reaction mechanism of laccases. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 869–883 (2015).
19. De la Mora, E. *et al.* Structural changes caused by radiation-induced reduction and radiolysis: the effect of X-ray absorbed dose in a fungal multicopper oxidase. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **68**, 564–577 (2012).
20. Pardo, I. & Camarero, S. Laccase engineering by rational and evolutionary design. *Cellular and Molecular Life Sciences* **72**, 897–910 (2015).
21. Harborne, J. B. en *Secondary plant products* (eds. Bell, E. A. & Charlwood, B. V.) 329–395 (Springer-Verlag, 1980).
22. Vermerris, W. & Nicholson, R. L. *Phenolic compound biochemistry*. (Springer, 2006).
23. Reis Giada, M. de L. en *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants* (ed. Morales-Gonzales, J. A.) 87–112 (InTech, 2013). doi:10.5772/51687
24. Glezer, V. en *The Chemistry of Phenols* (ed. Rappoport, Z.) 1347–1368 (John Wiley & Sons, Ltd, 2003). doi:10.1002/0470857277.ch18
25. Crawford, J. *et al.* en *ATSDR's Toxicological Profiles* (CRC Press, 2002). doi:10.1201/9781420061888_ch131
26. Michałowicz, J. & Duda, W. Phenols - Sources and toxicity. *Polish J. Environ. Stud.* **16**, 347–362 (2007).
27. Abel, P. D. *Water pollution biology*. (Taylor & Francis, 1996).
28. Häggblom, M. M. & Milligan, P. W. en *Soil biochemistry Vol. 10* (eds. Bollag, J. & Stotzky, G.) 1–34 (Marcel Dekker, Inc, 2000).
29. Melnikov, N. N. *Chemistry of Pesticides. Residue reviews* **36**, (Springer US, 1971).
30. Mohn, W. W. en *Biodegradation and Bioremediation* (eds. Singh, A. & Ward, O. P.) 125–148 (Springer Berlin Heidelberg, 2004). doi:10.1007/978-3-662-06066-7_6
31. Kamrin, M. A. en *Pesticide Profiles Toxicity, Environmental Impact, and Fate* 624–627 (CRC Press, 1997). doi:10.1201/9781420049220.ch13
32. Bioaccumulation vs Bioconcentration vs Biomagnification + Composting + Vermiculture Iasmania - Civil Services Preparation Online ! UPSC & IAS Study Material. en <<http://iasmania.com/bioaccumulation-vs-bioconcentration-vs-biomagnification-composting-vermiculture/>>

33. Mohammadi, S. *et al.* Phenol removal from industrial wastewaters: a short review. *Desalin. Water Treat.* **53**, 2215–2234 (2015).
34. Busca, G., Berardinelli, S., Resini, C. & Arrighi, L. Technologies for the removal of phenol from fluid streams: A short review of recent developments. *J. Hazard. Mater.* **160**, 265–288 (2008).
35. Divate, S. B. & Hinge, R. V. Review on Research Removal of Phenol from Wastewater by Using Different Methods. *Int. J. Sci. Res. Publ.* **4**, 5–7 (2014).
36. Kulkarni, Sunil J and Kaware, J. P. Review on research for removal of phenol from wastewater. *Int. J. Sci. Res. Publ.* **3**, 1–5 (2013).
37. Krastanov, A., Alexieva, Z. & Yemendzhiev, H. Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives. *Eng. Life Sci.* **13**, 76–87 (2013).
38. van Schie, P. M. & Young, L. Y. Biodegradation of Phenol: Mechanisms and Applications. *Bioremediat. J.* **4**, 1–18 (2000).
39. Sridevi, V., Lakshmi, M. V. V. C., Manasa, M. & Sravani, M. Metabolic Pathways for the Biodegradation of Phenol. *Int. J. Eng. Sci. Adv. Technol.* **2**, 695–705 (2012).
40. Sun, X. *et al.* Laccase-Catalyzed Oxidative Polymerization of Phenolic Compounds. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **171**, 1673–1680 (2013).
41. Ghoul, M. & Chebil, L. *Enzymatic polymerization of phenolic compounds by oxidoreductases. Springer Briefs in Molecular Science. Green Chemistry for Sustainability.* (Springer Netherlands, 2012). doi:10.1007/978-94-007-3919-2
42. Felsot, A. S., Racke, K. D. & Hamilton, D. J. Disposal and degradation of pesticide waste. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **177**, 123–200 (2003).
43. T. Al Hattab, M. & E. Ghaly, A. Disposal and Treatment Methods for Pesticide Containing Wastewaters: Critical Review and Comparative Analysis. *J. Environ. Prot. (Irvine,. Calif).* **3**, 431–453 (2012).
44. Lichtfouse, E., Schwarzbauer, J. & Robert, D. (Environmental chemist). *Pollutant Diseases, Remediation and Recycling.* **4**, (Springer International Publishing, 2013).
45. Bansal, O. P. en *Pesticides* (eds. Rathore, H. S. & Nollet, L. M. L.) 47–78 (CRC Press, 2012). doi:10.1201/b11864-6
46. Kuhad, R. C., Johri, A. K., Singh, A. & Ward, O. P. en *Applied bioremediation and phytoremediation* (eds. Singh, A. & Ward, O. P.) **1**, 35–54 (Springer Science & Business Media, 2004).

47. Karigar, C. S. & Rao, S. S. Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review. *Enzyme Res.* **2011**, 1–11 (2011).
48. Ahuja, S. K., Ferreira, G. M. & Moreira, A. R. Utilization of enzymes for environmental applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* **24**, 125–54 (2004).
49. Rao, M. ., Scelza, R., Scotti, R. & Gianfreda, L. Role of enzymes in the remediation of polluted environments. *J. soil Sci. plant Nutr.* **10**, 333–353 (2010).
50. Chacko, J. T. & Subramaniam, K. Enzymatic Degradation of Azo Dyes – A Review. *Int. J. Environmental Sci.* **1**, 1250–1260 (2011).
51. Viswanath, B., Rajesh, B., Janardhan, A., Kumar, A. P. & Narasimha, G. Fungal laccases and their applications in bioremediation. *Enzyme Res.* **2014**, (2014).
52. Gianfreda, L., Xu, F. & Bollag, J.-M. Laccases: A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes. *Bioremediat. J.* **3**, 1–26 (1999).
53. Husain, M. & Husain, Q. *Applications of Redox Mediators in the Treatment of Organic Pollutants by Using Oxidoreductive Enzymes: A Review. Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **38**, (2007).
54. Torres-Duarte, C., Roman, R., Tinoco, R. & Vazquez-Duhalt, R. Halogenated pesticide transformation by a laccase–mediator system. *Chemosphere* **77**, 687–692 (2009).
55. Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F. & Wahab, R. A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **29**, 205–220 (2015).
56. Eş, I., Vieira, J. D. G. & Amaral, A. C. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 2065–2082 (2015).
57. Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M. & Fernandez-Lafuente, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.* **40**, 1451–1463 (2007).
58. Stefanita, C.-G. *Magnetism*. (Springer Berlin Heidelberg, 2012). doi:10.1007/978-3-642-22977-0
59. Du Trémolet de Lacheisserie, E., Gignoux, D. & Schlenker, M. (Michel). *Magnetism*. (Springer, 2005).
60. Coey, J. M. D. *Magnetism and magnetic materials*. (Cambridge University Press,

2009).

61. Bertotti, G. *Hysteresis in magnetism : for physicists, materials scientists, and engineers*. (Academic Press, 1998).
62. Papaefthymiou, G. C. Nanoparticle magnetism. *Nano Today* **4**, 438–447 (2009).
63. Knobel, M. *et al.* Superparamagnetism and Other Magnetic Features in Granular Materials: A Review on Ideal and Real Systems. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **8**, 2836–2857 (2008).
64. Petravic, O. Superparamagnetic nanoparticle ensembles. *Superlattices Microstruct.* **47**, 569–578 (2010).
65. Montalbetti, C. A. G. N. & Falque, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **61**, 10827–10852 (2005).
66. Soler, M. A. G. & Paterno, L. G. en *Nanostructures* (eds. Róz, A. L. D., Ferreira, M., Leite, F. de L. & Oliveira, O. N.) 147–186 (William Andrew is an imprint of Elsevier, 2017).
67. Schth, F. & Unger, K. en *Preparation of Solid Catalysts* 60–84 (Wiley-VCH Verlag GmbH). doi:10.1002/9783527619528.ch3d
68. Jia, C.-J. *et al.* Large-Scale Synthesis of Single-Crystalline Iron Oxide Magnetic Nanorings. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 16968–16977 (2008).
69. Dey, K. K. & Srivastava, A. K. en (ed. Srivastava, A. K.) 418 (2013).
70. Geerdes, M., Chaigneau, R., Kurunov, I., Lingardi, O. & Ricketts, J. *Modern blast furnace ironmaking : an introduction*. (IOS Press, under the imprint of Delft University Press, 2015).
71. Lv, B., Xu, Y., Wu, D. & Sun, Y. Preparation and properties of magnetic iron oxide nanotubes. *Particuology* **6**, 334–339 (2008).
72. Ristanovic, Z. *et al.* The influence of mechanochemical activation and thermal treatment on magnetic properties of the BaTiO₃-Fe_xO_y powder mixture. *Sci. Sinter.* **47**, 3–14 (2015).
73. Basavaiah, K. & Rao, A. V. P. Synthesis of Polystyrenesulfonic Stabilized Magnetite Nanoparticle. *Chem. Sci. Trans.* **1**, 382–386 (2012).
74. Palimi, M. J., Rostami, M., Mahdavian, M. & Ramezanzadeh, B. Surface modification of Fe₂O₃ nanoparticles with 3-aminopropyltrimethoxysilane (APTMS): An attempt to investigate surface treatment on surface chemistry and

- mechanical properties of polyurethane/Fe₂O₃ nanocomposites. *Appl. Surf. Sci.* **320**, 60–72 (2014).
75. Maickel, R. P. & Bosin, T. R. en (eds. Argy, W. P., Brodie, B. B., Gillette, J. R., Mitchell, J. R. & Ackerman, H. S.) 9–20 (Springer-Verlag, 1971).
76. Robinson, J. W., Frame, E. M. S. & Frame, G. M. *Undergraduate instrumental analysis*.
77. Strens, R. G. J. & Wood, B. J. Diffuse reflectance spectra and optical properties of some iron and titanium oxides and oxyhydroxides. *Mineral. Mag.* **43**, 347–54 (1979).
78. Petroski, R. J., Peczyńska-Czoch, W. & Rosazza, J. P. Analysis, Production, and Isolation of an Extracellular Laccase from *Polyporus anceps*. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**, 1003–1006 (1980).

Anexo I

Análisis estadístico de la inmovilización de lacasa en nanopartículas magnéticas funcionalizadas con alcoxisilanos.

(Análisis realizado en el software SigmaPlot*)

Ecuación: Unión de ligando, saturación de un sitio en frumkin.JFL

$$f = B_{max} * \text{abs}(x) / (K_d + \text{abs}(x))$$

Parámetros globales:

Grado de ajuste global:

R	R ²	Adj R ²	Error estándar del estimado
0.863	0.745	0.626	0.730

Análisis de la Varianza:

	DF	SS	MS
Regresión	8	53.762	6.720
Residual	15	7.989	0.533
Total	23	61.750	2.685

Corregida para la media de las observaciones:

	DF	SS	MS	F	P
Regresión	7	23.356	3.337	6.265	0.0015
Residual	15	7.989	0.533		
Total	22	31.344	1.425		

Pruebas estadísticas:

Prueba de Normalidad (Shapiro-Wilk)

Fallada (P = 0.0279)

Estadística W= 0.9020

Nivel de relevancia = 0.0500

Prueba de varianza constante

Fallada (P = 0.0249)

Inmovilización en nanopartículas funcionalizadas con 3-CPTMS:

Número de observaciones = 6

$$R^2 = 0.321$$

Suma de cuadrados residual = 2.940

Parámetros estimados:

	Coefficiente	Error std.	t	P
E_{max}	2.491	4.666	0.534	0.6218

Carga máxima de enzima

T_{carga}	44.828	157.130	0.285	0.7896
-------------	--------	---------	-------	--------

Tiempo para llegar a la mitad de la carga máxima

Inmovilización en nanopartículas funcionalizadas con 3-APTMS:

Número de observaciones = 6

$R^2 = 0.908$

Suma de cuadrados residual = 0.856

Parámetros estimados:

	Coefficiente	Error std.	t	P
E_{max}	5.397	2.023	2.668	0.0559
T_{carga}	36.976	27.996	1.321	0.2571

Inmovilización en nanopartículas funcionalizadas con 3-GPTMS:

Número de observaciones = 6

$R^2 = 0.609$

Suma de cuadrados residual = 3.363

Parámetros estimados:

	Coefficiente	Error std.	t	P
E_{max}	19.587	173.474	0.113	0.9155
T_{carga}	427.223	4203.648	0.102	0.9239

Inmovilización en nanopartículas funcionalizadas con 3-APTMS por el método asistido por EDAC:

Número de observaciones = 5

$R^2 = 0.789$

Suma de cuadrados residual = 0.830

Parámetros estimados:

	Coefficiente	Error std.	t	P
E_{max}	8766612.848	4.146E+013	2.114E-007	1.0000
T_{carga}	213515691.748	1.010E+015	2.114E-007	1.0000

95% Certidumbre:

Es necesario generar un mayor número de puntos para la inmovilización en nanopartículas funcionalizadas con 3-GPTMS y con 3-APTMS con el método asistido por EDAC para obtener valores más realistas.

Anexo II

Análisis estadístico de la inmovilización de lacasa en nanopartículas magnéticas funcionalizadas 3-APTMS y 3-CPTMS y nanotubos magnéticos funcionalizados con 3-APTMS.

(Análisis realizado en el software SigmaPlot*)

Ecuación: Unión de ligando, saturación de un sitio en frumkin.JFL
 $f = B_{max} * \text{abs}(x) / (K_d + \text{abs}(x))$

Parámetros globales:

Grado de ajuste global:

R	R ²	Adj R ²	Error estándar del estimado
0.997	0.993	0.991	0.217

Análisis de la Varianza:

	DF	SS	MS
Regresión	6	309.521	51.587
Residual	12	0.564	0.047
Total	18	310.085	17.227

Corregida para la media de las observaciones:

	DF	SS	MS	F	P
Regresión	5	83.852	16.770	356.843	<0.0001
Residual	12	0.564	0.047		
Total	17	84.415	4.966		

Pruebas estadísticas:

Prueba de Normalidad (Shapiro-Wilk)	Fallada (P = 0.0008)
Estadística W = 0.7801	Nivel de relevancia = 0.0500
Prueba de varianza constante	Aprobada (P = 0.1097)

Inmovilización en nanopartículas funcionalizadas con 3-CPTMS:

Número de observaciones = 6

R² = 0.874

Suma de cuadrados residual = 0.514

Parámetros estimados:

	Coefficiente	Error std.	t	P
E_{max}	2.072	0.258	8.017	0.0013

Carga máxima de enzima

T_{carga} 4.531E-015 7.186 6.306E-016 1.0000
 Tiempo para llegar a la mitad de la carga máxima

Inmovilización en nanopartículas funcionalizadas con 3-APTMS por el método asistido por EDAC:

Número de observaciones = 6
 $R^2 = 0.998$
 Suma de cuadrados residual = 0.038

Parámetros estimados:

	Coefficiente	Error std.	t	P
E_{max}	6.219	0.090	68.897	<0.0001
T_{carga}	13.325	1.302	10.234	0.0005

Inmovilización en nanotubos funcionalizados con 3-APTMS por el método asistido por EDAC:

Número de observaciones = 6
 $R^2 = 1.000$
 Suma de cuadrados residual = 0.011

Parámetros estimados:

	Coefficiente	Error std.	t	P
E_{max}	6.155	0.048	128.969	<0.0001
T_{carga}	12.197	0.675	18.064	<0.0001

95% Certidumbre:

Es necesario profundizar en el proceso de inmovilización en nanopartículas funcionalizadas con 3-CPTMS para obtener datos más realistas.

Anexo III

Análisis estadístico de las actividades catalíticas de lacasa libre e inmovilizada (Análisis realizado en el software SigmaPlot*)

Ecuación: Unión de ligando, saturación de un sitio en frumkin.JFL
 $f = B_{max} * \text{abs}(x) / (K_d + \text{abs}(x))$

Parámetros globales:

Grado de ajuste global:

R	R ²	Adj R ²	Error estándar del estimado
0.998	0.997	0.996	0.077

Análisis de la Varianza:

	DF	SS	MS
Regresión	8	86.419	10.802
Residual	15	0.088	0.006
Total	23	86.508	3.761

Corregida para la media de las observaciones:

	DF	SS	MS	F	P
Regresión	7	28.836	4.119	699.824	<0.0001
Residual	15	0.088	0.006		
Total	22	28.925	1.315		

Pruebas estadísticas:

Prueba de Normalidad (Shapiro-Wilk)	Fallada (P = 0.0097)
Estadística W = 0.8793	Nivel de relevancia = 0.0500
Prueba de varianza constante	Fallada (P = <0.0001)

Lacasa inmovilizada en nanopartículas funcionalizadas con 3-APTMS:

Número de observaciones = 6

R² = 0.993

Suma de cuadrados residual = 0.004

Parámetros estimados:

	Coefficiente	Error std.	t	P
<i>k_{cat}</i>	1.180	0.091	12.965	0.0002
Constante catalítica				
<i>k_M</i>	7.044E-006	1.605E-006	4.388	0.0118

Constante de disociación

Lacasa libre:

Número de observaciones = 7

$R^2 = 0.992$

Suma de cuadrados residual = 0.062

Parámetros estimados:

	Coeficiente	Error std.	t	P
k_{cat}	4.690	0.312	15.022	<0.0001
k_M	1.054E-005	1.798E-006	5.863	0.0020

Lacasa inmovilizada en nanotubos funcionalizados con 3-APTMS:

Número de observaciones = 5

$R^2 = 1.000$

Suma de cuadrados residual = 1.324E-004

Parámetros estimados:

	Coeficiente	Error std.	t	P
k_{cat}	2.071	0.014	147.847	<0.0001
k_M	6.388E-006	1.524E-007	41.918	<0.0001

Lacasa inmovilizada en nanopartículas funcionalizadas con 3-CPTMS:

Número de observaciones = 5

$R^2 = 0.997$

Suma de cuadrados residual = 0.023

Parámetros estimados:

	Coeficiente	Error std.	t	P
k_{cat}	4.929	0.347	14.200	0.0008
k_M	1.423E-005	2.312E-006	6.157	0.0086

95% Certidumbre:

Anexo IV

Análisis estadístico de la estabilidad operacional de lacasa inmovilizada en nanopartículas magnéticas funcionalizadas con 3-CPTMS y 3-APTMS y en nanotubos magnéticos funcionalizados con 3-APTMS.

(Análisis realizado en el software SigmaPlot*)

Ecuación: Decaimiento exponencial, Sencillo modificado, 3 Parámetros en frumkin.JFL
 $f = a \cdot \exp(b/(x+c))$

Parámetros globales:

Grado de ajuste global:

R	R ²	Adj R ²	Error estándar del estimado
0.794	0.631	0.138	21.093

Análisis de la Varianza:

	DF	SS	MS
Regresión	9	73180.893	8131.210
Residual	6	2669.397	444.899
Total	15	75850.289	5056.686

Corregida para la media de las observaciones:

	DF	SS	MS	F	P
Regresión	8	4556.940	569.617	1.280	0.3924
Residual	6	2669.397	444.899		
Total	14	7226.336	516.167		

Pruebas estadísticas:

Prueba de Normalidad (Shapiro-Wilk)	Fallada (P = 0.0002)
Estadística W= 0.6835	Nivel de relevancia = 0.0500
Prueba de varianza constante	Aprobada (P = 0.3955)

Estabilidad de la actividad de la enzima inmovilizada en nanotubos magnéticos funcionalizados con 3-APTMS:

Número de observaciones = 5

R² = 0.885

Suma de cuadrados residual = 40.368

Parámetros estimados:

	Coefficiente	Error std.	t	P
V _{final}	75.085	7.159	10.488	0.0090

Porcentaje de la velocidad remanente respecto a la velocidad inicial.

b	0.219	41.226	0.005	0.9962
c	-0.238	9.079	-0.026	0.9815

Estabilidad de la actividad de la enzima inmovilizada en nanopartículas magnéticas funcionalizadas con 3-CPTMS:

Número de observaciones = 5

$R^2 = *$

Suma de cuadrados residual = *

Parámetros estimados:

	Coefficiente	Error std.	t	P
V_{final}	32.985	1.380	23.899	0.0017
b	0.776	0.138	5.609	0.0303
c	-0.300	0.100	-2.992	0.0959

Estabilidad de la actividad de la enzima inmovilizada en nanopartículas magnéticas funcionalizadas con 3-APTMS:

Número de observaciones = 5

$R^2 = 0.995$

Suma de cuadrados residual = 8.630

Parámetros estimados:

	Coefficiente	Error std.	t	P
V_{final}	39.120	7.810	5.009	0.0376
b	0.980	214.425	0.005	0.9968
c	0.045	189.355	2.374E-004	0.9998

95% Certidumbre:

* Dato no obtenido.