



Universidad Nacional Autónoma de México

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Impacto de las condiciones de reacción y del pretratamiento termomecánico en la cristalinidad y en la hidrólisis enzimática de PET por ANCUT 1.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias.

PRESENTA:

Q. A. Francisco Franco Guerrero.

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Amelia Farrés González Sarabia
Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán.
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dra. Carmina Montiel Pacheco.
Facultad de Química, UNAM

Ciudad Universitaria, CD. MX., abril del 2025



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.



PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

Impacto de las condiciones de reacción y del pretratamiento termo-mecánico en la cristalinidad y en la hidrólisis enzimática de PET por ANCUT 1

que presenté para obtener el grado de maestro es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras utilizadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

Francisco Franco Guerrero, 313300367.

Jurado Asignado:

Presidente:	Dr. Segura González, Daniel Genaro. Instituto de Biotecnología, UNAM.
Vocal:	Dr. Navarro Ocaña, Arturo. Facultad de Química, UNAM.
Vocal:	Dra. Córdova Aguilar, María Soledad. Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología
Vocal:	Dra. Gutiérrez Flores, Selena. Facultad de Química, UNAM.
Secretario:	Dr. Peña Malacara, Carlos Felipe. Instituto de Biotecnología.

El presente proyecto fue desarrollado en las instalaciones del laboratorio 312 ubicado en el Conjunto E correspondiente al Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM. Se trabajó bajo la asesoría de la Dra. Amelia María de Guadalupe Farrés González Sarabia.

Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo económico financiado por el CONACYT para estudios de maestría (CVU: 1226246) además del programa PAPIIT (201921) y PAIP-FQ 5000-9095. También se contó con el apoyo del Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) para asistir al XX Congreso de Biotecnología y Bioingeniería organizado por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería (SMBB) en Ixtapa Zihuatanejo, México.

AGRADECIMIENTOS

A mi *alma mater*, la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme una educación de excelencia y la oportunidad de crecer tanto académica como personalmente.

A la Facultad de Química, que ha sido mi hogar durante esta etapa de formación, proporcionándome los conocimientos, recursos y herramientas necesarias para alcanzar este logro.

A CONAHCYT, a todos los mexicanos quienes financiaron la realización del presente proyecto a través del programa de becas de posgrado.

A la Dra. Amelia, por darme la oportunidad de formar parte de su laboratorio y brindarme la confianza para crecer profesionalmente. Su guía y apoyo han sido fundamentales en mi formación y en la realización de este trabajo.

A los miembros del comité tutor, la Dra. Carmina Montiel y el Dr. Mauricio Trujillo; y a la Dra. María Soledad gracias por el seguimiento y los valiosos comentarios que fueron enriqueciendo este proyecto.

A M. en C. Cindy Estrada por su apoyo técnico y completa disposición.

A M en C Sandra Pérez Munguía por sus valiosos consejos y por compartir sus conocimientos y experiencias que sumaron positivamente a este trabajo.

A las técnicas académicas QFB. Margarita Guzmán Villanueva; M. en C. Nayeli López Balbiaux; Dra. Lorena Martínez De La Cruz y Q. Marisela Gutiérrez Franco, por la ayuda brindada en las técnicas de RP-HPLC, RMN, DSC y ATR-FTIR respectivamente desarrolladas en las instalaciones del Edificio F, Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI), Facultad de Química, UNAM.

DEDICATORIA

A mi madre, Patricia, que ahora me cuida desde el cielo. Cada paso que doy es con su recuerdo en mi corazón, y este logro es para ella, con todo mi amor y gratitud. Este logro es un homenaje a todo lo que hizo por mí.

A mis tíos, Alberto y Rocío, y familiares, Dulce, Alejandra, Mariana, Rodri, Armando, Concepción, Raúl, Christopher y Emmanuel, quienes han estado a mi lado brindándome apoyo, cariño y palabras de aliento en los momentos más difíciles. Gracias por ser un soporte fundamental en mi vida, por ser mi familia y por ayudarme a seguir adelante.

A Katya, por su paciencia, comprensión y amor incondicional. Gracias por ser mi refugio en los momentos de duda y por motivarme siempre a dar lo mejor de mí.

A mis compañeros de laboratorio del 312 y/o amigos: Augusto, Samuel, Adriana, Rafael, Marco, Daniel, Erick, Ilce y Fernanda, quienes han sido un pilar fundamental con su apoyo y compañía en este proceso. Gracias por estar ahí en los momentos de esfuerzo y también en los de celebración.

A todos aquellos que de alguna manera han sido parte de este camino, mi más sincero agradecimiento.

ÍNDICE

1	Resumen.....	13
2	Marco Teórico.....	14
2.1	Tereftalato de poli(etileno) (PET).	14
2.2	Propiedades del PET.....	16
2.3	Calorimetría Diferencial de Barrido y Espectroscopía de infrarrojo para caracterizar PET.....	17
2.4	Plásticos.	22
2.5	Estrategias en la degradación de plásticos.	23
2.6	Aplicaciones de los monómeros del PET.....	26
2.7	Cutinasas.	26
2.8	Cutinasas en la degradación de PET.	28
2.9	Microorganismos productores de cutinasas.	32
2.10	Cutinasas de <i>Aspergillus nidulans</i>	32
2.11	Producción de cutinasas recombinantes de <i>Aspergillus nidulans</i>	33
2.12	Variables involucradas en la hidrólisis enzimática del PET.	35
2.13	Estrategias analíticas para la investigación de la hidrólisis enzimática del PET.....	37
2.14	Pretratamientos del PET.....	38
3	Antecedentes.....	41
4	Justificación.	43
5	Hipótesis.....	44
6	Objetivos.....	44
6.1	General.....	44
6.2	Particulares.....	44
7	Metodología.....	45
7.1	Medios de cultivo.	46
7.2	Reactivación de <i>Pichia pastoris</i>	46
7.3	Crecimiento en medio LOTO Glicerol 1%.	46
7.4	Inducción de ANCUT 1 en medio LOTO Metanol 3%.	46
7.5	Concentración del extracto enzimático.....	47
7.6	Cuantificación de proteína total soluble en microplaca.....	47
7.7	Cuantificación de actividad volumétrica en placa.	47
7.8	Identificación de ANCUT 1 en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	48
7.9	Determinación de actividad de esterasa a través de zimogramas (Cualitativo).	48
7.10	Evaluación de condiciones de reacción de hidrólisis del PET con ANCUT1.	49

7.10.1	Efecto del amortiguador.	50
7.10.2	Efecto de la concentración del amortiguador.....	50
7.10.3	Efecto de la proporción de sustrato.....	50
7.10.4	Efecto de la proporción de enzima.	51
7.10.5	Efecto de la agitación.	51
7.10.6	Efecto de la temperatura de reacción y la presencia de iones en el medio de reacción.	52
7.10.7	Actividad residual y avance de reacción de hidrólisis de PET-GF con ANCUT 1.....	52
96 h		52
7.10.8	Evaluación de la actividad de ANCUT 1 en la hidrólisis del PET pretratado.	53
7.11	Síntesis del intermediario MHET por hidrólisis enzimática del BHET.	53
7.12	Tratamiento de muestras para análisis de densitometría por TLC.	54
7.13	Cromatografía en capa fina (TLC).....	54
7.14	Cuantificación de actividad de hidrólisis de PET por ANCUT 1 por espectrofotometría.	54
7.15	Cuantificación de actividad de hidrólisis de PET por ANCUT 1 a través de RP-HPLC.	55
7.16	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (ATR-FTIR).	55
7.17	Evaluación de la cristalinidad por calorimetría diferencial de barrido. (DSC).	55
7.18	Pretratamiento térmico del PET post-consumo (PET-PC).	56
8	Resultados y discusión.	57
9	Parte 1 A. Evaluación de condiciones de reacción de hidrólisis de PET de baja cristalinidad (PET-GF) por ANCUT 1.	57
9.1	Efecto del tipo de amortiguador.....	57
9.2	Efecto de la concentración del amortiguador.	58
9.3	Efecto de la proporción de sustrato.	60
9.4	Efecto de la proporción de enzima.....	62
9.5	Efecto de la agitación en la hidrólisis del PET-GF.....	63
9.6	Efecto de la temperatura de reacción y la presencia de iones en el medio de reacción.....	65
9.7	Identificación de los productos de reacción de la hidrólisis de PET-GF con la enzima ANCUT 1.....	68
9.8	Actividad residual y avance de reacción de hidrólisis de PET-GF con ANCUT 1.	69
10	Parte 1 B. Caracterización de los sustratos y evaluación de la fracción susceptible del PET-GF a hidrólisis por ANCUT 1.	73

10.1	Caracterización de los sustratos.	73
10.2	Identificación de la fracción del PET susceptible a hidrólisis por ANCUT 1.	75
11	Parte 2. Evaluación del efecto del pretratamiento termo-mecánico en PET-PC y evaluación de la actividad de ANCUT 1 frente al PET pretratado.	77
11.1	Efecto del pretratamiento termo-mecánico en el PET post consumo y caracterización.	77
11.2	Evaluación de la actividad de ANCUT 1 en la hidrólisis del PET pretratado.	81
12	Conclusiones.	85
13	Referencias.	87
14	ANEXOS.	93
14.1	ANEXO A. Composición de medios de cultivo y metodología para la producción de enzima a nivel matraz.	93
14.2	ANEXO B: Curva de calibración de la concentración de proteína por el método de Bradford.	96
14.3	ANEXO C. Caracterización de sustrato con ATR FTIR y DSC.	97
14.4	ANEXO D. Caracterización del intermediario de reacción (MHET).	99
14.5	Anexo E. Identificación y cuantificación de monómeros por la hidrólisis de PET por ANCUT 1.	101
14.6	ANEXO F. Barridos espectrales de los monómeros TPA, MHET y BHET.	103
14.7	ANEXO G. Tiempos de retención de los monómeros TPA, MHET y BHET en RP-HPLC estándares y muestras.	105
14.8	ANEXO H. Cálculo teórico del % Depolimerización del PET-GF (PET de referencia).	108
14.9	ANEXO I. Tratamientos estadísticos.	109

Índice de Tablas.

Tabla 1. Propiedades del PET.	16
Tabla 2. Números de onda relacionados con la caracterización del PET a través de la técnica ATR-FTIR.....	20
Tabla 3. Algunos ejemplos de aplicaciones de los monómeros del PET.	26
Tabla 4. Algunas cutinasas reportadas en la literatura para la hidrólisis de poliésteres.	31
Tabla 5. Microorganismos productores de cutinasas.	32
Tabla 6. Cutinasa identificadas en <i>A. nidulans</i>	33
Tabla 7. Métodos analíticos más comunes en la investigación de la degradación enzimática de PET.....	37
Tabla 8. Pre-tratamientos en el reciclaje de plásticos.	38
Tabla 9. Algunos pretratamientos utilizados en reacciones de hidrólisis enzimática del PET.	39
Tabla 10. Caracterización bioquímica de la ANCUT 1 recombinante expresada en <i>Pichia pastoris</i> X-33.	41
Tabla 11. Condiciones de reacción en la evaluación del desempeño de ANCUT 1 en la hidrólisis del PET-GF en función del tipo de amortiguador.	50
Tabla 12. Condiciones de reacción para evaluación del efecto de la concentración de amortiguador Tris-HCl en el medio de reacción de hidrólisis de PET-GF con ANCUT 1.	50
Tabla 13. Condiciones de reacción para evaluación del efecto de la proporción de sustrato en el medio de reacción de hidrólisis de PET-GF con ANCUT 1.	50
Tabla 14. Condiciones de reacción para evaluación del efecto de la proporción de enzima en el medio de reacción en la hidrólisis de PET-GF por ANCUT 1.	51
Tabla 15. Condiciones de reacción para evaluación del efecto de la agitación en la hidrólisis enzimática del PET-GF.	51
Tabla 16. Condiciones de reacción de hidrólisis de ANCUT 1 frente a PET-GF. Evaluación de temperatura de reacción y presencia de iones en el medio de reacción.....	52
Tabla 17. Condiciones de reacción para la evaluación del avance de reacción de hidrólisis de PET-GF con ANCUT 1 y la estabilidad térmica de la enzima.	52
Tabla 18. Condiciones de reacción para evaluación ANCUT 1 contra distintos tipos de PET.....	53
Tabla 19. Caracterización del PET-PC (botella) y referencias de PET cristalino y amorfo.	73
Tabla 20. Cambios en la estructura del PET-GF antes y después del tratamiento con la enzima ANCUT 1.	76
Tabla 21. Proporciones para la preparación del stock de elementos traza.	93
Tabla 22. Proporciones para la preparación del stock de vitaminas.	93
Tabla 23. Proporciones para la preparación del medio YPD	94
Tabla 24. Medio LOTO con glicerol al 1%.	94
Tabla 25. Medio LOTO con metanol al 3%.	95
Tabla 26. Comparación entre los métodos de densitometría y Absorbancia a 241 nm para la cuantificación de los productos de reacción.	104

Índice de Figuras.

Figura 1. Reacciones para la síntesis de PET partiendo de los monómeros TPA y DMT.	14
Figura 2. Zonas (A) amorfas, (B) semicristalinas y (C) cristalinas en el PET.	15
Figura 3. Espectro de calorimetría diferencial de barrido (DSC) del PET.	18
Figura 4. Espectro de FT-IR del PET y señales características.	20
Figura 5. Proyecciones de Newman de las configuraciones Trans y Gauche del etilenglicol de acuerdo con las microestructuras RAF y MAF respectivamente presentes en el PET.	21
Figura 6. Unidades estructurales de algunos poliésteres.	22
Figura 7. Tratamientos para el reciclaje del PET.	24
Figura 8. Mecanismo general de biodegradación de plásticos a través de la acción de microorganismos bajo condiciones aerobias.	25
Figura 9. Unidad estructural de la cutina.	25
Figura 10. Plegamiento α/β de la cutinasa de <i>F. solani</i> f. sp. <i>pisi</i>	27
Figura 11. Mecanismo catalítico de las serín hidrolasas.	28
Figura 12. Mapa del vector pPICZ α	35
Figura 13. Diagrama de bloques mostrando las etapas en la hidrólisis biotecnológica de PET y el fenómeno multivariable considerando los tres pilares primordiales: sustrato, enzima y medio de reacción.	35
Figura 14. Antecedentes de la degradación del PET con ANCUT 1 dentro del grupo de trabajo.	42
Figura 15. Producción de ftalatos en la hidrólisis de PET-GF por ANCUT 1 en función del tipo de amortiguador.	58
Figura 16. Producción de ftalatos en la hidrólisis de PET-GF por ANCUT 1 en función de la concentración de amortiguador.	59
Figura 17. Superficie de PET y modificación enzimática	30
Figura 18. Producción de ftalatos en la hidrólisis de PET-GF por ANCUT 1 en función de la proporción de sustrato en reacción.	61
Figura 19. Producción de ftalatos en la hidrólisis de PET-GF por ANCUT 1 en función de la proporción de enzima en reacción.	62
Figura 20. Producción de monómeros (TPA y MHET) en la hidrólisis de PET-GF por ANCUT 1 a 50°C sin iones, en función de la agitación.	64
Figura 21. Concentraciones de Ftalatos producidos en función de la temperatura de reacción (40, 50 y 60 °C) y la presencia de iones (Na ⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺) en concentraciones de 25 mM en Tris-HCl 50 mM.	66
Figura 22. Cromatopla de sílica gel sobre base de aluminio para la identificación de los monómeros producidos.	68
Figura 23. Avance de reacción en la producción de ftalatos durante la hidrólisis de PET-GF por ANCUT 1 en función del tiempo.	71
Figura 24. Señales de interés en la caracterización del PET en presentación de Botella (PET-PC), Biaxial (PET-BA) y Amorfo (PET-GF).	73
Figura 25. Distribución de las microestructuras del PET.	75
Figura 26. Representación de la zona del PET susceptible a hidrólisis por ANCUT 1.	77
Figura 27. Diagramas de DSC del PET pretratado térmicamente.	78
Figura 28. Porcentajes de las fracciones RAF, MAF y %Cri del material tratado térmicamente y de PET cristalino y amorfo de referencia.	79
Figura 29. Perfil de la cristalinidad y microestructuras de las presentaciones evaluadas de PET antes y después de la crio-molienda.	80
Figura 30. Producción de ftalatos en la hidrólisis por ANCUT 1 de PET en láminas y molido. Absorbancia a 241 nm y % Cristalinidad.	82
Figura 31. Producción de ftalatos en la hidrólisis por ANCUT 1 de PET en láminas y molido. Absorbancia vs HPLC-RP.	83

Figura 32. Cromatogramas de la producción de ftalatos en la hidrólisis por ANCUT 1 del de PET pretratado.	84
Figura 33. Metodología para la producción de glicerol y extracto enzimático.	95
Figura 34. Curva de calibración para la cuantificación de proteína por el método Bradford.	96
Figura 35. Termograma DSC del PET-GF.....	97
Figura 36. Espectros ATR FT-IR de muestras de PET-GF y PET-PC junto con la desconvolución	98
Figura 37. Representación del acomodo de las cadenas de PET en el espacio.	99
Figura 38. Espectro de RMN 1H del producto MHET.	99
Figura 39. Espectro ATR FT-IR del intermediario MHET.	100
Figura 40. Cromatograma del intermediario MHET.	100
Figura 41. Estrategia en la determinación semicuantitativa de TPA por densitometría	101
Figura 42. Curva de calibración para la cuantificación de TPA por densitometría.	101
Figura 43. Resultados de la elución del medio de reacción en TLC de algunas muestras por densitometría.....	102
Figura 44. Barridos espectrales de los monómeros de referencia TPA, MHET y BHET.....	103
Figura 45. Curva de calibración usando TPA como estándar para la cuantificación de monómeros obtenidos en la hidrólisis de PET por absorbancia a 241 nm.	104
Figura 46. Cromatogramas de RP-HPLC-DAD obtenidos para los estándares individuales y su mezcla	105
Figura 47. Resultados de RP-HPLC en la hidrólisis enzimática de PET antes y después del pretratamiento térmico y mecánico.	106
Figura 48. Curva de calibración usando TPA como estándar externo para la cuantificación de monómeros en HPLC.....	107

Abreviaturas

% Cri: porcentaje de cristalinidad

AcOEt: acetato de etilo.

ATR-FTIR: Attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy / espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier acoplada a reflectancia total atenuada.

BHET: Bis(2-hidroxietil) tereftalato.

CALB: Lipasa B de *Candida albicans* inmovilizada.

CHCl₃: Cloroformo.

DSC: Differential scanning calorimetry, calorimetría diferencial de barrido.

EG: Etilenglicol

Gly-NaOH: sistema amortiguador glicina/hidróxido de sodio

HCl: ácido clorhídrico

HEPES: sistema amortiguador Ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanosulfónico).

MAF: fase amorfa rígida

MeOH: Metanol.

MHET: Mono hidroxietil tereftalato.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$: sistema amortiguador fosfato de sodio dibásico/fosfato de sodio monobásico

$\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$: sistema amortiguador bicarbonato de sodio/carbonato de sodio

NaOH: Hidróxido de sodio

PET: tereftalato de poli(etileno)

PET-1A: tereftalato de poli(etileno) de primera molido finamente proveniente de empresa de reciclaje.

PET-3A: tereftalato de poli(etileno) de tercera molido proveniente de empresa de reciclaje.

PET-GF: tereftalato de poli(etileno) de referencia distribuido por la empresa Goodfellow[®]

PET-PC: tereftalato de poli(etileno) post-consumo (botellas de agua embotellada)

p-NPB: para-nitro fenil butirato

RAF: fase amorfa móvil

R_f: Factor de retención

RMN-¹H: Resonancia magnética nuclear de protones.

RP-HPLC: Reverse fase high performance liquid chromatography, cromatografía de líquidos de alto rendimiento en fase reversa.

T_g: glass transition temperature, temperatura de transición vítrea.

TLC: Thin layer chromatography, cromatografía en capa fina.

TPA: Ácido tereftálico

Tris-HCl: sistema amortiguador tris(hidroximetil)aminometano/ácido clorhídrico

1 Resumen.

El presente proyecto se centra en la hidrólisis enzimática del tereftalato de poli(etileno) (PET) utilizando la cutinasa ANCUT 1 recombinante proveniente de *Aspergillus nidulans*, con el objetivo de determinar las mejores condiciones de reacción, identificar y cuantificar los productos resultantes, y evaluar el impacto del pretratamiento termo-mecánico sobre la estructura y degradación del PET. Se evaluaron variables como tipo y concentración de amortiguador, proporción de sustrato y enzima, agitación y temperatura, encontrándose que las mejores condiciones para la hidrólisis fueron amortiguador Tris-HCl a 50 mM, pH 9, 800 rpm, 200 mg PET y una concentración enzimática de 10,000 U/mL en 1 mL de reacción. Los principales productos identificados fueron TPA, MHET y BHET. ANCUT 1 presentó inhibición por la acumulación del MHET. Por otro lado, se identificaron compuestos en RP-HPLC en tiempos de retención superiores a los monómeros de referencia, indicativo de la posible formación de oligómeros.

Se determinó que la fracción MAF del PET, con una cristalinidad baja (6-12%), es la más susceptible a la hidrólisis enzimática por ANCUT 1, lo que resultó en una mayor producción de monómeros. El pretratamiento térmico aplicado al PET post consumo redujo su cristalinidad en un 71%, aumentando la fracción MAF en un 11% respecto al PET de referencia con baja cristalinidad, lo que favoreció la degradación. Asimismo, la crio-molienda mejoró la eficiencia de hidrólisis del PET en polvo respecto a la lograda con el PET en lámina, PET de botellas (~200 veces), PET de botellas con tratamiento térmico (~4 veces) y PET de referencia (~3 veces).

Esta investigación aporta avances relevantes en el campo de la degradación y reciclaje enzimático del PET, promoviendo métodos más sostenibles para la gestión de residuos plásticos.

2 Marco Teórico.

2.1 Tereftalato de poli(etileno) (PET).

El PET (Figura 1) es un poliéster aromático sintético derivado del petróleo. Se clasifica como un termoplástico semi cristalino conformado por las unidades estructurales: etilenglicol (EG) y tereftalato de dimetilo (DMT), o EG y ácido tereftálico (TPA). Al condensarse los monómeros es formado el enlace éster, eliminándose metanol o agua, respectivamente.

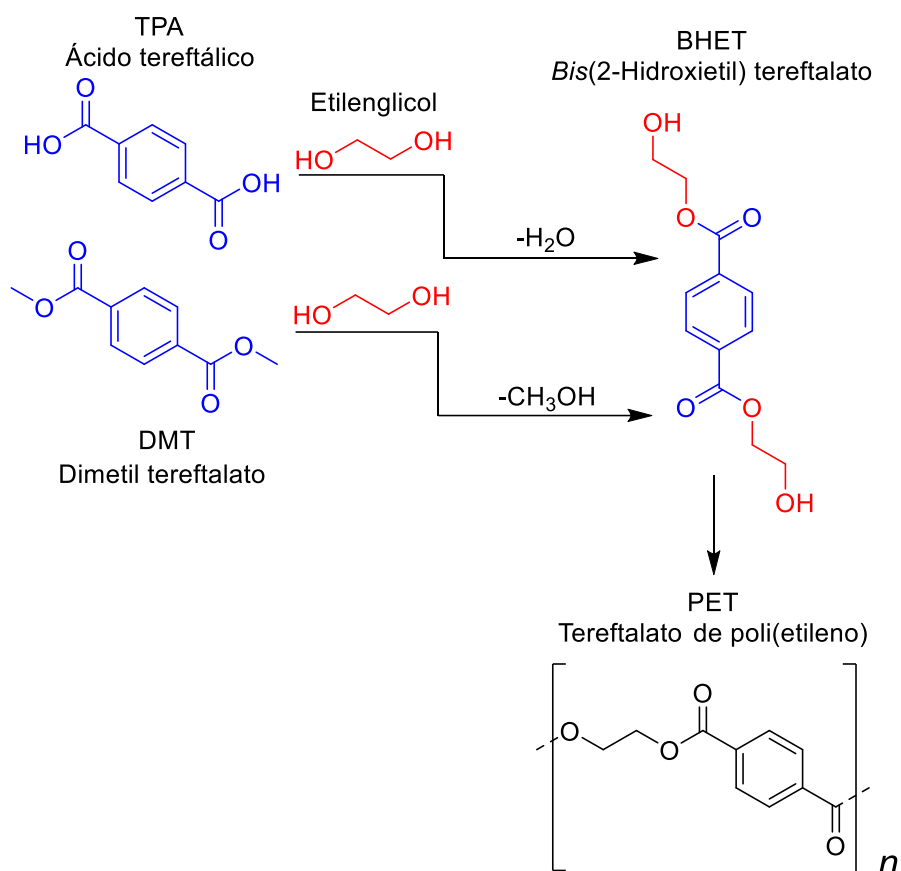


Figura 1. Reacciones para la síntesis de PET partiendo de los monómeros TPA y DMT. Elaboración propia.

Los termoplásticos pueden ser moldeados a través de procesos termo-mecánicos, constituyendo estos la mayor proporción con fines comerciales. Generalmente, los termoplásticos no cristalizan a fase sólida fácilmente a través de enfriamiento, esto por la alta viscosidad, pues es necesario el ordenamiento de las macromoléculas que se encuentran altamente enredadas en estado líquido. Las zonas que sí cristalizan no forman materiales perfectamente cristalinos, sino materiales semi

cristalinos con dos regiones, cristalinas y amorfas (Figura 2). Al ser sometido el PET al proceso de moldeado termo-mecánico se lleva a cabo un cambio en el historial térmico del material, resultando así perfiles de cristalinidad y microestructuras distintas al material de partida. Este proceso de reciclaje del PET tiene limitantes, entre estas un número limitado de ciclos de reciclaje, pues las propiedades mecánicas del material pueden debilitarse, como la fuerza tensil y la de impacto (Rosli y Ahmad, 2021). Al incrementar el número de ciclos las cadenas del polímero se rompen, disminuye el peso molecular, lo que reduce la resistencia a la tracción, así como también disminuye la capacidad de barrera, lo que permite la permeación de gases y la claridad del material que son inconvenientes para aplicaciones en contenedores de grado alimenticio, en particular para bebidas embotelladas (Damayanti & Wu, 2021, Jang, Sadeghi & Seo, 2022).

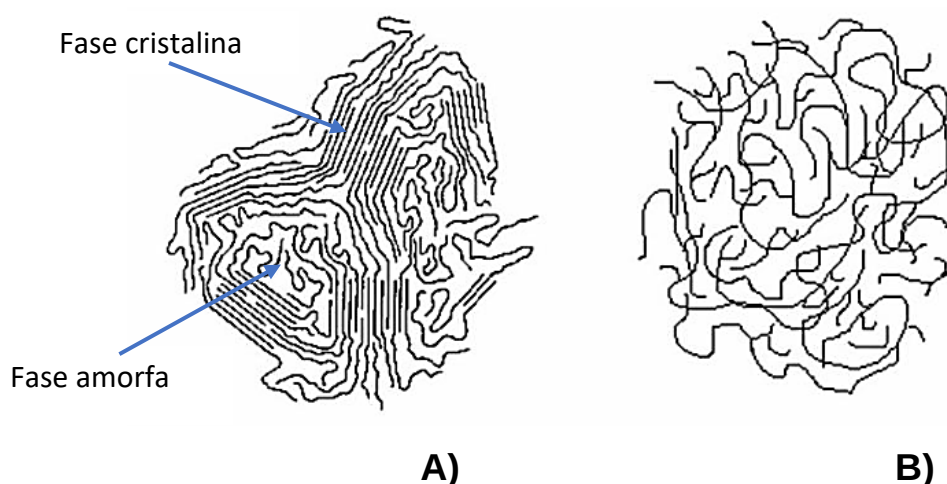


Figura 2. A) material semicristalino, B) material amorfo. Modificado de Armas, F. (2014).

Las fases cristalinas de estos polímeros son caracterizadas por su temperatura de fusión (T_m) por encima de la cual los polímeros pueden ser convertidos en artefactos por técnicas convencionales de procesamiento de polímeros como extrusión, moldeado por inyección y moldeado por compresión (López, 2004).

2.2 Propiedades del PET.

Algunas de las propiedades que caracterizan al PET como polímero son su temperatura de transición vítrea (T_g), su temperatura de fusión (T_m) y el grado de cristalinidad (% Cri). Este material cuenta con una T_g reportada de 80 °C, sin embargo, medida en agua alcanza alrededor de los 60 °C (Tabla 1). Durante la transición vítrea, el material duro y sólido pasa a ser un material más blando, predominando regiones amorfas del material. La T_m del PET (Tabla 1) es un parámetro de identificación al compararlo con otros plásticos y se ven involucradas las regiones cristalinas. La cristalinidad del PET va en relación con el uso final que tendrá el material. En el caso del presente proyecto, se tiene reportada una cristalinidad del 0-20 % (Müller *et al.*, 2005; Ronkvist *et al.*, 2009; Lu, H., *et al.*, 2022; Sonnendecker *et al.*, 2022) para PET amorfo (PET-GF) y del 30-37 % (Ronkvist *et al.*, 2009, Lu, H., *et al.*, 2022) para botellas (PET-PC, posconsumo). A botellas de PET-PC se les ha determinado el % Cri por secciones y se ha encontrado un perfil variable, que va de 1.2 % y 11.7 % (cuello y base respectivamente) hasta 33.8 % (cuerpo) (Lu, H., *et al.*, 2022).

Tabla 1. Propiedades del PET.

Propiedad	Valor reportado	Referencia
T_g	70-80 °C	Lu, H., <i>et al.</i> , 2022
	60-65 °C (en solución).	Demirel, B., <i>et al.</i> , 2011
T_m	250-260 °C	Farah, S., 2015
		Demirel, B., <i>et al.</i> , 2011
%Cri	35 % (botellas)	Lu, H., <i>et al.</i> , 2022
	0-20 % (Ic-PET, Googfellow®)	

2.3 Calorimetría Diferencial de Barrido y Espectroscopía de infrarrojo para caracterizar PET.

La caracterización del PET puede llevarse a cabo por múltiples técnicas con la finalidad de determinar las propiedades y estructura del material. Dentro de estas encontramos la calorimetría diferencial de barrido (DSC, por siglas en inglés) y la espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier por reflectancia total atenuada (ATR-FTIR, por siglas en inglés).

La DSC es una técnica que mide el flujo de calor absorbido o emitido entre una muestra y una referencia durante el calentamiento o enfriamiento en un rango de temperatura y tiempo definidos. La DSC da como resultado una representación gráfica que permite identificar transiciones de segundo orden como la transición vítrea y de primer orden como la fusión y la cristalización. En la Figura 3 se presenta un termograma característico del PET del cual se puede obtener información como la temperatura de transición vítrea (T_g), la temperatura de fusión (T_m), la entalpía de fusión (ΔH_m), la temperatura de cristalización (T_c) y la entalpía de cristalización (ΔH_{cc}). Estos datos sirven como componentes para determinar el grado de cristalinidad del material analizado como se indica en la Ecuación 1 (Thombson, *et al.*, 2022).

$$\%Cri = \frac{\Delta H_m - \Delta H_{cc}}{\Delta H_m^0} * 100 \quad \dots \text{ (Ecuación 1)}$$

ΔH_m : entalpía de fusión de la muestra (Jg^{-1}). ΔH_{cc} : Entalpía de cristalización (Jg^{-1}). Ambos valores son obtenidos del termograma a partir de la integral del área bajo la curva. ΔH_m^0 : entalpía de fusión (140.10 Jg^{-1}) de una muestra de PET 100% cristalino (Kawai, F., *et al.*, 2022, Vertommen, 2005).

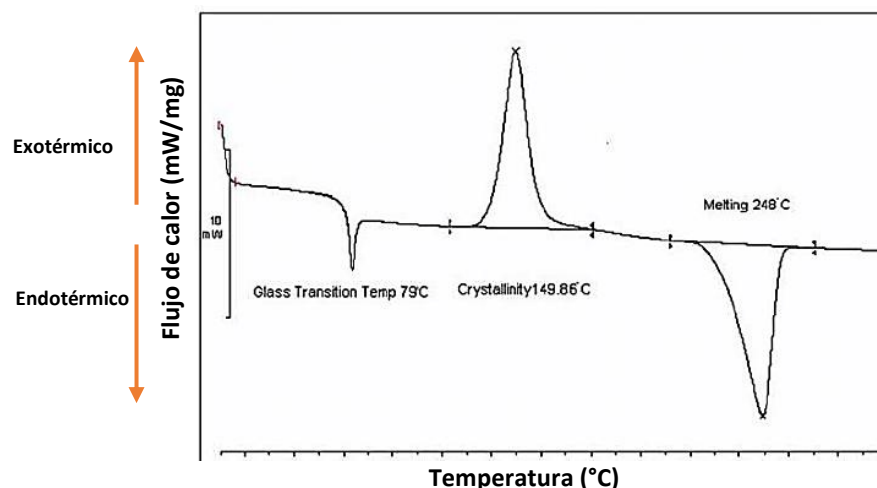


Figura 3. Espectro de DSC del PET. Imagen tomada de Demirel, B., et al., 2011.

En esta técnica se puede hacer uso de uno a varios ciclos de calentamiento-enfriamiento que permiten obtener información sobre determinadas características de una muestra: Temperatura de transición vítrea, temperatura de fusión, entalpía de fusión o cristalización, porcentaje de cristalinidad, calor específico, pureza, entre otros. El primer ciclo de calentamiento que se realiza se enfoca en conocer el historial térmico del material. Este historial térmico involucra proceso de producción del material o el envejecimiento del material por las condiciones de almacenamiento. Un segundo ciclo de calentamiento-enfriamiento o más permite conocer otras características de la muestra, siendo necesario borrar su historial térmico para obtener resultados precisos y reproducibles. El borrado del historial térmico en DSC se refiere a la eliminación de cualquier efecto térmico previo que pueda haber afectado a la muestra.

Para realizar el “borrado” de historial térmico, generalmente procede como se enlista a continuación:

Calentamiento Inicial: Se recomienda calentar la muestra en un primer ciclo 10°C por arriba de la Tg. Por lo general si esto no se hace, en un gráfico de flujo de calor vs temperatura, se obtiene una señal similar a un pico endotérmico el cual es conocido como recuperación endotérmica relacionada con el alineamiento de las cadenas del polímero PET y que al calentar sucede un efecto de relajación molecular de las cadenas del polímero.

Enfriamiento Controlado: Después del calentamiento, la muestra se enfría de manera controlada para asegurar que cualquier estructura térmica previa haya sido eliminada.

Recalentamiento: La muestra se vuelve a calentar de acuerdo con el rango de temperatura del análisis.

La ATR-FTIR se ha transformado en una técnica estándar para la obtención de espectros infrarrojo (IR). La luz infrarroja (IR), en múltiples longitudes de onda, atraviesa un cristal de cierto material (germanio o diamante) e interactúa con la muestra que se encuentra en contacto sobre el cristal. La técnica se fundamenta en el hecho de que las moléculas absorben la luz IR, transformándola en energía vibracional. Esta vibración es propia de la naturaleza de los distintos enlaces químicos presentes entre los átomos de la muestra (orgánica o inorgánica) a analizar. Los espectros IR se presentan como una relación entre la intensidad de energía transmitida o absorbida en función del inverso de la longitud de onda (número de onda, cm^{-1}) mostrando señales características asemejándose a una “huella digital molecular” de la muestra permitiendo identificar los grupos funcionales presentes (Peltzer y Simoneau, 2013).

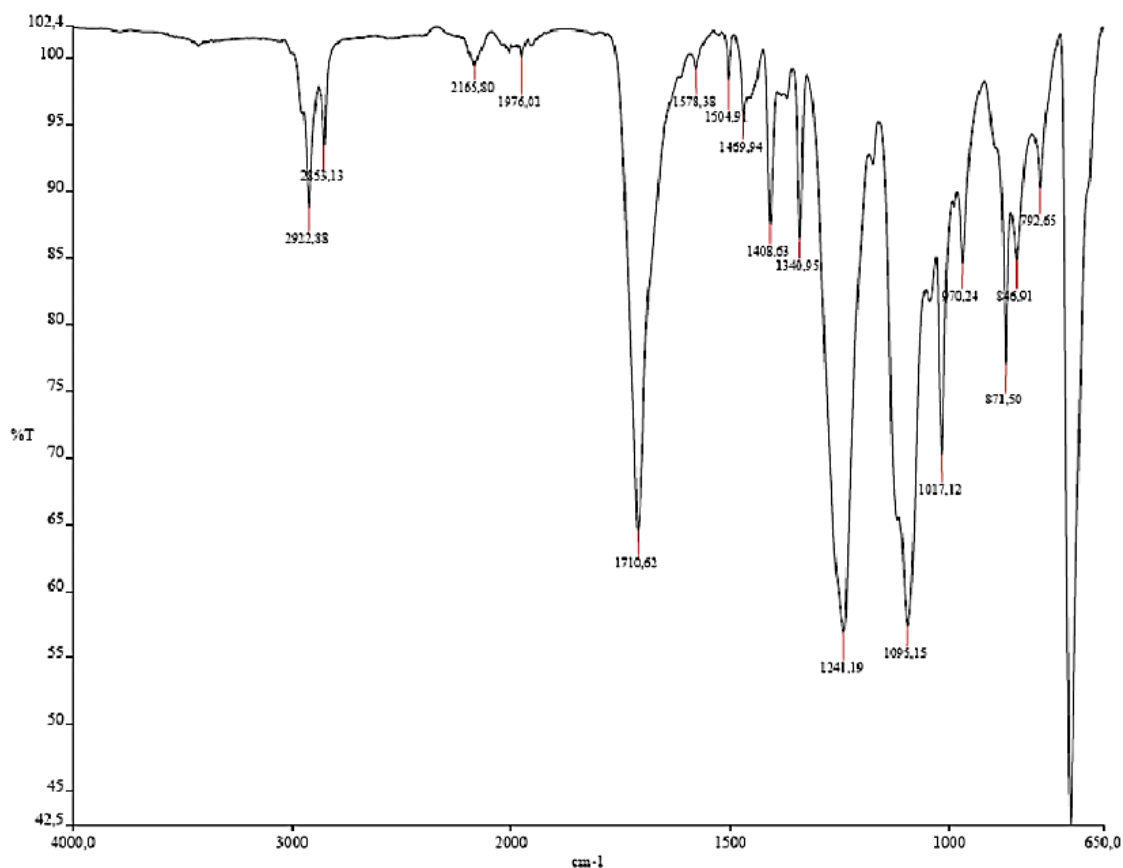


Figura 4. Espectro de FT-IR del PET y señales características. Tomado y modificado de Peltzer y Simoneau, 2013.

Tabla 2. Números de onda relacionados con la caracterización del PET a través de la técnica ATR-FTIR (Donelli et al., 2010).

Número de onda.	Asignación.
793	Flexión fuera del plano de C-H en el anillo.
898	Balaneo del CH ₂ en el glicol
973	Estiramiento del C-O en el glicol.
1018	Estiramiento C-C en el anillo.
1090	Estiramiento C-O del éster.
1240	Estiramiento C(=O)-O del éster.
1340	Estiramiento del CH ₂ en el glicol.
1370	Estiramiento del CH ₂ en el glicol.
1408	Estiramiento C-C en el anillo.

Estudios múltiples de ATR-FTIR han servido para identificar las bandas características de los grupos funcionales presentes en la molécula del PET (Tabla 2). De tal forma que la vasta información ha permitido diferenciar las

microestructuras que hay presentes en el PET dentro de su “huella digital”. Anteriormente se habló de las fases amorfa y cristalina en la compleja matriz del polímero. Ante esto, ya es bien conocida la presencia de las microestructuras denominadas zona amorfa móvil (MAF) y zona amorfa rígida (RAF) donde predominan las conformaciones *gauche* y *trans* del etilenglicol respectivamente (Figura 5). Estas conformaciones son caracterizadas por señales asociadas a las vibraciones del fragmento del etilenglicol. Zona Trans: 1471, 1341, 1123, 972, 849 cm^{-1} y zona Gauche: 1371, 1044, 898 cm^{-1} .

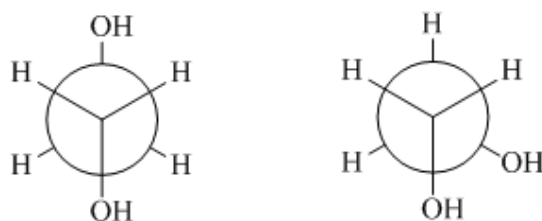


Figura 5. Proyecciones de Newman de las configuraciones Trans (izquierda) y Gauche (derecha) del etilenglicol de acuerdo con las microestructuras RAF y MAF respectivamente presentes en el PET de acuerdo con Wei, R. et al (2019).

Numerosos investigadores han proporcionado evidencia del uso de determinadas relaciones de señales en ATR-FTIR para la caracterización de microestructuras MAF y RAF, utilizando señales de referencia interna para normalizar los datos en análisis cuantitativos. Las señales más usadas como referencias internas son 790 y 1410 cm^{-1} . Estas señales, idealmente, no deben mostrar ninguna dependencia de orientación, estructura o conformación de la cadena polimérica. Además, la ubicación de la banda de referencia debe ser cercana a la frecuencia de la banda de interés. (Jain y Gupta, 1990; Walls, 1991; Smole y Zipper, 2002; Donelli, et al., 2010). Las relaciones y ecuaciones citadas por estos autores para la caracterización del PET a través de esta técnica son presentadas a continuación.

$A = 2 - \log (\%T)$, siendo T la transmitancia. ... (Ecuación 2)

Fracción trans_{total} (Cri + RAF): $\frac{A_{973}}{A_{793}}$... (Ecuación 3)

Fracción gauche (MAF): $\frac{A_{898}}{A_{793}}$... (Ecuación 4)

2.4 Plásticos.

Los plásticos incluyen a varios grupos químicos, entre ellos los denominados poliésteres, polímeros que contienen el grupo funcional éster como unión entre sus monómeros, o mejor conocidos como plásticos (el PET, PBS, PLA y PCL por mencionar algunos, Figura 6). A pesar de haber facilitado la vida diaria por su gran maleabilidad, resistencia, ligereza, así como otras propiedades, se ha convertido en una fuerte problemática ambiental debido al incremento constante en su demanda. Con la producción comprendida alrededor de 65 millones de toneladas métricas anuales, el PET se sitúa como el segundo plástico más producido a nivel mundial (Shah *et al*, 2008, Ellis *et al*, 2021).

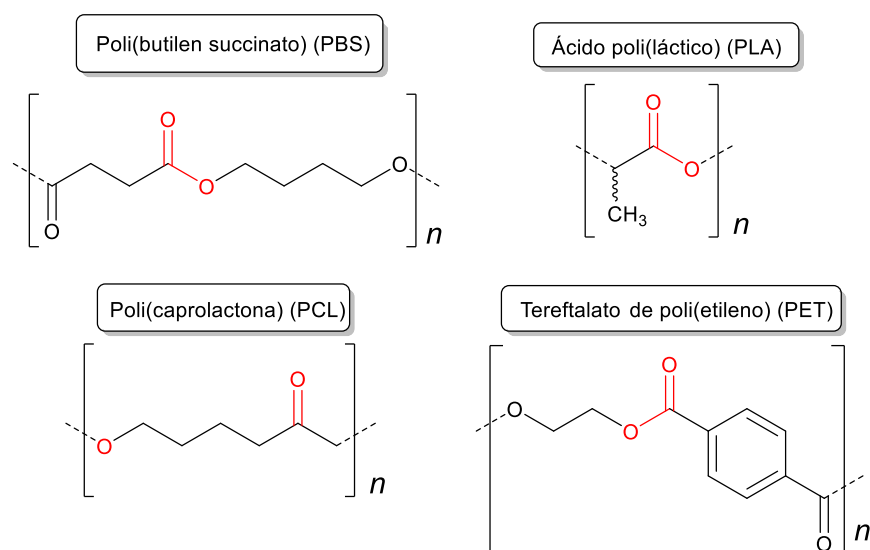


Figura 6. Unidades estructurales de algunos poliésteres. Elaboración propia.

Basado en estimaciones realizadas por la ONU, cada año se hace uso de 500 mil millones de bolsas de plástico a nivel mundial, siendo esta última década la de mayor producción de plásticos. Poniéndolo en números, de 1950 a 2015, fueron producidos 8300 millones de toneladas métricas de plásticos vírgenes mundialmente y se estima que la demanda continúe siendo incluso duplicado o triplicado este valor para el 2030. Aunado a esto, los plásticos de un solo uso representan el 50 % de los producidos al año. En el 2018, el estimado de residuos plásticos generados fue de 2010 millones de toneladas métricas, siendo reciclados el 9 %, incinerados un 12 % y el 79 % de los residuos terminaron acumulados en

vertederos, rellenos sanitarios o en el ambiente (Kaza *et al.*, 2018). Además, como consecuencia de la pandemia por COVID-19 y dentro de sus muchas implicaciones, se tuvo un incremento considerable en cuanto a la generación y consumo de plásticos (S&P Global, 2021).

En contexto nacional, el Programa De Gestión Integral De Residuos Para La Ciudad De México calcula que el año 2019 se tuvo una producción de 13149 ton/día de residuos sólidos urbanos (RSU) (1.40 kg/hab/día) representando los desechos de plásticos el 13.21 %, y de este porcentaje entre el 2.8 al 5.44 % el PET (SEDEMA, 2021). Dicho esto, México es uno de los principales consumidores de refrescos y agua embotellada en el mundo. Tan solo en el 2009, se tuvo el estimado de un consumo de 790,000 toneladas de PET en México, siendo 552,140 toneladas destinadas a la fabricación de botellas no retornables para distintos consumibles.

2.5 Estrategias en la degradación de plásticos.

Debido a la descomunal acumulación que vivimos hoy en día en cuanto a residuos plásticos, se han puesto los ojos en la logística para su recolección y tratamiento. Sin embargo, este es un tema complejo que involucra tanto al gobierno, la sociedad y la industria.

La acumulación de plásticos en el planeta (vertederos o ecosistemas) ha forzado la implementación de esfuerzos en el aprovechamiento de estos residuos a través de técnicas de reciclaje (Khairul Anuar *et al*, 2022; Kushwaha, A. *et al*, 2023). Dentro de los principales tratamientos para su disposición se encuentran el químico y la incineración (Figura 7). El método químico conlleva el uso de ácidos o bases fuertes, disolventes, catalizadores y condiciones extremas para favorecer la hidrólisis del polímero y aprovechar los monómeros u oligómeros en la generación de nuevos materiales. La incineración conlleva a la producción significativa de gases de efecto invernadero, como el dióxido de carbono, favoreciendo el calentamiento global. El procesamiento térmico de los termoplásticos para la producción de nuevos productos (textiles, contenedores, etc.) basados en este material es factible, sin embargo, los nuevos productos poseen una calidad inferior. Ante esto, la biocatálisis se ve como una tecnología ambiciosa y prometedora en la hidrólisis de polímeros sintéticos. La

premisa es llevar a cabo la hidrólisis del material hasta los monómeros (EG y TPA) con las ventajas de disminuir las condiciones extremas de reacción, reducir el consumo energético, disminuir el uso de sustancias tóxicas y producir los monómeros de partida para la formación de una resina virgen con la cual formar nuevamente PET de alta calidad.

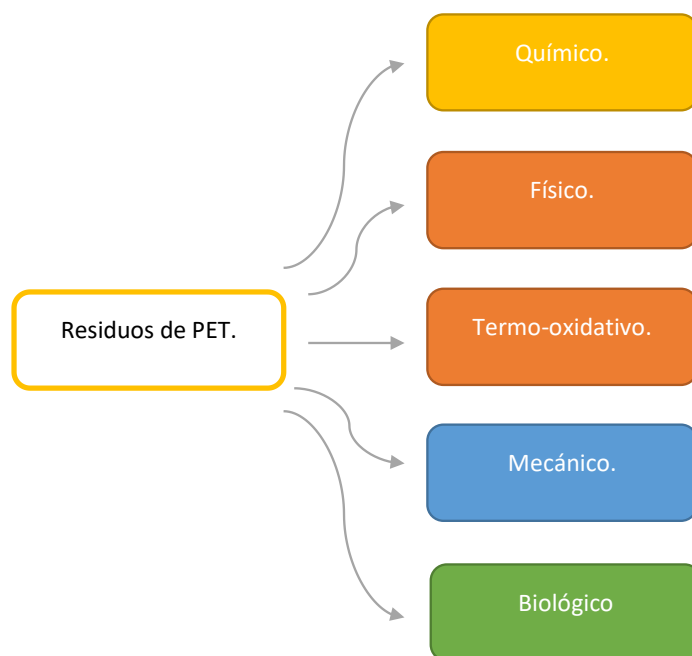


Figura 7. Tratamientos de reciclaje del PET de acuerdo con Kushwaha, A. et al, 2023 y Khairul Anuar et al, 2022.

La biodegradación de polímeros ha estado en auge durante los últimos años. La degradación con el uso de microorganismos es un proceso que requiere la secreción de enzimas extracelulares que despolimericen los poliésteres fuera de la célula produciendo moléculas más pequeñas (monómeros, dímeros, oligómeros) y posteriormente ser transportados hacia el microorganismo para metabolizarlos y utilizarlos en la generación de biomasa y productos como dióxido de carbono, agua, metano, etc (Figura 8). El objetivo entonces es hacer uso de los microorganismos, o bien las enzimas responsables de la capacidad de estos en la degradación del PET.

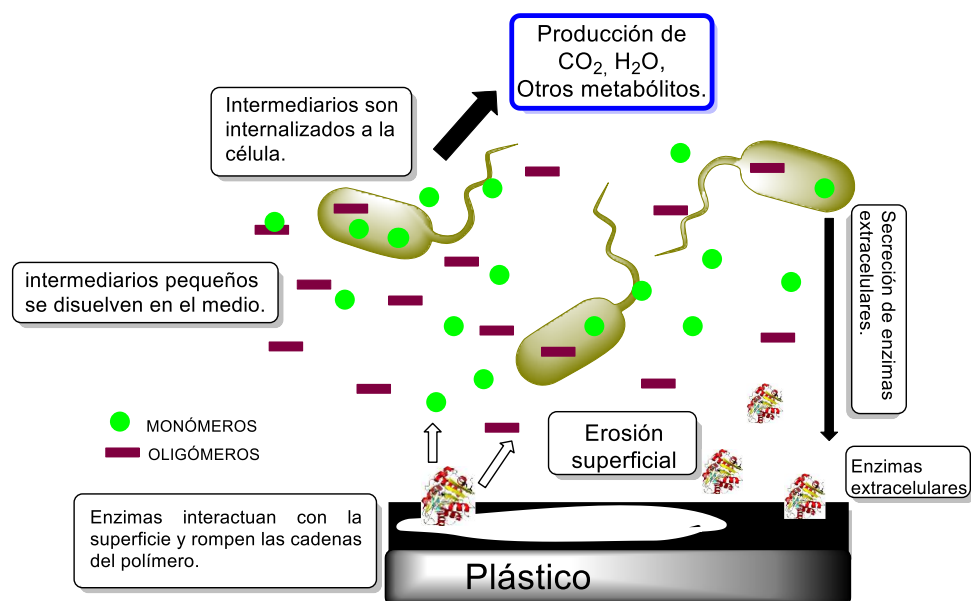


Figura 8. Mecanismo general de biodegradación de plásticos a través de la acción de microorganismos bajo condiciones aerobias. Se muestra la secreción de enzimas que son necesaria para la hidrólisis del poliéster y su posterior internalización en el microorganismo para su metabolismo. Adaptado de Müller, 2005.

Limitantes en este proceso son la baja afinidad de las enzimas por el sustrato, su tamaño y la estructura semi cristalina del plástico. Sin embargo, enzimas extracelulares como las cutinasas secretadas por hongos como *Aspergillus nidulans*, al poder degradar la cutina (biopolímero complejo compuesto por ácidos grasos esterificados, Figura 9), son candidatas para la degradación de residuos de PET al reconocer los enlaces éster con la diferencia de la presencia de los grupos fenilo.

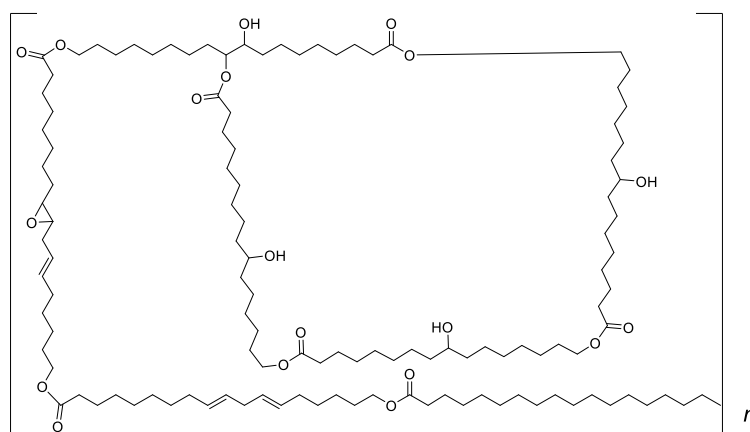


Figura 9. Unidad estructural de la cutina. Cadenas de ácidos grasos con longitudes entre 14 a 18 carbonos esterificadas que pueden llegar a estar epoxidadas. Adaptado de Kolattukudy et al, 1980.

2.6 Aplicaciones de los monómeros del PET.

Cualquiera que se la vía de degradación del PET, todas comparten algo en común: la obtención de los monómeros. La importancia recae en el aprovechamiento de estos en la producción de nuevas resinas vírgenes para la producción de materiales o en la síntesis de derivados de interés en múltiples áreas, como la textil, médica o investigación (Tabla 3).

Tabla 3. Algunos ejemplos de aplicaciones de los monómeros del PET.

Monómero	Producto	Área de aplicación	Referencia
TPA	Botellas de PET	Alimentos y bebidas	Tournier <i>et al.</i> , 2020
TPA	Colorantes	Textil	Fahim <i>et al.</i> , 2019
BHET/MHET	Hidrazona macrocíclica	Médica	Fahim <i>et al.</i> , 2019
MHET	Compuesto de referencia	Investigación	de Queiros Eugenio <i>et al.</i> , 2022b
TPA	ditioamidas del ácido tereftálico	Médica	Bak <i>et al.</i> , 2023
PET/TPA	Plastificante (diisooctil tereftalato, DOTP)	Materiales	Cao <i>et al.</i> , 2022

2.7 Cutinasas.

Algunos microorganismos, principalmente hongos filamentosos y bacterias, tienen la capacidad de llevar a cabo la hidrólisis de la cutina (componente estructural en la cutícula de plantas) por medio de enzimas denominadas cutinasas (E.C 3.1.1.74). Estas enzimas pertenecen a la superfamilia de las α/β hidrolasas (Figura 10). Suelen tener un peso molecular comprendido entre los 20 - 60 kDa. La arquitectura del sitio activo de las cutinasas está compuesta por la clásica triada catalítica de los aminoácidos Ser-Asp/Glu-His, igual que las esterasas, lipasas y carboxilesterasa (Fontes y Alves, 2009). La triada catalítica Ser-Asp-His, es accesible al disolvente y está localizada la superficie de la proteína. Ahora bien, la actividad catalítica procede en una cavidad oxianiónica que permite la estabilización del sustrato

posterior al ataque de la serina. El mecanismo de hidrólisis (Figura 11) se basa en el residuo de His funcionando como una base y el oxígeno de Ser es quien realiza el ataque nucleofílico al carbonilo del enlace éster del sustrato, como resultado se forma el intermediario tetraédrico, estabilizado por medio de puentes de hidrógeno que se forman con los residuos de la cavidad oxianiónica. La histidina sigue actuando como base y provoca la ruptura del enlace éster causando la liberación de un alcohol y la formación de la enzima acilada. Esta última se hidroliza y se generan el ácido graso y la enzima libre (Neves-Petersen *et al.*, 2001).

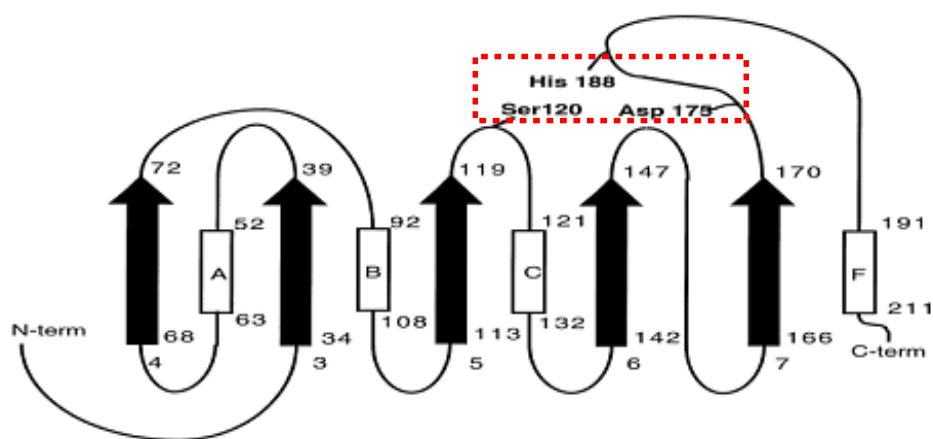


Figura 10. Plegamiento α/β de la cutinasa de *F. solani* f. sp. pisi. Se muestra la triada catalítica en el sitio activo rodeado por las líneas rojas punteadas (Ser120-Asp175-His 188). Cadenas β (flechas negras), hélices α (rectángulos blancos marcados de la A - F) Tomado de Egmond y de Vlieg, 2000.

Cabe mencionar que las cutinasas tienen la capacidad de hidrolizar otros sustratos distintos a la cutina, entre estos: ésteres, polímeros sintéticos o naturales. (Liang y Zou *et al*, 2022).

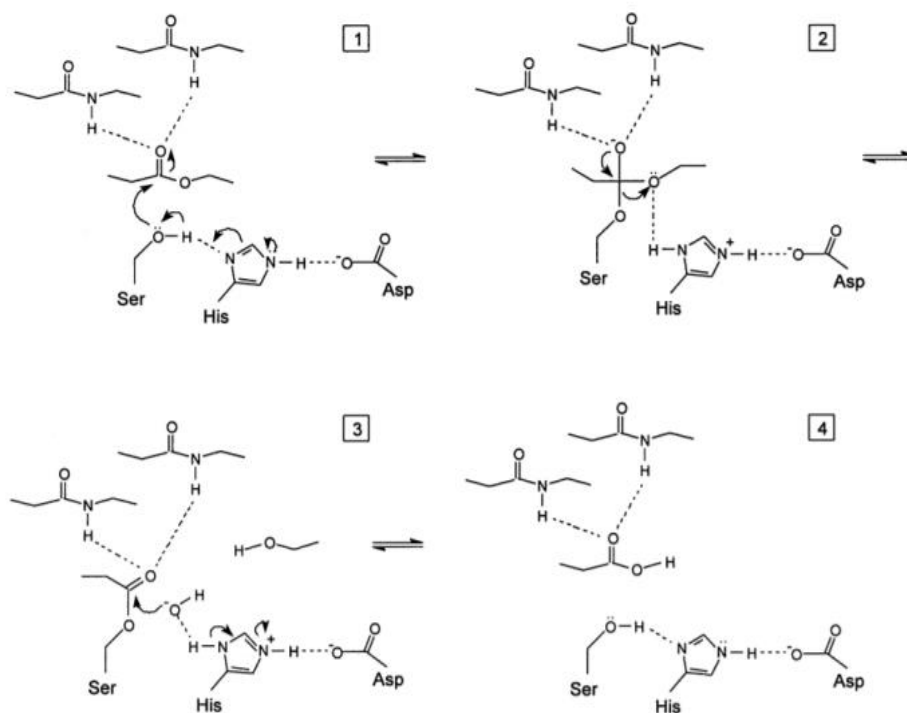


Figura 11. Mecanismo catalítico de las serín hidrolasas. Figura tomada de Jaeger et al., 1999.

2.8 Cutinasas en la degradación de PET.

En la bibliografía se tienen reportadas cutinasas capaces de llevar a cabo la hidrólisis del PET (Tabla 4). Müller *et al.* en el 2005 observó el fenómeno de hidrólisis del PET por primera ocasión. La estrategia se basó en poner a reaccionar la enzima de *Thermobifida fusca* con PET comercial, llevando a cabo un recambio de enzima cada semana.

Al observar la considerable pérdida de peso se continuaron estudios donde se plantearon modificaciones de las hidrolasas producidas por *Thermobifida fusca* DSM43793. Mientras pasaron los años la investigación dirigió su atención a las cutinasas, observando un mayor potencial en la hidrólisis de poliésteres. Múltiples estrategias han dado pie a obtener mejora en la degradación del PET, pero no se ha enfocado a poder hidrolizar este material con una elevada cristalinidad, tal es el caso de Ronkvist *et al.*, 2009 quienes pudieron degradar prácticamente todo el PET con cristalinidad del 7 ± 0.5 %, pero sin poder detectar la degradación de aquel con 37 ± 0.5 % (PET biorientado, *boPET*). Las mutaciones sitio dirigidas han dado

igualmente buenos resultados en el mejoramiento de la degradación de este plástico, en ocasiones se busca inducir mejoras en cuanto a la termo estabilidad o en cuanto a la afinidad del sitio activo por el sustrato. Otra técnica que ha sido de gran utilidad es la metagenómica, muy útil en el caso de recopilar información de las enzimas de microorganismos que no pueden ser cultivados. La LCC es una cutinasa aislada a partir del metagenoma de una planta de composta, tuvo la capacidad de degradar hasta casi el 25 % de PET (Sulaiman *et al.*, 2014).

Kawai, *et al* en 2019 propuso una clasificación de las enzimas degradadoras de PET como enzimas modificadoras de superficie o hidrolasas de PET. Las primeras como lo indica el nombre son capaces de modificar únicamente la superficie del material como se observa en la Figura 12 hidrolizando las cadenas terminales o bien las asas formadas por las mismas cadenas poliméricas, por otro lado, las hidrolasas son capaces de hidrolizar el material incluso en el bloque central del PET (Figura 12).

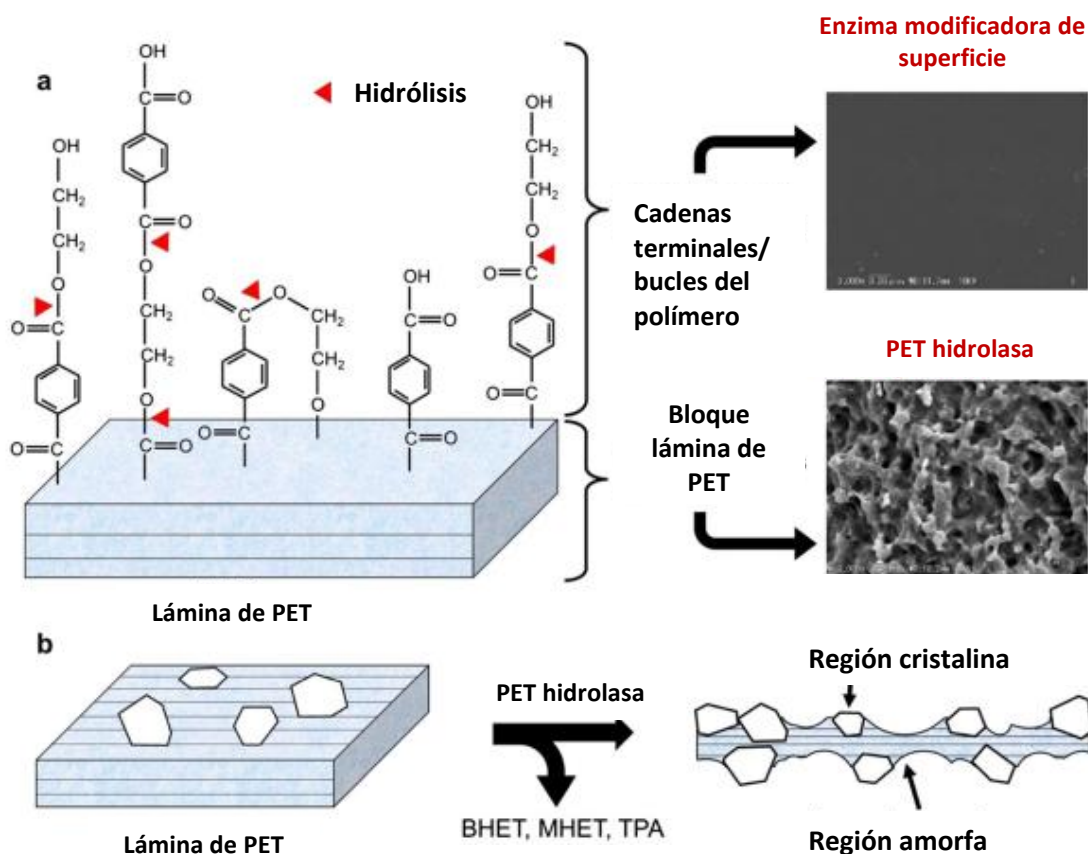


Figura 12. Superficie de PET y modificación enzimática. Representación del fenómeno de erosión superficial de una enzima modificadora de superficie atacando principalmente a cadenas que sobresalen del bloque interno del polímero (a) y de una enzima hidrolasa de PET capaz de atacar el bloque interno del polímero con preferencia a zonas de baja cristalinidad (b). Se muestran imágenes de microscopía electrónica de barrido donde se evidencian cambios estructurales del material después de reacción con ambos tipos de enzimas. Tomado y modificado de Kawai et al., (2019).

A través de ingeniería enzimática se pudo mejorar la termoestabilidad de la LCC pudiendo proceder la despolimerización a 70 °C, teniendo como resultado un grado de conversión de aproximadamente el 90 % en menos de 10 h partiendo de PET post-consumo con color (PcW-PET). En este caso se reporta que es necesario llevar a cabo un pretratamiento del PET para conseguir esos niveles de degradación (Tabla 4). Finalmente, la enzima PHL7 es una hidrolasa de poliésteres obtenida a partir de los metagenomas recolectados en distintos centros de compostaje ubicados en Leipzig, Alemania (PHL, Polyester Hydrolases Leipzig). Sonnendecker et al., 2022 lograron prácticamente un 100% en pérdida de peso del PET amorfo después de 16 h y de un envase comercial de PET en 48 h; sin embargo, hacen mención de que esta enzima no sería capaz de hidrolizar *bo*PET (PET biorientado)

debido a la elevada cristalinidad, siendo necesario aplicarle un pretratamiento para hacerlo más amorfo.

Tabla 4. Algunas cutinasas reportadas en la literatura para la hidrólisis de poliésteres.

Enzima	T (°C)	Tiempo	Pérdida de peso	Pretratamiento del PET	Cristalinidad del PET (%)	Análisis de monómeros. (Monómeros).	Ref.
TfH	55	3 sem	Aprox. 50 %	Películas de PET circulares (20-25 mg). PET sometido a fusión y presurización con prensa hidráulica. Lavados con EtOH.	9-10	---	Müller <i>et al.</i> ,2005
HiC	70	96 h	97 ± 3 % No detectada	lcPET boPET (cortado en láminas 15x15 mm)	7 35	Valoración con NaOH 10 mM RP-HPLC-UV (TPA, BHET, MHET)	Ronkvist <i>et al.</i> ,2009
LCC	50	24 h	Aprox. 25 %	Preincubado a 50°C en 1 ml de buffer 500 mM Tris-HCl (pH 8.0) durante 5 min. Pulverizado.	PET amorfo (aprox. 10)	Valoración con NaOH 50 mM. RP-HPLC (TPA, MHET)	Sulaiman <i>et al.</i> ,2014
ICCG WCCG (variantes LCC)	72	20 h	82 %*	Extrusión (265-360°C) Micronización (D90:[x<400µm]; D50:[200<x<250µm])	15	UHPLC (TPA, BHET, MHET)**	Tournier <i>et al.</i> ,2020
	72	15 h	85 %*		15		
	60	16 h	>90 %	G-PET	5 – 7		
PHL7 cutinasa		48 h	98.6 %	Recipiente completo láminas 3x3 cm (17.43 g) Lavado con SDS 0.5%, agua desionizada y EtOH 70%, secado 50°C toda la noche, láminas de 3x3 cm².	Contenedor Termoformado de PET "amorfo" No se indica.	HPLC (TPA, BHET, MHET)**	Sonnendecker <i>et al.</i> ,2022

* Se reporta no como pérdida de peso, sino como porcentaje de despolimerización basado en el consumo de NaOH. Se reportan 85.6% y 88.6% de PET residual después de la reacción en biorreactores de 500 mL.

** Reportado como TPAeq (mg_{TPAeq}*h⁻¹ mg_{enzima}⁻¹). boPET: PET biorientado. lcPET: low cristalinity low-crystallinity PET. Elaboración propia.

Como se ha visto, los estudios que abordaron la hidrólisis enfocada en la cristalinidad del sustrato han tenido resultados favorables, pero esto al tratarse de PET con un porcentaje de cristalinidad bajo (4 – 15 %). A pesar de esto, los resultados con el PET comercial de Goodfellow® de baja cristalinidad no se aproximan a los materiales encontrados en el día a día. Así entonces, se refuerza la idea de aplicar el pretratamiento adecuado a dichos residuos que permita la degradación enzimática de este plástico.

2.9 Microorganismos productores de cutinasas.

Las cutinasas son enzimas hidrolíticas cuya producción se descubrió en hongos fitopatógenos que crecían en medios donde la principal fuente de carbono era la cutina (Purdy y Kolattukudy, 1973). Las cutinasas principales que se han aislado han sido a partir de hongos fitopatógenos, sin embargo, se ha reportado la producción de cutinasas en el polen de plantas, bacterias, levaduras y por hongos no patógenos (Tabla 5). Su inducción se lleva a cabo principalmente con el uso de cutina o un hidrolizado de este, además, el aceite de oliva y alcoholes n-alifáticos también son buenos inductores. Por otro lado, la glucosa y el glicerol son ejemplos de represores en la expresión de estas enzimas (Lin y Kolattukudy, 1980).

Tabla 5. Microorganismos productores de cutinasas. Tomado y modificado de Dutta et al, 2009.

	Género	Especie	Referencia
Hongos	<i>Aspergillus</i>	<i>oryzae</i>	Maeda et al., 2002
		<i>flavus</i>	Guo et al., 1996
		<i>nidulans</i>	Castro-Ochoa et al., 2012
	<i>Fusarium</i>	<i>solani pisi</i>	Martinez et al., 1992
	<i>Humicola</i>	<i>insolens</i>	Ronqvist et al., 2009
	<i>Thermobifida</i>	<i>fusca</i>	Du et al, 2007; Chen et al., 2008
	<i>Thermobifida</i>	<i>alba</i>	Ribitsch et al., 2012
	<i>Saccharomonospora</i>	<i>viridis</i>	Kawai et al., 2014
Levaduras	<i>Pseudozyma</i>	<i>jejuensis</i>	Seo et al., 2007.
	<i>Cryptococcus</i>	<i>sp.</i>	Masaki et al., 2005.
Polen	<i>Tropaelum</i>	<i>majus</i>	Maiti et al., 1979
	<i>Brassica</i>	<i>napus</i>	Hiscock et al., 1994

2.10 Cutinasas de *Aspergillus nidulans*.

Aspergillus nidulans es utilizado como modelo biotecnológico ya que desde el año 2008 se cuenta con su genoma secuenciado por completo. Este contiene un total de 10,560 genes codificantes de los cuales 4 se han identificado como genes que codifican para distintas cutinasas (Galagan et al., 2005). En la Tabla 6 se muestra la información recabada sobre estas cuatro enzimas.

A. nidulans posee cuatro cutinasas, que responden a diferentes mecanismos de regulación, en algunos casos relacionados con el metabolismo de lípidos. Además, se ha visto que 3 de estas son usadas ampliamente durante el mecanismo de infección en plantas, y la ANCUT 4 se expresa como medida de defensa ante la respuesta de la planta al hacer frente a la infección (Bermúdez, 2020).

Tabla 6. Cutinasa identificadas en *A. nidulans*.

Gen	Nombre	No. De aa's	PM teórico (kDa)	PI	Localización celular	Localización cromosomal	Actividad	Referencia
AN5309	ANCUT 1	213	22.4	6.35	Extracelular	V	Esterasa y cutinólítica	Esqueda Domínguez, 2012; Galagan <i>et al.</i> , 2005; Bermúdez-García, 2020
AN7541	ANCUT 2	254	26.0	4.90		VI		Bauer <i>et al.</i> , 2006; Bermúdez-García, 2020
AN7180	ANCUT 3	221	23.1	5.83		IV		CastroOchoa <i>et al.</i> , 2012; Bermúdez-García, 2020
AN1034 6	ANCUT 4*	223	22.7	7.83		VI		Bastida, 2018 Bermúdez-García, 2020

*Cutinasa expresada solamente bajo ciertas condiciones de estrés.

2.11 Producción de cutinasas recombinantes de *Aspergillus nidulans*.

Aspergillus nidulans posee un patrón complejo de proteínas secretadas al medio extracelular, el cual varía dependiendo de la composición del medio de cultivo (fuente de carbono, nitrógeno, pH, T, oxígeno disuelto). Esto hace la purificación una tarea desafiante al estudiar las cuatro cutinasas nativas previamente mencionadas, las cuales suelen estar en muy baja concentración en el medio de cultivo. Además de esto, el uso de cutina para su expresión al añadirla al medio de cultivo conlleva una alta inversión económica y de tiempo. Ante esto se hace

necesario el uso de un sistema de expresión heterólogo que ofrezca la ventaja de obtener mayores cantidades de enzima.

Para poder expresar las proteínas recombinantes se debe de hacer la selección del sistema de expresión a utilizar, siempre considerando el origen de la proteína, escogiendo así entre un microorganismo eucarionte o procarionte asegurando que la enzima pueda tener un plegamiento correcto y/o alguna modificación postraducciona para desempeñar la actividad correspondiente.

Pichia pastoris (*Komagataella phaffii*) es un organismo hospedero altamente usado en la producción de proteínas recombinantes en la industria biofarmacéutica y enzimática, esto debido a su capacidad de llevar a cabo muchas de las modificaciones postraduccionales de proteínas que hacen los eucariontes superiores que incluyen plegamiento de polipéptidos, O- y N-glicosilación, metilación, fosforilación (Zhang *et al*, 2011; Brando-Campos *et al*, 2019). Como resultado, proteínas eucarióticas son procesadas correctamente y adquieren el plegamiento adecuado ofreciendo entonces proteínas funcionales. *P. pastoris* se caracteriza por un crecimiento rápido, es fácil su manipulación por vectores de clonación bien caracterizados, además no es patógena para el ser humano siendo considerada “Generalmente reconocido como seguro” (GRAS, por sus siglas en inglés).

Otro factor importante es la selección del vector de clonación. En particular el vector pPICZ α (Figura 13) es de gran utilidad en la expresión heteróloga en *P. pastoris*. Este cuenta con el promotor del gen del alcohol oxidasa (AOX1 / AOX2) lo que le permite crecer en presencia de metanol como única fuente de carbono. Cuenta con el gen para la resistencia a Zeocina. Además, contiene el factor de acoplamiento α -pre-pro de *Saccharomyces cerevisiae*. Este último permite que la proteína sea secretada al medio extracelular, igual a como lo hace *Aspergillus nidulans*. Esta es una ventaja debido a que *P. pastoris* secreta muy pocas proteínas en el medio de cultivo y por lo tanto las proteínas recombinantes de interés estarán en mayor proporción.

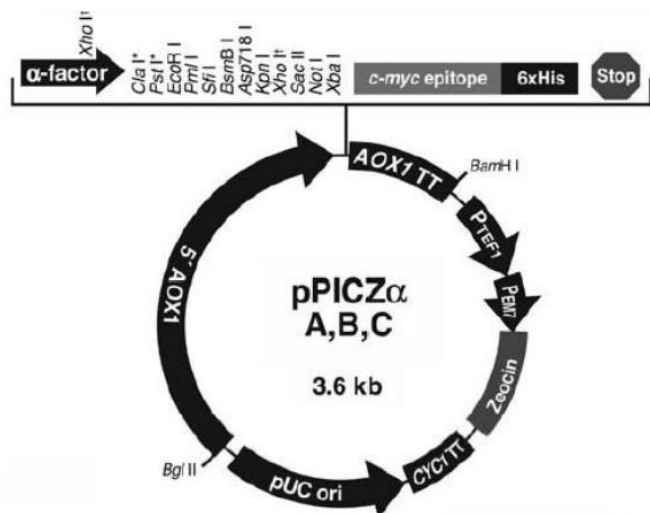


Figura 13. Mapa del vector pPICZα. (Invitrogen™).

2.12 Variables involucradas en la hidrólisis enzimática del PET.

En la hidrólisis enzimática del PET se presentan múltiples variables que pueden influir en dicho proceso. Hay que considerar que se van a presentar variables atribuibles al medio de reacción, a la enzima a utilizar y al sustrato de partida (Castro *et al*, 2023). Estos son los tres pilares primordiales para abordar en el reciclaje biotecnológico de este polímero (Figura 14).

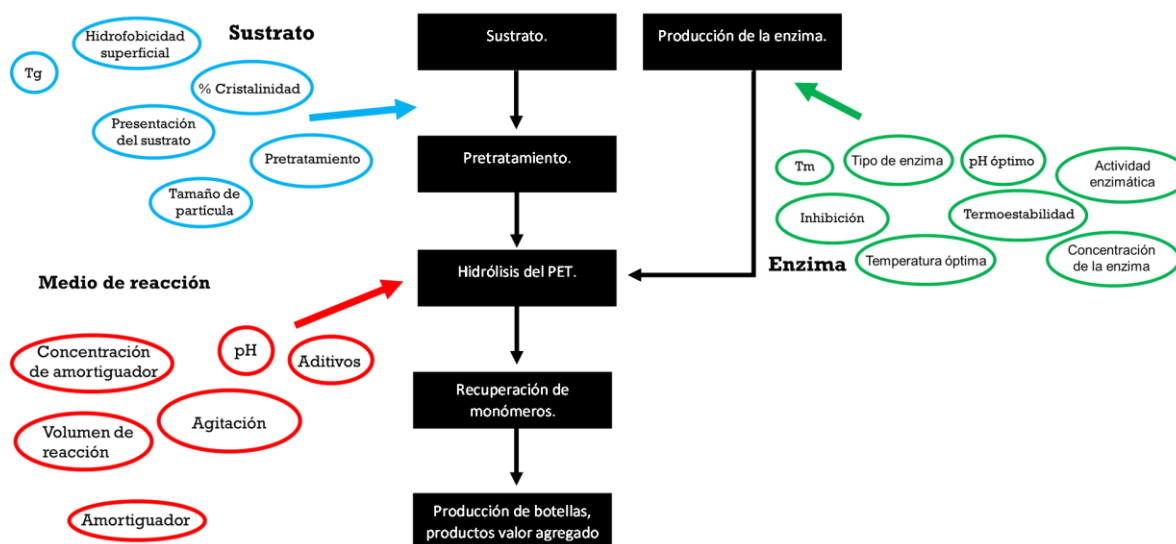


Figura 14. Diagrama de bloques mostrando las etapas en la hidrólisis biotecnológica de PET y el fenómeno multivariable considerando los tres pilares primordiales: sustrato, enzima y medio de reacción. Elaboración propia.

Se ha reportado que con la gran mayoría de las cutinasas se evidencia el fenómeno de hidrólisis del PET en materiales con una baja cristalinidad. Otra cosa que considerar es la T_g del PET y que la enzima pueda actuar cercana a esta temperatura, ya sea con el uso de aditivos (etilenglicol), presencia de iones o mutaciones en residuos de aminoácidos de la enzima (Kawai *et al*, 2014; Then *et al*, 2015; Wang *et al*, 2022). La capacidad de la enzima de trabajar cercana a la T_g ha mostrado favorecer una conformación del PET desordenada y móvil que permita la accesibilidad de la enzima a los enlaces éster. Por otro lado, trabajar a $T = T_g$ o superior induciría el incremento progresivo de la cristalinidad del PET con el paso del tiempo, lo cual es un factor negativo en la biodegradación. El sistema acuoso de la reacción debe ser capaz de amortiguar el pH y mantenerlo para que la enzima trabaje bajo el pH óptimo. Se sabe que las cutinasas en su mayoría trabajan a pH alcalino. Se han probado múltiples sistemas amortiguadores (Tris-HCl, Fosfatos, NaOH-Gly, agua alcalina, MOPS, HEPES) y varía la actividad de cutinasa a cutinasa con el uso de estos, lo que hace necesario para este trabajo saber en cuál trabaja mejor ANCUT 1 frente al PET. Otro punto es la agitación, ya que el fenómeno de adsorción-desorción está presente en este tipo de reacciones.

2.13 Estrategias analíticas para la investigación de la hidrólisis enzimática del PET.

A través de los años y con el incremento en el interés biotecnológico para el reciclaje del PET, se han propuesto técnicas cuantitativas para el seguimiento de la actividad de la enzima frente al polímero. En la Tabla 7 se enlistan algunas técnicas mencionadas por (Pirillo *et al.*, 2021).

Tabla 7. Métodos analíticos más comunes en la investigación de la degradación enzimática de PET.

Método		Principio
Potenciométrico	Potenciómetro.	Seguimiento del pH con el uso de electrodos. Disminución de pH debido a la naturaleza ácida de los monómeros.
	Ensayo titrimétrico	Uso de dispositivo para mantener el pH constante (pHstat) añadiendo ácido o base al medio. La cinética de la reacción se calcula basado en el consumo del agente neutralizante en función del tiempo.
Espectrofotométrico	Absorción en el rango de luz UV.	Medición de la absorbancia de los monómeros totales producidos en la hidrólisis del PET. Máximo de absorción entre 240-244 nm atribuible al anillo aromático. Ley de Lambert-Beer.
	Turbidimetría	Cambio en la DO_{600} en el medio conteniendo nanopartículas de PET suspendidas en solución. Disminución de la turbidez si hay actividad hidrolítica de la enzima.
	Ensayo colorimétrico	Seguimiento del cambio en el color de la solución por un indicador ácido-base (Ej. Rojo de fenol con dos picos principales de absorción a 550 y 430 nm).
	Ensayo fluorométrico	Conversión cuantitativa del producto ácido tereftálico (TPA) a ácido hidroxitereftálico (HTA) a través de una reacción de Fenton modificada. Detección midiendo fluorescencia a 421 nm (excitación a 328 nm).
	RP-HPLC	Detección y separación de los monómeros de hidrólisis del PET. Detector UV en el máximo de absorción entre 240-244 nm atribuible al anillo aromático.

2.14 Pretratamientos del PET.

La industria del reciclaje de los plásticos ha sido un negocio rentable para muchos. En este proceso se ven involucradas múltiples etapas de separación y limpieza para poder obtener los pellets de PET que se utilizarán en la producción de nuevos materiales. Entre estas etapas se ven involucrados pretratamientos que permiten resolver conflictos que involucra el reciclaje de los distintos formatos del PET que se encuentra en combinación con otros compuestos como metales, tintas o aditivos. Una revisión completa de estos pretratamientos es abordada en Kol *et al.*, 2021. Algunos son ejemplificados en la Tabla 8.

Tabla 8. Pre-tratamientos en el reciclaje de plásticos. Tomado y adaptado de Kol, *et al.*, 2021.

Tecnología	Principio		Aplicación (Nivel)	
Desodorización/ desentintado	Extracción	con acetato de etilo	Escala industrial	(Patentado).
Desentintado	Micelas	con tensoactivos	Etapa piloto	
Delaminación	A base de ácidos orgánicos diluidos		Etapa industrial completa (China)	
Eliminación de aditivos	Extracción	sólido líquido. (Ultrasónica)	No disponible en sector plástico. Se reporta dificultad en escalamiento a nivel industrial.	

Los pretratamientos del PET para su procesamiento por hidrólisis vía enzimática pretenden abordar un objetivo central, obtener un material con baja cristalinidad (0-15 %) partiendo de un material con alta cristalinidad (35-40 %). Dicho problema se ha abordado a través de pretratamientos químicos, físicos, térmicos o sus combinaciones. En la Tabla 9 se muestran algunas propuestas que han permitido evidenciar cambios en la cristalinidad del PET o en la interacción Enzima: Sustrato. Una descripción más detallada de estos y otros pretratamientos es abordada por Ciuffi *et al.*, (2024).

Tabla 9. Algunos pretratamientos utilizados en reacciones de hidrólisis enzimática del PET.

Pretratamiento	Efecto	Referencia
Inmersión en NaOH 10 M / 25°C / 24 h.	Disminución en la cristalinidad. 33.70±0.05 % a 27.68±0.34 %	Giraldo, <i>et al.</i> , 2023.
Criomolienda (molienda con temperatura controlada con el uso de N ₂ (l)).	Aumento de la cristalinidad en distintos tamaños de partícula partiendo de láminas de 0.5 x 0.5 cm (PET-GF). 4.2±2 % a 11.0±1.8 % en 250 µm 4.2±2 % a 7.6±1 % en 150 µm 4.2±2 % a 14.3±2.3 % en <150 µm Reducción de la cristalinidad en menores tamaños de partícula partiendo de un PET cristalino comercial en polvo (PET-HC, Goodfellow®) 35.7±3.8 % en 250 µm 35.7±3.8 % a 33.0±2.1 % de 250 µm a 150 µm 35.7±3.8 % a 32.5±1.7 % en de 250 µm a <150 µm	Brizendine, <i>et al.</i> , 2022. Tournier, <i>et al.</i> , 2020.
Radiación con luz UV 250 nm / 14 días	Exposición de láminas de PET (3.5 cm x 0.5 cm). Se observó disminución de la M _n de 35000 a 29000 g/mol. Incremento en la cristalinidad y reducción de movilidad de las cadenas del PET reduciendo la actividad hidrolítica de LC- cutinasa.	Falkenstein <i>et al.</i> , 2020
Pretratamiento térmico. 115°C / 5-35 min	Calentamiento de discos de PET (Ø 6mm) en tubos Eppendorf de 2 mL. Se observó el incremento de la cristalinidad al incrementar el tiempo del tratamiento térmico. De 5 hasta 25 %.	(Thomsen <i>et al.</i> , 2022b)
Extrusión y micronización.	Temperaturas utilizadas a través del extrusor: 265 °C, 280 °C, 280°C, 360 °C. Pellets obtenidos se micronizaron con un disco pulverizador a temperatura ambiente. Disminución considerable de la cristalinidad. Hojuelas ~35 % a 14.6 % en polvo 200 µm a 250 µm.	Tournier, <i>et al.</i> , 2020.

En estas propuestas se puede apreciar que, si se parte de un material con baja cristalinidad, el efecto de la generación de calor por fricción en la molienda induce la alineación de las microestructuras móviles (nucleación) en el PET, incrementando así la fracción cristalina total. En el caso de partir de un material cristalino, se aprecia una ligera disminución en la cristalinidad, pero por lo reportado en la literatura, no se pensaría que sería suficiente para que sea accesible la enzima en las fases amorfas. El caso de un tratamiento alcalino, al ser un medio corrosivo, se espera una modificación de la superficie del plástico, esto entonces podría alterar a la vez la cristalinidad al haber posibilidad de cortes por hidrólisis interna en el bloque del PET. Sin embargo, la propuesta de Tournier *et al*, (2020) es en principio la más adecuada hasta el momento. Consiste en someter al material a temperaturas por arriba del punto de fusión, borrar el historial térmico del PET y, posteriormente, enfriar para evitar la formación de zonas cristalinas. Tras esto, se somete a micronización o criomolienda para la obtención del material en distintos tamaños de partícula con baja cristalinidad.

3 Antecedentes.

En el grupo de trabajo se han identificado, clonado y caracterizado bioquímicamente las cuatro cutinasas de *Aspergillus nidulans* descritas previamente. Hernández en el 2013 clonó y expresó la ANCUT1 de *A. nidulans* en *Pichia pastoris* X-33 utilizando el vector pPICZ α . Solís en 2015 llevó a cabo la caracterización bioquímica de la ANCUT1 (Tabla 10).

Tabla 10. Caracterización bioquímica de la ANCUT 1 recombinante expresada en *Pichia pastoris* X-33. (Solís, 2015; Vega, 2013).

Propiedades bioquímicas	
pH óptimo	9
Estabilidad al pH (actividad residual)	pH 8 / 20% / 1 h
Temperatura óptima	50°C
Estabilidad de la temperatura (actividad residual)	70°C / 30% / 1 h
Especificidad de sustrato	Ésteres de p-nitrofenilo de cadena corta y media
Estabilidad en disolventes	Acetona / Isopropanol / 3 h

Durante la exploración de las aplicaciones biotecnológicas se encontró que estas enzimas tienen la capacidad de llevar a cabo la degradación de poliésteres (poli láctico, policaprolactona, polibutilen succinato, polietilen succinato). Sánchez en 2015 comenzó la exploración de este fenómeno probando condiciones de degradación (1500 U de enzima frente a p-NPA, 2mL de amortiguador de fosfatos, 50 mg de poliéster como láminas [polietilen succinato, policaprolactona, poli láctico, polibutilen succinato y tereftalato de poli(etileno)], 225 rpm/ 72 h). En este primer acercamiento se obtuvo una degradación visible a las 24 h a través de la pérdida de peso. Con respecto al PET (post consumo), la degradación se observó, pero con un muy bajo porcentaje en pérdida de peso (0.29 % / 72 h).

Morales en el 2018 se dio a la tarea de mejorar las condiciones de reacción para la hidrólisis del PET con ANCUT1. Llevó a cabo las reacciones, pero considerando que era necesario implementar un pretratamiento mecánico (molienda) con el objetivo de aumentar el área superficial y disminuir la cristalinidad del sustrato. En este sentido las condiciones de reacción (500 U, 50 mg PET malla #60 [0.25 mm], amortiguador de fosfatos pH 7, 40 °C, 840 h añadiendo 100 U/mL cada 72 h). En este caso se utilizaron técnicas analíticas para evidenciar el fenómeno de degradación. La DSC, FT-IR, SEM, TLC y DLC permitieron evaluar la disminución de la cristalinidad (67.33 a 3.98 % en 4 semanas de reacción), el cambio en la morfología del sustrato después de la reacción y la producción de oligómeros con menor peso molecular durante el avance de reacción. Además, se propuso la determinación de monómeros de reacción a través de HPLC de fase inversa, identificando TPA y BHET, sin embargo, se presentaron dificultades en su cuantificación.

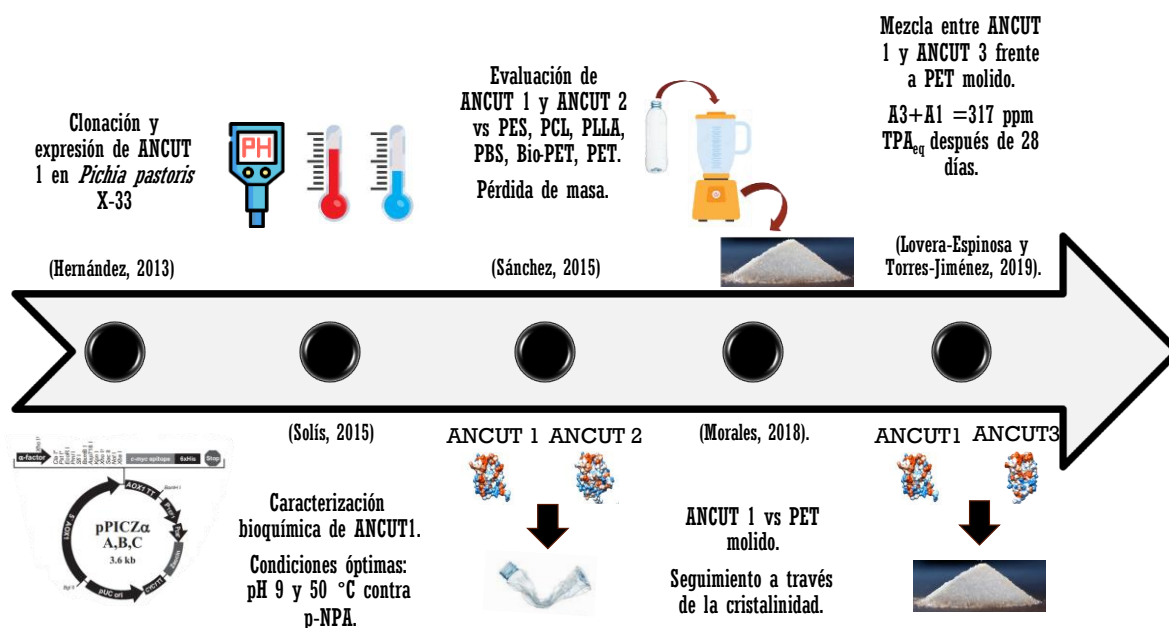


Figura 15. Antecedentes de la degradación del PET con ANCUT 1 dentro del grupo de trabajo. Elaboración propia.

En el 2019, Lovera-Espinosa y Torres-Jiménez optimizaron condiciones de reacción de hidrólisis del PET con ANCUT 3. Durante esta exploración, pusieron a reaccionar a ANCUT 1 en combinación con ANCUT 3 probando distintos órdenes de reacción

(primero ANCUT 1 y luego ANCUT 3, viceversa e individualmente). Las condiciones de reacción (1000 U/mL, 50 mg PET tamiz #50, amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9, 35°C, MgSO₄ 1 mM, 672 h). Los resultados permitieron ver un cambio en la cristalinidad y determinar la concentración de TPA producido. Para PET+ANCUT1: 12.3 %Cri a 16.2 %Cri y 3.5 ppm (0.035 %); PET+ANCUT1+ANCUT3: 12.3 %Cri a 16.1 %Cri y 8.5 ppm (0.085 %); PET+ANCUT3+ANCUT1: 12.3 a 15.3 %Cri y 317 ppm (3.17 %).

4 Justificación.

El reciclaje del PET, por vía enzimática, es un tema de interés para reincorporar estos residuos en un modelo de economía circular. Hasta el momento en el grupo de trabajo se han desarrollado estudios para la degradación de PET y otros plásticos con enzimas recombinantes (cutinasas), provenientes de *Aspergillus nidulans* expresadas en *Pichia pastoris*. Se tienen resultados importantes en relación con lograr la pérdida de peso y modificaciones estructurales de los polímeros evidenciadas por microscopía electrónica de barrido. También se ha logrado reducir el tiempo de reacción (3 meses a 1 mes). A pesar de que la producción de monómeros compite con los datos de varios trabajos reportados, no alcanza los mejores rendimientos reportados a la fecha. Es necesario continuar en la optimización de las condiciones en aras de reducir los tiempos y aumentar los rendimientos de reacción. Por otro lado, factores como control de pH y la agitación pueden ser controladas y estudiadas en un biorreactor, dispositivo objetivo para pruebas piloto en la hidrólisis enzimática de PET con ANCUT 1 y su posterior escalamiento.

En este trabajo se llevaron a cabo reacciones de hidrólisis del PET utilizando ANCUT1 recombinante expresada en *Pichia pastoris*. Se emplearon PET post-consumo (desechos) y PET amorfo (referencia) para evaluar el grado de degradación considerando la cristalinidad y las condiciones del medio de reacción.

5 Hipótesis.

La aplicación de un pretratamiento termo-mecánico al PET reduce la cristalinidad del material, borra su historial térmico, mejora la eficiencia de ANCUT 1-sustrato durante la hidrólisis e incrementa el rendimiento de los monómeros de hidrólisis.

6 Objetivos.

6.1 General

- ✓ Evaluar el impacto de modificar la cristalinidad del PET aplicando un pretratamiento termo-mecánico en la hidrólisis enzimática del polímero para la obtención de monómeros de interés.

6.2 Particulares

- ✓ Determinar las mejores condiciones de reacción para la hidrólisis enzimática del PET a escala laboratorio variando los factores: agitación, temperatura, iones, tipo de amortiguador, concentración de amortiguador, proporción de enzima y proporción de sustrato a través de la cuantificación de los monómeros producidos.
- ✓ Identificar y cuantificar los productos de la reacción de hidrólisis enzimática del PET.
- ✓ Identificar la fracción del PET susceptible a hidrólisis enzimática por ANCUT 1 por medio de análisis ATR-IR y DSC.
- ✓ Evaluar el impacto del pretratamiento termo-mecánico en la cristalinidad del PET observando los perfiles de las estructuras internas en el PET (MAF, RAF y Cri).
- ✓ Evaluar el impacto del pretratamiento termo-mecánico en la producción de monómeros a partir de diferentes presentaciones y orígenes de PET.

7 Metodología.

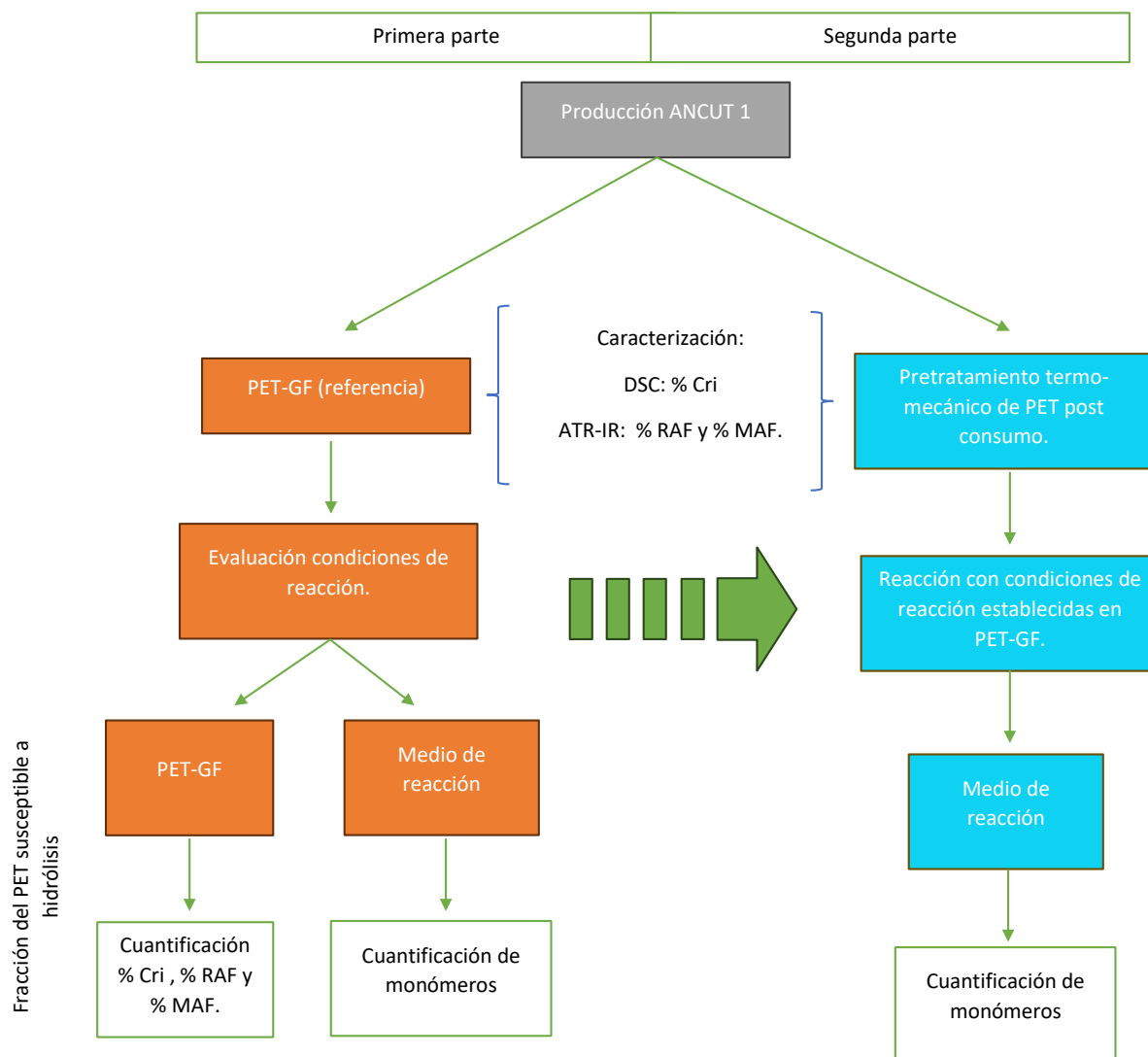


Figura 16. Se llevó a cabo la producción de la enzima ANCUT1 a través de la reactivación e inducción de la cepa de *Pichia pastoris* X33-pPICZα-ANCUT1. En la primera etapa del trabajo se exploraron y determinaron las condiciones de reacción en la degradación de PET con ANCUT 1 identificando y cuantificando los productos de reacción. En esta etapa también se determinó la fase del PET (RAF, MAF o cristalina) susceptible a hidrólisis por ANCUT 1. En la segunda etapa se caracterizó el sustrato para evaluar los cambios del material al ser sometido al pretratamiento térmico y mecánico. Posterior a esto, se evaluó el desempeño de ANCUT 1 en la degradación del material pretratado.

7.1 Medios de cultivo.

Los medios de cultivo se prepararon de acuerdo con lo descrito por Lovera-Espinosa y Torres- Jiménez, 2019 con algunas modificaciones. En el Anexo A se describen la preparación de dichos medios y de las soluciones stock.

7.2 Reactivación de *Pichia pastoris*.

Para la reactivación de la levadura *Pichia pastoris* se inocularon 200 μ L de la cepa X33-pPICZ α -ANCUT1, cepa almacenada previamente en glicerol a -70°C. La reactivación se llevó a cabo en un matraz Erlenmeyer estéril con capacidad nominal de 250 mL utilizando 25 mL de medio YPD / Zeocina 0.01%, de acuerdo con lo reportado por Castro-Rodríguez, 2017 y Lovera-Espinosa y Torres-Jiménez, 2019. Se incubó por 24 horas a 29°C y 300 rpm con agitación orbital (Innova 40, New Brunswick Scientific, USA).

7.3 Crecimiento en medio LOTO Glicerol 1%.

Para la generación de biomasa de la levadura, posterior a las 24 h de incubación en el medio YPD se procedió a centrifugar a 8500 rpm durante 10 min a temperatura ambiente (T_{amb}). Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 2 mL de medio Y (extracto de levadura 3%). El crecimiento se llevó a cabo en un matraz EM estéril, con capacidad nominal de 250 mL, utilizando 25 mL de medio LOTO -Glicerol 1% (ANEXO A, Figura 34) inoculando el medio hasta $DO_{600} = 1$ U.A. Se incubó por 24 horas a 29°C y 300 rpm con agitación orbital.

7.4 Inducción de ANCUT 1 en medio LOTO Metanol 3%.

Para la inducción de la enzima ANCUT 1, posterior a las 24 h de incubación en el medio LOTO Glicerol 1%, las células de *Pichia pastoris* se centrifugaron a 8500 rpm durante 10 min a T_{amb} , se eliminó el sobrenadante y se llevó a cabo un lavado suspendiendo el botón celular en 10 mL de medio Y, centrifugando bajo las condiciones ya mencionadas. Nuevamente se suspendió el botón celular en 2 mL de medio Y. La expresión de la enzima recombinante se llevó a cabo en un matraz EM estéril con capacidad nominal de 250 mL utilizando 25 mL de medio LOTO Metanol 3%, donde el metanol fue el inductor de acuerdo con el vector pPICZ α utilizado para la expresión de ANCUT 1 que contiene la región promotora del alcohol

oxidasa (ANEXO A, Figura 34). Se inoculó el volumen necesario del botón suspendido para alcanzar una $DO_{600} = 1$ U.A. Se incubó por 24 horas a 29°C y 300 rpm con agitación orbital. Al finalizar el tiempo de incubación la biomasa se separó del sobrenadante, centrifugando a 8500 rpm durante 10 min a T_{amb} en una centrifuga.

7.5 Concentración del extracto enzimático.

Para concentrar el extracto enzimático se usó un sistema Amicon de ultrafiltración con membrana de 10 kDa como límite de corte nominal. Para la conservación del extracto concentrado, este se hizo pasar a través de una membrana Millipore con tamaño de poro de 22 μm .

7.6 Cuantificación de proteína total soluble en microplaca.

La cantidad de proteína se determinó por el método de Bradford (sensibilidad: 1 - 100 μg ; Bradford, 1976; Whiteley y Lee, 2006). Se realizó la dilución correspondiente con Tris-HCl 50 mM pH 9) para colocar por triplicado en la microplaca 160 μL de esta dilución y 40 μL del reactivo Bradford (Bio Rad). Se utilizó un blanco que consta de 160 μL del amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9 y 40 μL del reactivo Bradford. Se homogeneizaron perfectamente los componentes para que se llevara a cabo la reacción. El color generado de la reacción se cuantificó en el lector Epoch (Biotek) utilizando el software Gen_5 1.10, a una absorbancia de 595 nm. El valor de absorbancia se extrapoló utilizando la gráfica mostrada en el Anexo B (Figura 35).

7.7 Cuantificación de actividad volumétrica en placa.

La actividad de esterasa se cuantificó usando como sustrato *p*-nitrofenilacetato. Se partió de un stock de *p*-nitrofenilacetato 10 mM en etanol, del cual se tomó cierto volumen para obtener una concentración 1 mM. Se colocaron por triplicado en la microplaca 170 μL de amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9 con 10 μL de la correspondiente dilución del extracto enzimático de ANCUT 1 usando el mismo amortiguador. Para el blanco se colocaron 180 μL de buffer Tris-HCl y, posteriormente fueron añadidos 20 μL del sustrato *p*-NPB 1 mM. La reacción se siguió durante 10 minutos tomando la lectura cada minuto, en un espectrofotómetro Epoch (Biotek) a una absorbancia de 420 nm (Nawanni *et al.*, 2006). Una unidad de

actividad (U) se definió como la cantidad de enzima que logra la conversión de 1 μ mol de sustrato a producto por minuto bajo las condiciones de ensayo.

7.8 Identificación de ANCUT 1 en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Para identificar la enzima ANCUT 1 por su peso molecular se llevó a cabo la electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) en geles de poliacrilamida. Se utilizó como detergente dodecil sulfato de sodio (SDS) y como agente reductor el β -mercaptoetanol, de acuerdo a lo reportado por Laemmli, 1970. Se utilizó un gel concentrador al 4% y un gel separador al 14%. Como referencia se utilizó un marcador de peso molecular de bajo rango y las muestras se cargaron en los carriles asignados previamente. Los geles se corrieron en una cámara de electroforesis (MiniProtean II, Bio Rad) inicialmente a 80V y después de 30 minutos se incrementó a 120 V con buffer de corrida. Los geles se revelaron con azul de Coomassie.

7.9 Determinación de actividad de esterasa a través de zimogramas (Cualitativo).

Para observar la actividad cualitativa de esterasa de las enzimas se realizaron geles de poliacrilamida sin β -mercaptoetanol. La actividad se observó por zimografía siguiendo la metodología planteada por Karpushova *et al.*, 2005. Una vez llevada a cabo la electroforesis el gel se incubó en una solución de amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 7 durante 30 min. Posteriormente se cambió la solución a amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 con Tritón X-100 al 0.5 % durante 30 min, para renaturalizar a la enzima. Pasado este tiempo se cambió la solución y el gel se dejó en una solución de α -naftil acetato (Solución A) durante 30 min en agitación, a temperatura ambiente y, finalmente, sin desechar la solución A, se le agregó la solución de Fast Red (Solución B) hasta que se observara la tinción de las bandas color marrón que presentan actividad enzimática.

Solución A: Stock de acetato de α -Naftilo: Pesar 2.0 mg del reactivo y disolverlo en 0.5 mL de acetona. Llevar esto a un volumen de 2 mL con amortiguador de fosfatos de sodio 50 mM a pH 7.

Solución B: Stock de Fast Red: Pesar 5.0 mg del reactivo Fast Red, añadir 0.5 mL del amortiguador de fosfatos de sodio 50 mM a pH 7 con 50.0 μ L de Tritón 100-X necesario para solubilizar. Por último, llevar esto a 2 mL con el mismo amortiguador de fosfatos.

7.10 Evaluación de condiciones de reacción de hidrólisis del PET con ANCUT1.

Para la evaluación de la reacción de hidrólisis de PET con ANCUT 1 a pequeña escala se cargó un volumen de reacción de 1 mL en tubos Eppendorf de polipropileno con capacidad nominal de 2 mL. Para la evaluación del tipo de amortiguador en la actividad de hidrólisis se utilizaron Tris-HCl (pKa 8.2), $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pKa 7.2), $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ (pKa 10.3) y Gly-NaOH (9.6). Para la evaluación de la concentración de amortiguador se probó el rango de concentración: 50, 100, 150 y 200 mM. Para evaluar el efecto de la proporción de sustrato, se consideraron las proporciones 50, 100, 200 y 700 U/mg de PET donde la concentración de enzima se mantuvo constante. En la evaluación de la proporción de enzima se consideraron las proporciones 10, 25, 50 y 100 U/mg de PET manteniendo constante la cantidad de PET-GF. Para evaluar el efecto de la agitación se comparó la reacción en estático contra la reacción a 800 rpm en agitación orbital. Para la evaluación de la temperatura de reacción se ajustaron las temperaturas a 40, 50, 60, 65 y 80 °C. Para la evaluación de la presencia de iones en la hidrólisis del PET se consideraron los cationes Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} como cloruros en una concentración de 25 mM en solución con agua desionizada. Para la evaluación del efecto de la presencia de MHET en la actividad de hidrólisis de PET por ANCUT 1 se ajustaron las siguientes concentraciones iniciales de MHET: 1, 3, 6 y 8 mM.

Las reacciones se llevaron a cabo en una incubadora de termobloque seco Thermo Scientific™ Compact Digital con agitación orbital. La reacción procedió durante 72-96 h. Todas las reacciones se llevaron a cabo por triplicado. Se contó con un control sin enzima para considerar la hidrólisis fisicoquímica del PET atribuida al medio de reacción. También se contó con un blanco de color, sin sustrato, pero si enzima,

considerando la coloración del extracto enzimático. Especificaciones adicionales y detalladas son mencionadas a continuación.

7.10.1 Efecto del amortiguador.

Tabla 11. Condiciones de reacción en la evaluación del desempeño de ANCUT 1 en la hidrólisis del PET-GF en función del tipo de amortiguador.

Variables	Condiciones
Temperatura	50°C
Amortiguador	Tris-HCl, Fosfatos Na, Gly-NaOH, NaHCO ₃ /Na ₂ CO ₃
Concentración de amortiguador	50 mM
pH	9
Agitación orbital	800 rpm
Volumen de reacción	1 mL
Unidades de enzima	10000 U/mL
PET-GF	14 mg
Tiempo de reacción	96 h

7.10.2 Efecto de la concentración del amortiguador.

Tabla 12. Condiciones de reacción para evaluación del efecto de la concentración de amortiguador Tris-HCl en el medio de reacción de hidrólisis de PET-GF con ANCUT 1.

Variables	Condiciones
Temperatura	50°C
Amortiguador	Tris-HCl
Concentración de amortiguador	50 mM; 100 mM; 150 mM; 200 mM; 1 M
pH	9
Agitación orbital	800 rpm
Volumen de reacción	1 mL
Unidades de enzima	10000 U/mL
PET-GF	14 mg/mL
Tiempo de reacción	96 h

7.10.3 Efecto de la proporción de sustrato.

Tabla 13. Condiciones de reacción para evaluación del efecto de la proporción de sustrato en el medio de reacción de hidrólisis de PET-GF con ANCUT 1.

Parámetros	Condiciones
Temperatura	50°C
Amortiguador	Tris-HCl

Concentración de amortiguador	50 mM
pH	9
Agitación orbital	800 rpm
Volumen de reacción	1 mL
Unidades de enzima	10000 U/mL
PET-GF	14 mg/mL; 50 mg/mL; 100 mg/mL; 200 mg/mL
Tiempo de reacción	96 h

7.10.4 Efecto de la proporción de enzima.

Tabla 14. Condiciones de reacción para evaluación del efecto de la proporción de enzima en el medio de reacción en la hidrólisis de PET-GF por ANCUT 1.

Parámetros	Condiciones
Temperatura	50°C
Amortiguador	Tris-HCl
Concentración de amortiguador	50 mM
pH	9
Agitación orbital	800 rpm
Volumen de reacción	1 mL
Unidades de enzima	20000, 10000, 5000, 2000 U/mL
Sustrato	PET-GF (200 mg)
Tiempo de reacción	96 h

7.10.5 Efecto de la agitación.

Tabla 15. Condiciones de reacción para evaluación del efecto de la agitación en la hidrólisis enzimática del PET-GF.

Variables	Condiciones
Temperatura	50°C
Amortiguador	Tris-HCl
Concentración de amortiguador	50 mM
pH	9
Agitación orbital	Estático, 800 rpm
Volumen de reacción	1 mL
Unidades de enzima	14304.51 U/mL
PET-GF	200 mg

7.10.6 Efecto de la temperatura de reacción y la presencia de iones en el medio de reacción.

Tabla 16. Condiciones de reacción de hidrólisis de ANCUT 1 frente a PET-GF. Evaluación de temperatura de reacción y presencia de iones en el medio de reacción.

Variables	Condiciones
Temperatura	40, 50, 60, 65, 80 °C
Amortiguador	Tris-HCl
Concentración de amortiguador	50 mM
pH	9
Agitación orbital	800 rpm
Iones	Sin ion, NaCl, CaCl ₂ , MgCl ₂ (25 mM)
Volumen de reacción	1 mL
Unidades de enzima	14000 U/mL
PET-GF	200 mg

7.10.7 Actividad residual y avance de reacción de hidrólisis de PET-GF con ANCUT 1.

Tabla 17. Condiciones de reacción para la evaluación del avance de reacción de hidrólisis de PET-GF con ANCUT 1 y la estabilidad térmica de la enzima.

Variables	Condiciones
Temperatura	50°C
Amortiguador	Tris-HCl
Concentración de amortiguador	50 mM
pH	9
Agitación orbital	800 rpm
Volumen de reacción	1 mL
Unidades de enzima	10000 U/mL
PET-GF	50 mg/mL
Tiempo de reacción	96 h

7.10.8 Evaluación de la actividad de ANCUT 1 en la hidrólisis del PET pretratado.

Tabla 18. Condiciones de reacción para evaluación ANCUT 1 contra distintos tipos de PET.

Parámetros	Condiciones
Temperatura	50°C
Amortiguador	Tris-HCl
Concentración de amortiguador	50 mM
pH	9
Agitación orbital	800 rpm
Volumen de reacción	1 mL
Unidades de enzima	10000 U/mL
Sustrato	PET-PC, PET-PCP, PET-PCT, PET-PCTP, PET-GF, PET-GFP, PET-3AP, PET-1AP (200 mg)
Tiempo de reacción	72 h

7.11 Síntesis del intermediario MHET por hidrólisis enzimática del BHET.

Debido a la falta del compuesto MHET en el mercado o su difícil adquisición se llevó a cabo su síntesis para tenerlo como referencia en los análisis cualitativos y cuantitativos. La reacción de síntesis para la obtención del intermediario MHET procedió de acuerdo con lo reportado por Świderek *et al.*, 2023 con ciertas modificaciones. En un matraz Erlenmeyer acondicionado con 3 baffles con capacidad de 250 mL, fueron añadidos 134 mg (0.52 mmol) de BHET. Posteriormente fueron añadidos 50 mL de amortiguador de bicarbonato de sodio 100 mM pH 9 y se dejó en agitación magnética durante la noche para favorecer la solubilidad del BHET (8 g/L). Transcurrido este tiempo se añadió al matraz 1 g de la lipasa B de *Candida albicans* inmovilizada (CALB) usada por Świderek *et al.*, 2023. La reacción procedió a 25°C y agitación orbital constante durante 3 a 4 h. La reacción fue monitoreada por TLC usando Metanol:Cloroformo 60:40 como fase móvil y sílice (con fluoróforo 254 nm) como fase estacionaria. Concluido el tiempo de reacción, se filtró el medio de reacción para retirar la enzima inmovilizada la cual fue lavada y almacenada en refrigeración. Posteriormente se añadió el volumen necesario de HCl 5 M hasta un pH de 1 (de Queiros *et al.*, 2022) y fue saturada la mezcla de reacción con NaCl. Se extrajo el producto de reacción 4 veces (50 mL c/u) con acetato de etilo. La purificación del producto MHET se llevó a cabo por

columna con sílice (70-230 mesh, 60 Å, volumen de poro 0.75 cm³/g) como fase estacionaria y Acetonitrilo:MeOH como fase móvil partiendo desde 100 % hasta 70 % Acetonitrilo. En el Anexo D se adjunta el espectro de ATR-FTIR (Figura 40), RP-HPLC (Figura 41) y ¹H-RMN (Figura 39) del producto MHET obtenido. RP-HPLC tiempo de retención a 7.32 min. ¹H-RMN (300 MHz, MeOD): δ, 3.85-3.92 ppm (t, 2H), 4.38-4.42 ppm (t, 2H), 7.9-8.2 ppm (m, 4H, Ar-H).

7.12 Tratamiento de muestras para análisis de densitometría por TLC.

Finalizada la reacción se centrifugó a 14000 rpm por 2 min. Se separó el PET del medio de reacción. Se hizo un enjuague (producto adherido) del sustrato con 1 mL MeOH y fue transferido al sobrenadante. Se centrifugó a 14000 rpm por 2 min. El precipitado se retiró y se almacenó el sobrenadante en refrigeración para su posterior análisis.

En el caso del sólido, se hicieron lavados con agua destilada, se centrifugó en las condiciones descritas previamente y se realizó un lavado con EtOH al 70%. El sólido se secó durante toda la noche a 50°C y posteriormente en un desecador con vacío para su posterior análisis con ATR-IR o DSC.

7.13 Cromatografía en capa fina (TLC).

Se realizó en cromatoplasmas de aluminio (10 x 7 cm) (silica gel 60 F254, Meck, Darmstadt) usando las muestras líquidas de los diferentes tiempos de reacción, el blanco y las referencias correspondientes. Los monómeros se eluyeron con una fase móvil de MeOH:CHCl₃ (60:40 v/v). Después de la separación, los puntos fueron detectados usando una lámpara de UV a 254 nm. Para observar de forma semicuantitativa la presencia de TPA en el medio de reacción, se aplicaron las muestras líquidas (4 µL), así como las referencias TPA (0.25-10 mM). (Anexo E)

7.14 Cuantificación de actividad de hidrólisis de PET por ANCUT 1 por espectrofotometría.

Se utilizó la técnica de espectrofotometría para cuantificar la actividad de hidrólisis de PET referida a los ftalatos totales (TPA, MHET, BHET, oligómeros). La cuantificación de actividad de hidrólisis se determinó a través de la cuantificación de Ftalatos totales a 241 nm de acuerdo con el máximo de absorción de las moléculas

de referencia (Anexo F). Se colocaron 150 μL de disoluciones de concentración conocida de TPA para la curva de calibración y se extrapoló la absorbancia obtenida de las mezclas de reacción. Las diluciones necesarias se llevaron a cabo con Tris-HCl pH 9 50 mM.

Las determinaciones tanto de RMN, DSC, y ATR-FTIR se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación e Industria (USAII).

7.15 Cuantificación de actividad de hidrólisis de PET por ANCUT 1 a través de RP-HPLC.

Se usó la técnica de RP-HPLC para cuantificar la actividad de hidrólisis de PET referida a los principales monómeros TPA y MHET individualmente. La cuantificación se llevó a cabo en un sistema HPLC Infinity 1260 de Agilent equipado con una columna C18, una bomba binaria, auto muestreador, y un detector de arreglo de diodos (DAD) UV-visible. La fase móvil se conformó por A: ácido acético 0.5% en agua y B: acetonitrilo. El gradiente de elución fue 0 min A: 80% B: 20 %, 5 min A: 80% B: 20%, 10 min A: 10% B: 90%, 15 min A: 80% B: 20%. Las muestras tratadas como se indica en “Tratamiento de muestras para análisis de densitometría por TLC.” fueron diluidas con amortiguador Tris-HCl pH 9 50 mM con el fin de entrar en la curva de calibración. Las diluciones fueron sonicadas para degasificar y se filtraron con membranas de nylon de 0.45 μm . El tiempo de análisis fue de 17 min. El volumen de inyección fue de 10 μL . La detección de los productos TPA, MHET y BHET se siguió a 244 nm.

7.16 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (ATR-FTIR).

Las condiciones de análisis fueron similares a las reportadas por Morales, 2018. Los análisis de ATR-FTIR se llevaron a cabo directamente en la lámina o el polvo de PET. Las muestras fueron monitoreadas entre 4000 a 400 cm^{-1} con una resolución de 1 cm^{-1} . El tamaño de muestra se mantuvo entre 5 a 10 mg del material analizado.

7.17 Evaluación de la cristalinidad por calorimetría diferencial de barrido. (DSC).

Se pesaron entre 5-10 mg de muestra en tubos Eppendorf de 2 mL y se enviaron a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII) bajo las

siguientes condiciones de análisis. Calentamiento de 0 a 280°C manteniendo una rampa de calentamiento de 10°C/min durante 28 min bajo una atmósfera de Nitrógeno.

7.18 Pretratamiento térmico del PET post-consumo (PET-PC).

En una parrilla precalentada a 290°C se colocó una lámina de aluminio (~10x7 cm). Se colocaron sobre la lámina de aluminio ~2 g de PET-PC, y se dejó fundir (1-2 min). Posteriormente se colocó otra lámina de aluminio sobre la primera placa. Con una pesa de metal de 0.9 kg (10 x 7 x 5 cm) se aplicó presión sobre las placas para favorecer la formación de una película (1 min) y se mantuvo el calentamiento durante 10 min. Al concluir el tiempo las placas fueron transferidas inmediatamente a un baño de agua con hielo con agitación manual con ayuda de unas pinzas metálicas (~5 min). Se obtuvo un material con coloración amarillenta.

La molienda procedió colocando 10 g de PET a moler, previamente cortado en láminas 5 x 5 mm, en un recipiente de aluminio. Sobre este mismo se vertieron ~50 mL de N₂ líquido y se mezcló bien con el PET (1 min). El PET enfriado fue introducido al molino (IKA MF 10 básico) por el conducto de alimentación, el cual mantuvo su funcionamiento a 3750 rpm durante 90 segundos. Posteriormente, el equipo se mantuvo en reposo durante 10 min antes de ser accionado nuevamente. El PET solo fue molido en una ocasión, posterior al enfriamiento y se recuperaron los distintos tamaños de partícula generados.

8 Resultados y discusión.

9 Parte 1 A. Evaluación de condiciones de reacción de hidrólisis de PET de baja cristalinidad (PET-GF) por ANCUT 1.

9.1 Efecto del tipo de amortiguador.

Con el objetivo de conocer el amortiguador con el que ANCUT 1 tiene un mejor desempeño, se llevaron a cabo las reacciones con los amortiguadores Tris-HCl (pKa 8.2), $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pKa 7.2), $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ (pKa 10.3) y Gly-NaOH (pKa 9.6). Debido a que el pH óptimo de ANCUT 1 es 9, se eligieron los sistemas en los cuales se pudiera mantener el pH en ese valor, a excepción del amortiguador de fosfatos de sodio considerado por su menor precio en el mercado y su uso en múltiples trabajos reportados. Cabe aclarar que el pH inicial al evaluar el amortiguador de fosfatos fue de 8. En la Figura 17, se observa que no hubo diferencia significativa al comparar entre las medias de los productos obtenidos con Tris-HCl, fosfatos de sodio o Gly/NaOH con un $\alpha = 0.05$. El amortiguador de bicarbonato fue aquel en el cual se obtuvo la menor cantidad de productos de reacción (4.95 ± 0.64 mM) atribuible a la inestabilidad de sus componentes al ser formado CO_2 durante los equilibrios químicos y disminuir la solubilidad de este compuesto al incrementar la temperatura. El descenso de pH en los distintos amortiguadores Tris-HCl, fosfatos, glicina/NaOH, $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ fue de 0.50 ± 0.01 , 0.51 ± 0.07 , 0.43 ± 0.03 y 0.27 ± 0.06 unidades respectivamente. Debido a que el amortiguador Tris-HCl mostró ser el sistema donde se desempeñó mejor ANCUT 1 en la formación de productos de hidrólisis de PET, ftalatos, se decidió continuar con este sistema amortiguador para los posteriores experimentos. Esta decisión también se apoyó del hecho de considerar los inconvenientes de los amortiguadores de fosfatos, hidróxido o carbonatos al querer evaluar el efecto de los iones al favorecer la precipitación de las sales con iones divalentes como calcio y magnesio.

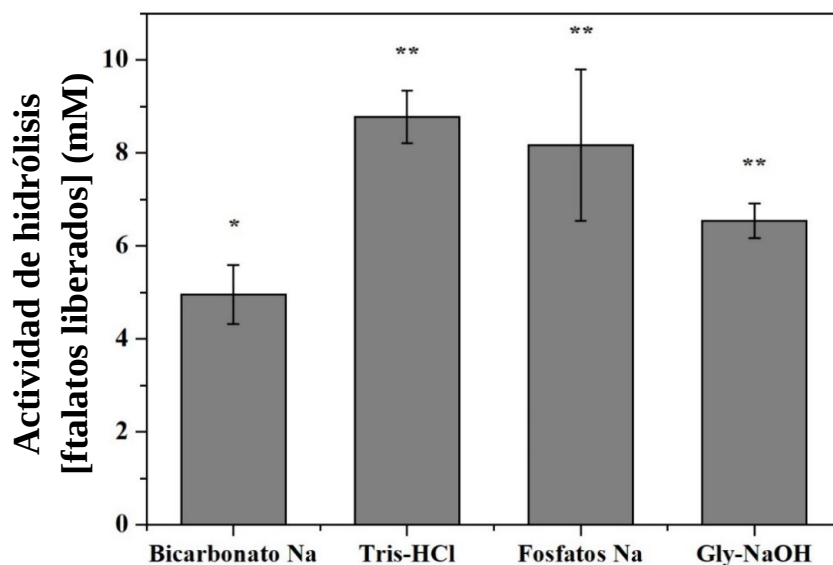


Figura 17. Actividad de hidrólisis de PET-GF por ANCUT 1 en función del tipo de amortiguador a 50 °C y pH 9 a excepción del amortiguador de fosfatos donde fue ajustado a pH 8. Los productos fueron detectados en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 241 nm. Las barras de error indican la desviación estándar de mediciones por triplicado ($n = 3$). Mismo número de asteriscos indica que no hay diferencia significativa entre las medias comparadas contra Tris-HCl con un $\alpha = 0.05$ (ANEXO I).

9.2 Efecto de la concentración del amortiguador.

Las condiciones de reacción para la evaluación del efecto de la concentración del amortiguador Tris-HCl en el desempeño de ANCUT 1 en la hidrólisis de láminas de PET-GF se presentan en la Tabla 12 (Metodología.). En principio se consideraron concentraciones ascendentes a la previamente reportada por el grupo de trabajo, con la finalidad de mantener el pH en un valor de 9 definido como el pH óptimo de trabajo para ANCUT 1 en la caracterización bioquímica (Solís, 2015; Vega, 2013). Lo anterior fue considerado de acuerdo con el hecho de que mientras mayor sea la concentración del amortiguador, mayor la capacidad de amortiguamiento. Kawai *et al*, 2022 recomiendan el uso de distintas concentraciones del amortiguador Ácido-(4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanosulfónico) (HEPES), amortiguador zwitterion al igual que el amortiguador Tris, a pH 9 con relación a la concentración de productos esperados durante la hidrólisis de PET con Cut190. Para concentraciones de productos menores a 50 mM se recomienda el uso de una concentración 100 mM del amortiguador y para mayores concentraciones de productos, mayores concentraciones del amortiguador (150 mM de amortiguador para 70-80 mM de productos y 200 mM de amortiguador para 80-100 mM de productos de hidrólisis).

Basado en los resultados y las recomendaciones en la bibliografía, el ajuste de la concentración de amortiguador respecto a la concentración esperada de productos no aplica con ANCUT 1 ya que el mejor desempeño de ANCUT 1 en la actividad de hidrólisis del PET-GF fue al proceder la reacción en Tris-HCl a 50 mM. Se esperaba que al incrementar la concentración del amortiguador Tris-HCl, la concentración de productos sería mayor o al menos la misma con un menor impacto en la reducción del pH por la naturaleza ácida de los monómeros esperados como el ácido tereftálico (TPA). A diferencia de esto, en la Figura 18 se observa que cuando se incrementó la concentración de amortiguador por arriba de 50 mM hubo un efecto negativo en la actividad de hidrólisis al haber una disminución del 50 % en los productos cuantificados.

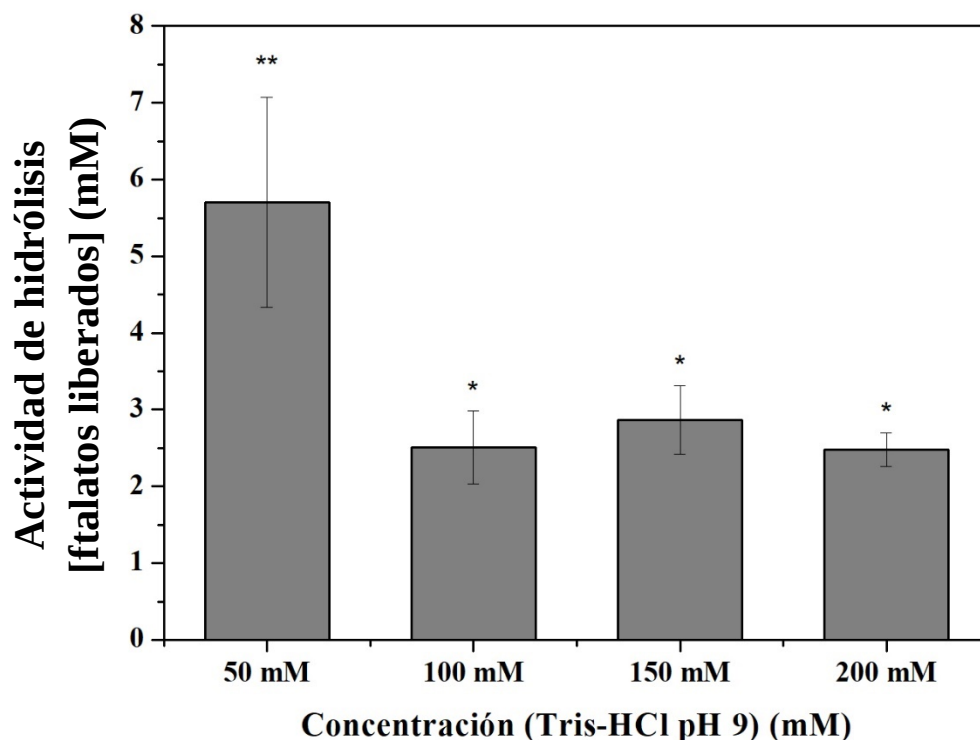


Figura 18. Actividad de hidrólisis de PET-GF por ANCUT 1 en función de la concentración de amortiguador Tris-HCl pH 9 a 50 °C. Detección de productos a través de espectrofotometría a 241 nm usando una curva patrón de TPA (ANEXO F). Las barras de error indican la desviación estándar de mediciones por triplicado ($n = 3$). Distinto número de asteriscos indican diferencia significativa entre los niveles de la variable evaluada comparados entre sí por el método Tukey con $\alpha = 0.05$.

Schmidt *et al.*, 2016 observaron un efecto similar al trabajar con dos cutinasas (LCC y TfCut2). Ambas enzimas presentaron pérdida de alrededor del 90 y 80 % de actividad, respectivamente, al incrementar la concentración de Tris hasta 1 M. A

través de estudios de *docking* molecular y velocidades iniciales en la hidrólisis de PET, sugieren un rol de inhibidor competitivo del Tris (Schmidt *et al.*, 2016) en concentraciones superiores a 100 mM en las cutinasas TfCut2 y LCC, lo que podría relacionarse con ANCUT 1 al incrementar la concentración del amortiguador. Por tal motivo, se continuó con el uso de Tris-HCl 50 mM en los estudios subsecuentes.

9.3 Efecto de la proporción de sustrato.

En esta sección se presenta el desempeño de ANCUT 1 bajo las condiciones citadas en la Tabla 13, evaluando la proporción del sustrato PET-GF en el medio de reacción. Se propuso trabajar con las proporciones 50, 100, 200 y 700 U/mg de ANCUT 1/PET-GF manteniendo constante la cantidad de 10000 U/mL de unidades enzimáticas de ANCUT 1. En principio, en este trabajo se esperaba que al incrementar la cantidad de sustrato se obtuviera una mayor cantidad de productos de hidrólisis, lo cual fue cierto y se aprecia visiblemente en la Figura 19. Al aumentar la cantidad de láminas de PET-GF en el medio de reacción, la concentración de los productos detectados a 241 nm aumentó de forma gradual. Esto indicó que, al incrementar la cantidad de sustrato —o más precisamente, el área superficial—, se favoreció la actividad de hidrólisis enzimática del PET-GF por ANCUT 1. A partir de estos resultados, se justificó la necesidad de la reducción del tamaño de partícula del PET-GF para evaluar su efecto en la producción de monómeros de hidrólisis respecto al sustrato en lámina presente en la reacción. Un aspecto importante a resaltar es el grado de depolimerización, un valor que indica el porcentaje de hidrólisis del PET-GF en la reacción, referido a la unidad monomérica del polímero (Anexo H). Curiosamente, este parámetro mostró un comportamiento inverso a la tendencia observada en la cantidad de productos cuantificados: a mayor cantidad de sustrato, se registró un menor porcentaje de depolimerización. Esto podría explicarse, en parte, por el aumento de la cantidad de PET en el medio de reacción mientras se mantenía constante la cantidad de enzima. Además, sugiere que la cutinasa ANCUT 1 tiene preferencia por los enlaces éster ubicados en los bucles y las cadenas terminales expuestas en la superficie del PET-GF (Figura 12), actuando principalmente a nivel superficial y, posiblemente, en menor medida en el bloque interno del polímero. Este planteamiento se refuerza al analizar el cálculo del

porcentaje de depolimerización. Dado que este parámetro se expresa como la relación molar entre los productos cuantificados y el PET en reacción (mol/mol), un aumento en la cantidad de sustrato reduciría esta relación si la hidrólisis ocurre predominantemente en la superficie.

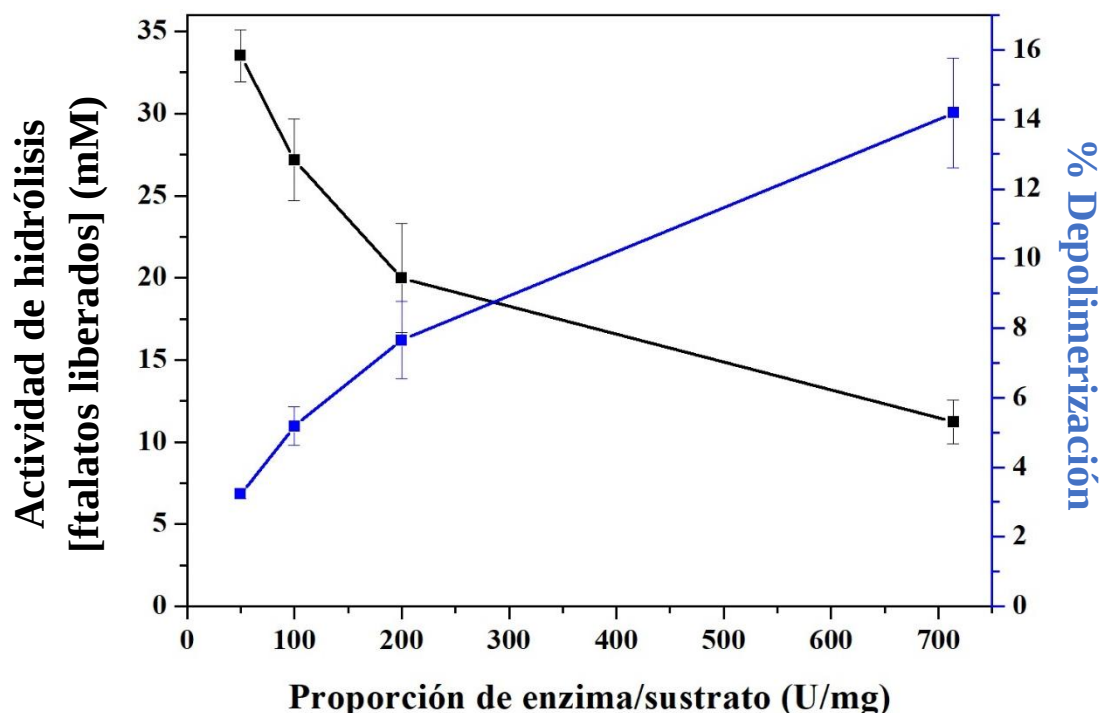


Figura 19. Actividad de hidrólisis de PET-GF por ANCUT 1 en función de la proporción de sustrato en reacción a 50 °C en Tris-HCl 50 mM pH 9. La cuantificación de los ftalatos se llevó a cabo por espectroscopía UV. La cantidad de unidades enzimáticas se mantuvieron constantes en 10000 U/mL. En el eje secundario se presenta el % depolimerización de acuerdo con el cálculo ejemplificado en el Anexo H. Las barras de error indican la desviación estándar de mediciones por triplicado ($n = 3$).

Lo anterior se respalda con la clasificación propuesta por Müller, 2005 y lo planteado por Kawai *et al*, 2019, donde una hidrolasa de PET es aquella enzima capaz de presentar una pérdida de peso del PET en reacción superior al 10 % al ser capaz de atacar tanto la superficie como el bloque interno del polímero. De otra forma, se podría tratar de una enzima modificadora de superficie. El hecho de que ANCUT 1, bajo las condiciones evaluadas, resultó en la pérdida de peso del 9.61 ± 1.44 , 6.37 ± 0.66 , 3.31 ± 0.37 y 2.85 ± 0.11 % para las proporciones de 700, 200, 100 y 50 U/mg de PET-GF respectivamente refuerza el planteamiento de que ANCUT 1 actúa principalmente de forma superficial en las láminas del polímero. A pesar del bajo grado de depolimerización (3.5 %) al evaluar la proporción de 50 U/mg de PET-GF

(10000 U/mL ANCUT 1 y 200 mg PET-GF), se decidió continuar trabajando con esta proporción al ser aquella en la que se cuantificó la mayor cantidad de productos de hidrólisis siendo una ventaja en cuanto a los límites de cuantificación y detección de los productos de reacción.

9.4 Efecto de la proporción de enzima.

A continuación, se muestra el efecto de la proporción de enzima (10, 25, 50 y 100 U/mg PET-GF) en el medio de reacción respecto al sustrato, el cual se mantuvo en una cantidad fija de 200 mg/mL. En la Tabla 14 se resumen las condiciones de reacción utilizadas.

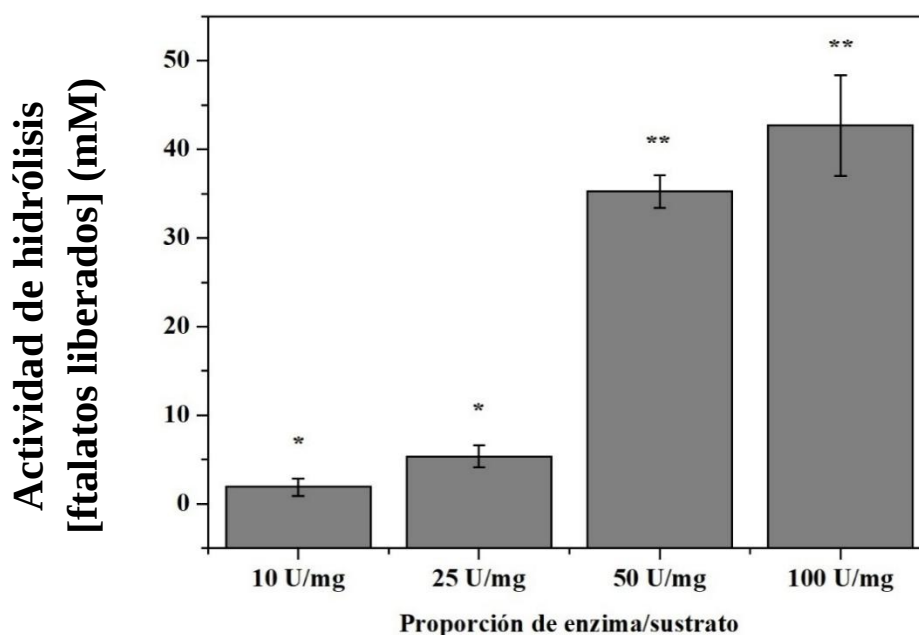


Figura 20. Actividad de hidrólisis del PET-GF por ANCUT 1 en función de la proporción de enzima en reacción a 50 °C en Tris-HCl 50 mM pH 9. Las barras de error indican la desviación estándar de mediciones por triplicado ($n = 3$). Distinto número de asteriscos indican diferencia significativa entre las proporciones evaluadas al ser comparadas con la proporción de 100 U/mg.

En la Figura 20 se observan los ftalatos producidos posterior a 96 h de reacción. No se observó diferencia significativa entre los productos obtenidos al aumentar de 10 a 25 U/mg PET, sin embargo, al duplicar la proporción de unidades enzimáticas (50 U/mg PET) hay un incremento de 6.6 veces en los productos de reacción. En general, el incremento en las unidades enzimáticas de ANCUT 1 en el medio de reacción, incrementó la cantidad final de ftalatos. A pesar de esto, la proporción de

100 U/mg PET no presentó una diferencia significativa comparada con las 50 U/mg PET. La posible falta de réplicas adicionales más allá del triplicado de los experimentos pudo haber contribuido a no detectar la diferencia observada, ya que el gráfico sugiere un ligero incremento en los productos de hidrólisis. Otra explicación podría ser la formación de agregados de ANCUT 1, lo que disminuiría su capacidad catalítica (Avilan *et al.*, 2023). Asimismo, la unión inespecífica de ANCUT 1 u otras proteínas presentes en el extracto enzimático, favorecida por interacciones hidrofóbicas sobre la superficie del sustrato, podría generar interferencias en la interacción ANCUT 1-sustrato, esenciales para la hidrólisis del PET. Además, es posible que ocurra una competencia entre las propias moléculas de ANCUT 1 por los sitios disponibles en el PET-GF. Estas posibles explicaciones coinciden con el modelo en el que la adsorción y desorción de la enzima representan la etapa inicial del proceso de hidrólisis del PET (Brackmann *et al.*, 2023; O'Neill *et al.*, 2007; Sahihi *et al.*, 2024).

Bajo las condiciones evaluadas, las proporciones de 50 U/mg y 100 U/mg en presencia de 20% m/v de PET-GF resultaron ser las mejores en términos de producción de ftalatos. Sin embargo, la proporción de 100 U/mg PET implica duplicar la cantidad de unidades enzimáticas en el medio de reacción, sin un incremento significativo en la cantidad de ftalatos liberados. Por esta razón, se optó por utilizar la proporción de 50 U/mg de PET-GF en los experimentos posteriores.

9.5 Efecto de la agitación en la hidrólisis del PET-GF.

Las condiciones para evaluar el efecto de la agitación en la hidrólisis de PET-GF por ANCUT 1 son desglosadas en la Tabla 15. Se consideró solo una velocidad de agitación en el sentido de comparar contra un sistema estático. Es importante señalar que, al trabajar a nivel matraz, será necesario considerar otras velocidades de agitación para encontrar la óptima para la reacción y tomarlo en cuenta para su escalamiento a reactor.

Es posible que la enzima requiera agitación debido a la unión inespecífica provocada por las interacciones entre las regiones hidrofóbicas de la enzima

(aminoácidos aromáticos, alifáticos o polares sin carga) y la superficie hidrófoba del PET-GF (O'Neill *et al.*, 2007; Thomsen *et al.*, 2023). En la Figura 21 se hace evidente la importancia de la agitación en la reacción, donde están involucrados dos mecanismos de transferencia de masa: transferencia de masa por convección (movimiento de ANCUT 1 alrededor de la superficie del polímero en suspensión) y transferencia de masa por difusión (penetración del solvente o ANCUT 1 en la matriz de PET).

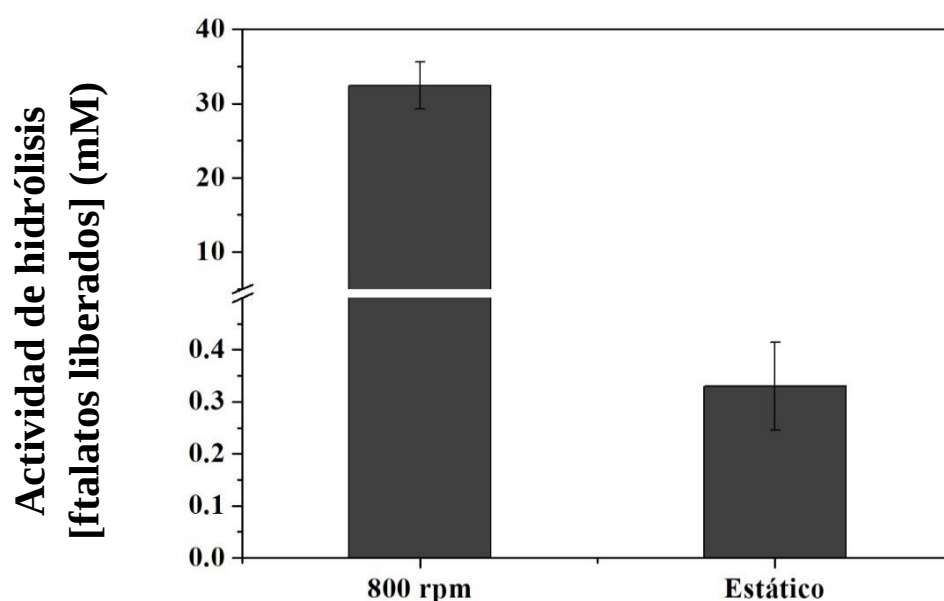


Figura 21. Comparación de la actividad de hidrólisis de PET-GF por ANCUT 1 a 50°C entre un sistema estático y con agitación orbital. Se muestra el corte en el eje de las ordenadas desde 0.5 a 5 mM. Los ftalatos fueron cuantificados por espectroscopía UV. Las barras de error indican la desviación estándar de mediciones por triplicado ($n = 3$).

La agitación tuvo un efecto positivo significativo en comparación con un sistema estático, ya que incrementó la eficiencia de la reacción al aumentar el área superficial accesible del PET-GF reflejándose en una mayor actividad de hidrólisis. En un sistema estático, las láminas de PET-GF pudieron presentar menor área superficial accesible debido al agrupamiento del polímero en el fondo del recipiente, lo que limitó la interacción entre la enzima y el sustrato. Por el contrario, la agitación favoreció la dispersión de las láminas de PET-GF exponiendo más superficie del polímero a la enzima mejorando el contacto constante entre la cutinasa ANCUT 1 y el PET, lo que facilitó la difusión de la enzima en la superficie o en el bloque interno del polímero. En resumen, la agitación mejoró tanto la accesibilidad del sustrato

como la acción enzimática, superando las limitaciones de un sistema estático. Por lo tanto, los resultados indican que la agitación junto con la disminución del tamaño de partícula son factores clave para la hidrólisis del PET-GF al verse incrementada el área superficial disponible del polímero.

9.6 Efecto de la temperatura de reacción y la presencia de iones en el medio de reacción.

En esta sección se presenta la evaluación de la temperatura de reacción y la presencia de iones, estudiados como cofactores en otras enzimas con la capacidad de hidrolizar PET (Kawai *et al*, 2014; Miyakawa *et al*, 2015; Then *et al.*, 2015; Oda *et al*, 2018; Zhong-Johnson *et al*, 2021). La concentración de iones se ajustó de acuerdo con lo reportado por Kawai *et al*, 2014. Las condiciones de reacción se resumen en la Tabla 16. Durante los monitoreos de las reacciones, no se detectaron productos en la reacción llevada a cabo a 80°C debido a la inactivación térmica de la enzima (Datos no mostrados). De acuerdo con lo obtenido, las mejores condiciones corresponden a 40°C con NaCl (30.947 ± 1.807 mM), 50°C sin ion (32.431 ± 3.188 mM) y 60°C con MgCl_2 (28.777 ± 2.591 mM) sin presentar diferencia significativa entre estos tratamientos (Figura 22).

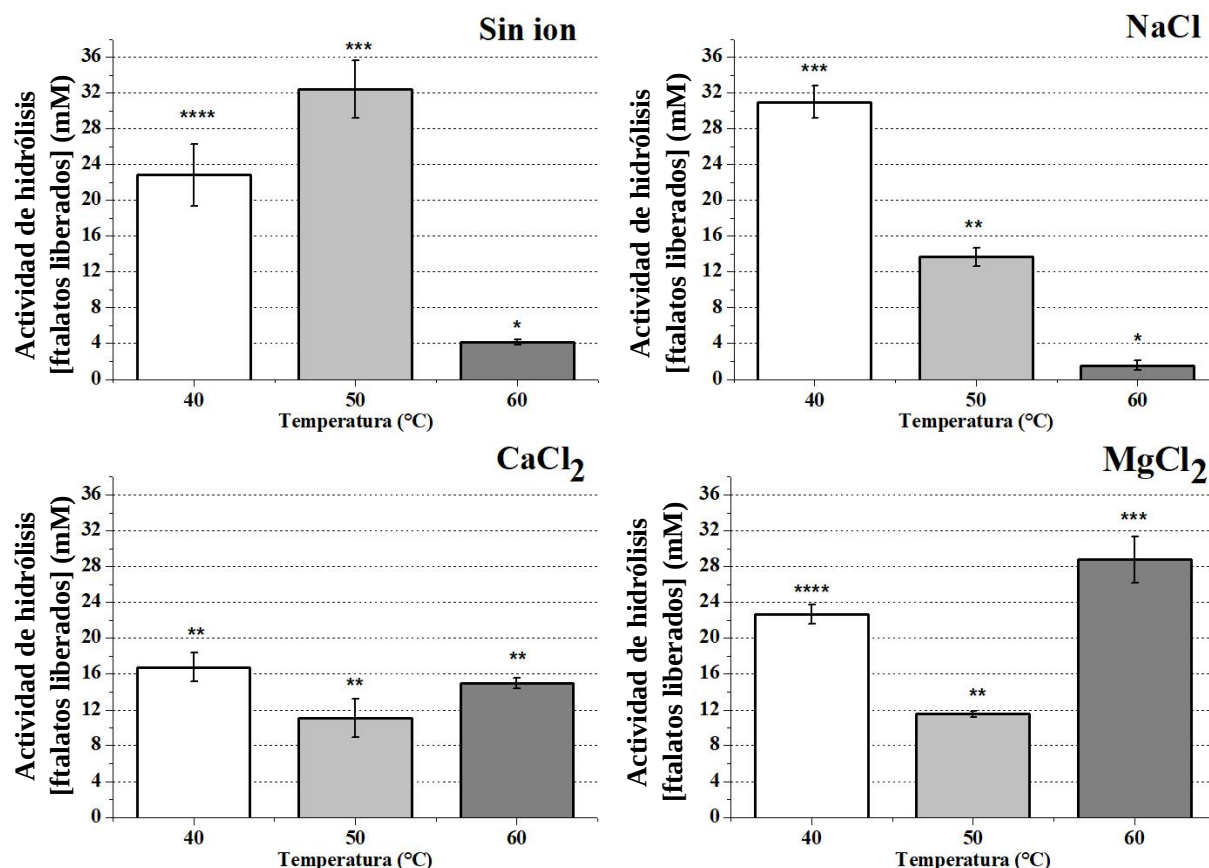


Figura 22. Actividad de hidrólisis del PET-GF por ANCUT 1 en función de la temperatura de reacción (40, 50 y 60 °C) y la presencia de iones (Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) en concentraciones de 25 mM en Tris-HCl 50 mM. El código de color indica la temperatura de reacción; Blanco: 40 °C, gris claro: 50 °C y gris oscuro: 60 °C. La cuantificación de ftalatos se llevó a cabo por espectroscopia UV. Misma cantidad de asteriscos indican que no hay diferencia significativa entre las medias de los tratamientos comparados con el control sin enzima a través de la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Las barras de error indican la desviación estándar de mediciones por triplicado ($n = 3$).

Al analizar la actividad de hidrólisis de ANCUT 1 a 40 °C, se observó poca diferencia entre el control sin iones y las reacciones en presencia de los iones evaluados. A 50 °C, el control sin iones mostró una actividad de hidrólisis al menos dos veces mayor que las reacciones con cualquiera de los iones. Sin embargo, a 60 °C, la actividad de hidrólisis del PET-GF aumentó notablemente en presencia de Mg^{2+} , superando las condiciones con Na^+ , Ca^{2+} y el control sin iones.

Estos resultados sugieren que los iones podrían ejercer un efecto inhibitorio o desestabilizante sobre ANCUT 1 a 50 °C, mientras que a 60 °C, el calcio y el magnesio parecen tener un efecto estabilizante (Then *et al.*, 2015) al trabajar 10 °C

por arriba de la temperatura de 50 °C reportada previamente como la óptima en ensayos con p-NPB (Solís, 2015; Vega, 2013).

Una posible explicación es que ANCUT 1, derivada de un hongo termófilo, podría no estar adaptada para mantener una actividad eficiente a 50 o 60 °C. No obstante, a estas temperaturas, el PET adquiere mayor flexibilidad entre sus cadenas, facilitando la hidrólisis enzimática (Oda *et al.*, 2018).

Desde una perspectiva estructural, los iones podrían alterar la geometría del sitio activo, reduciendo la afinidad por el sustrato. A 50 °C, los iones podrían unirse a sitios específicos de la enzima, restringiendo su flexibilidad y afectando la unión al sustrato o la catálisis. A 60 °C, la enzima podría volverse más propensa a la desnaturalización o a cambios conformacionales que reduzcan su actividad. En este contexto, los iones divalentes como Ca^{2+} y Mg^{2+} podrían actuar como cofactores estabilizantes, proporcionando la rigidez necesaria para mantener la conformación activa de la enzima y permitir la hidrólisis. Para validar estos planteamientos, se requieren experimentos adicionales que identifiquen los sitios de unión potenciales y el rol específico de los iones en la actividad de ANCUT 1 frente al PET.

El monitoreo del pH, como medida indirecta de la formación de productos de hidrólisis debido a su naturaleza ácida, mostró que una disminución excesiva podría inactivar a ANCUT 1, cuyo pH óptimo es 9. Esto resalta la importancia de controlar el pH durante la reacción en un sistema, mediante la adición de una base (Arnal *et al.*, 2023). Sin embargo, el uso de iones como Ca^{2+} o Mg^{2+} podría ser problemático, ya que tienden a precipitar en presencia de bases comunes como NaOH o NaHCO_3 , dificultando el control del pH. Como perspectiva futura, se plantea la optimización de la actividad de hidrólisis de ANCUT 1, enfocándose en mejorar su termoestabilidad a 60 °C mediante interacciones con Mg^{2+} , buscando eventualmente prescindir de la adición del ion.

En conclusión, ANCUT 1 presenta una temperatura óptima de 50 °C en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 9, y no requiere la adición de los iones evaluados bajo las condiciones estudiadas.

9.7 Identificación de los productos de reacción de la hidrólisis de PET-GF con la enzima ANCUT 1.

En la identificación de los productos por cromatografía en capa fina (TLC) se detectó una mancha a un factor de retención (R_f) intermedio entre los correspondientes a los estándares TPA y BHET (Figura 23). En múltiples trabajos se menciona la formación del monómero MHET durante la hidrólisis enzimática, el cual es un producto de hidrólisis del PET, que a la vez es un producto de hidrólisis del BHET. Para confirmar la presencia del producto MHET en el medio de reacción se procedió con la síntesis y purificación del MHET a través de la hidrólisis del compuesto BHET de acuerdo con lo reportado por De Queiros Eugenio *et al.*, (2022) y Świderek *et al.*, (2023) con ciertas modificaciones. La estructura del MHET se confirmó al caracterizarlo por RMN- ^1H , ATR-FTR y RP-HPLC (ANEXO D).

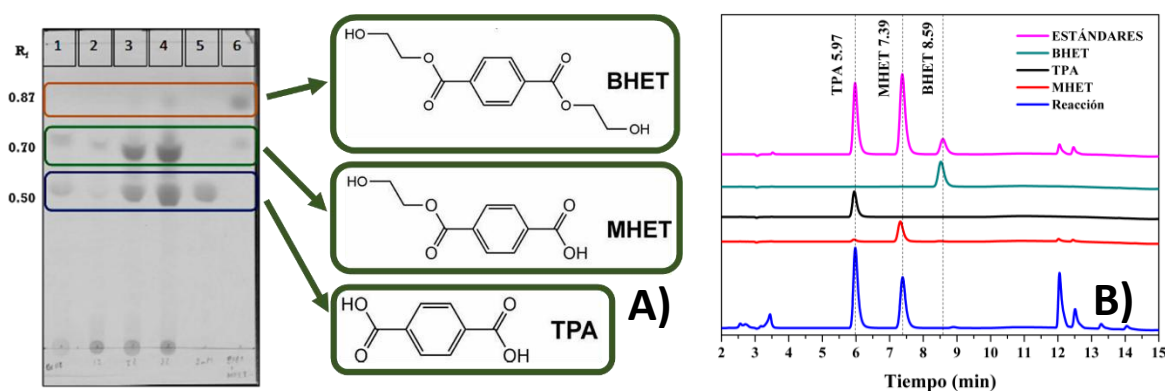


Figura 23. **A)** Cromatoplaque de sílica gel sobre base de aluminio (10 x 7 cm). Revelador: luz UV 254 nm. Sistema de elución MeOH:CHCl₃ (60:40 v/v). Carriles 1 a 4 reacciones de hidrólisis de PET-GF con ANCUT 1 a 60°C. 1) Sin iones dilución 1:2; 2) Con NaCl dilución 1:2; 3) Con CaCl₂ dilución 1:2; 4) Con MgCl₂ dilución 1:2; 5) Estándar TPA 2 mM; 6) Mezcla BHET + MHET. **B)** Cromatogramas de RP-HPLC de las muestras y estándares con un volumen de inyección de 10 μL , gradiente isocrático y flujo de 0.5 mL/min en una columna C18, fase móvil de 0.5 % ácido acético en agua y acetonitrilo y detector UV-visible.

Combinar la TLC junto con la determinación espectrofotométrica a 241 nm permitió proponer una metodología para la detección de los productos de reacción como método rápido exploratorio, tomando como referencia lo reportado por Sowers *et al.*, 2022. Este procedimiento permitió proponer la dilución de la muestra a analizar por HPLC reduciendo el consumo de tiempo y recursos de esta técnica.

El MHET sintetizado sirvió como referencia en TLC confirmando que el R_f intermedio entre TPA y BHET correspondía al MHET (Figura 23). De la misma forma, los

tiempos de retención en RP-HPLC correspondientes a TPA (5.97 min), MHET sintetizado (7.39) y BHET (8.59 min), coincidieron con los tiempos de retención de los productos detectados en el medio de reacción posterior a la hidrólisis enzimática del PET-GF (ANEXO G).

Confirmada la presencia de los 3 monómeros principales (TPA, MHET y BHET) se puede proponer un mecanismo de reacción de ANCUT 1 en presencia del PET. Si bien, el obtener principalmente monómeros podría indicar que la enzima posee un comportamiento exo. Sin embargo, la presencia de 4 picos en HPLC a 12.03, 12.45, 13.2 y 14 min de productos no identificados sugiere un comportamiento endo, por la posibilidad de atribuir estos picos a la presencia de oligómeros. Esto tiene lógica al observar el orden de elución de los monómeros, a mayor peso molecular, mayor tiempo de retención. Estos oligómeros pueden ser formados durante la hidrólisis a través de cortes endo en las cadenas superficiales del polímero como ha sido descrito para otras enzimas degradadoras de PET (Arnal *et al.*, 2023). Por ello, se sugieren hacer análisis de espectroscopía de masas para identificar y confirmar los pesos moleculares de estos compuestos y sustentar las inferencias realizadas.

9.8 Actividad residual y avance de reacción de hidrólisis de PET-GF con ANCUT 1.

El perfil de los productos de reacción (TPA y MHET) y la actividad residual de ANCUT 1 se muestran en la Figura 24A bajo las condiciones resumidas en la Tabla 17.

En la Figura 24B, se puede observar que durante la primera hora se alcanza la máxima productividad del MHET ($0.27 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) a pesar de que se observó su máxima concentración a las 48 h (Figura 24A). En todos los monitoreos fue imperceptible la presencia del monómero BHET. Posterior a las 2 h de reacción, el TPA predominó respecto al MHET hasta finalizar el experimento. Por otro lado, la máxima productividad del TPA ($0.20 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) se alcanzó a las 4 h de reacción. En la Figura 24B se aprecia una caída en la productividad total a las 48 h al no haber un aumento significativo en la concentración de los productos de reacción. La actividad residual durante el seguimiento de la reacción mostrada en la Figura 24A

fue determinada con el ensayo estándar (Sección metodología) y se puede ver que tiene una caída a las 24 h (1%). En ensayos de estabilidad térmica de ANCUT 1 se ha observado una disminución aproximada del 50% de la actividad a 50°C a las 24 h (Castro-Rodríguez, 2024, trabajo en curso), sin embargo, si la reacción es con el PET se pierde prácticamente toda la actividad en el mismo intervalo de tiempo. La reacción de hidrólisis de polímeros comienza con una etapa de adsorción de la enzima a la superficie del sustrato, seguido del reconocimiento y posterior hidrólisis del enlace éster (O'Neill *et al.*, 2007; Sahihi *et al.*, 2024). Este fenómeno de adsorción podría ser un motivo de la pérdida de actividad cuantificable pues pueden no ser consideradas las moléculas adsorbidas o que hayan difundido en el PET. Son necesarios experimentos adicionales para corroborar este planteamiento. Otro posible factor de inhibición es la inhibición por producto de ANCUT 1, siendo el monómero MHET identificado como un fuerte inhibidor competitivo en algunas enzimas degradadoras de PET (de Queiros *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2023). El seguimiento de la hidrólisis de BHET en ausencia de enzima (Figura 24C) mostró una conversión casi completa a las 24 horas, generando MHET y TPA. Posteriormente, el MHET continuó hidrolizándose lentamente debido a la acción del solvente, lo que condujo a una acumulación progresiva de TPA.

La lenta hidrólisis del MHET podría haber causado su acumulación sostenida en el medio de reacción (Figura 24A), provocando así el efecto inhibitorio por producto. Para evaluar este efecto sobre la actividad de hidrólisis de ANCUT 1, se ajustaron concentraciones iniciales de MHET según las condiciones descritas en la Tabla 17. Los resultados mostraron una clara tendencia a la disminución de la actividad de hidrólisis del PET-GF por ANCUT 1 a medida que aumentaba la concentración inicial de MHET en el medio de reacción (Figura 24D), evidenciando su efecto inhibitorio. Se descarta un posible efecto inhibitorio por parte del BHET, ya que ANCUT 1 es capaz de reconocer e hidrolizar este compuesto en reacciones realizadas con 5 mM (1.33 mg/mL) de BHET y 2500 U de enzima (datos no mostrados). El monitoreo de la reacción mediante TLC mostró que se requieren entre 2 y 3 horas para alcanzar una hidrólisis superior al 90%. El producto principal obtenido fue MHET, mientras que la producción de TPA y el BHET remanente

fueron mínimos, mostrándose como una oportunidad para la optimización de la reacción en la síntesis del intermediario MHET no disponible en el mercado.

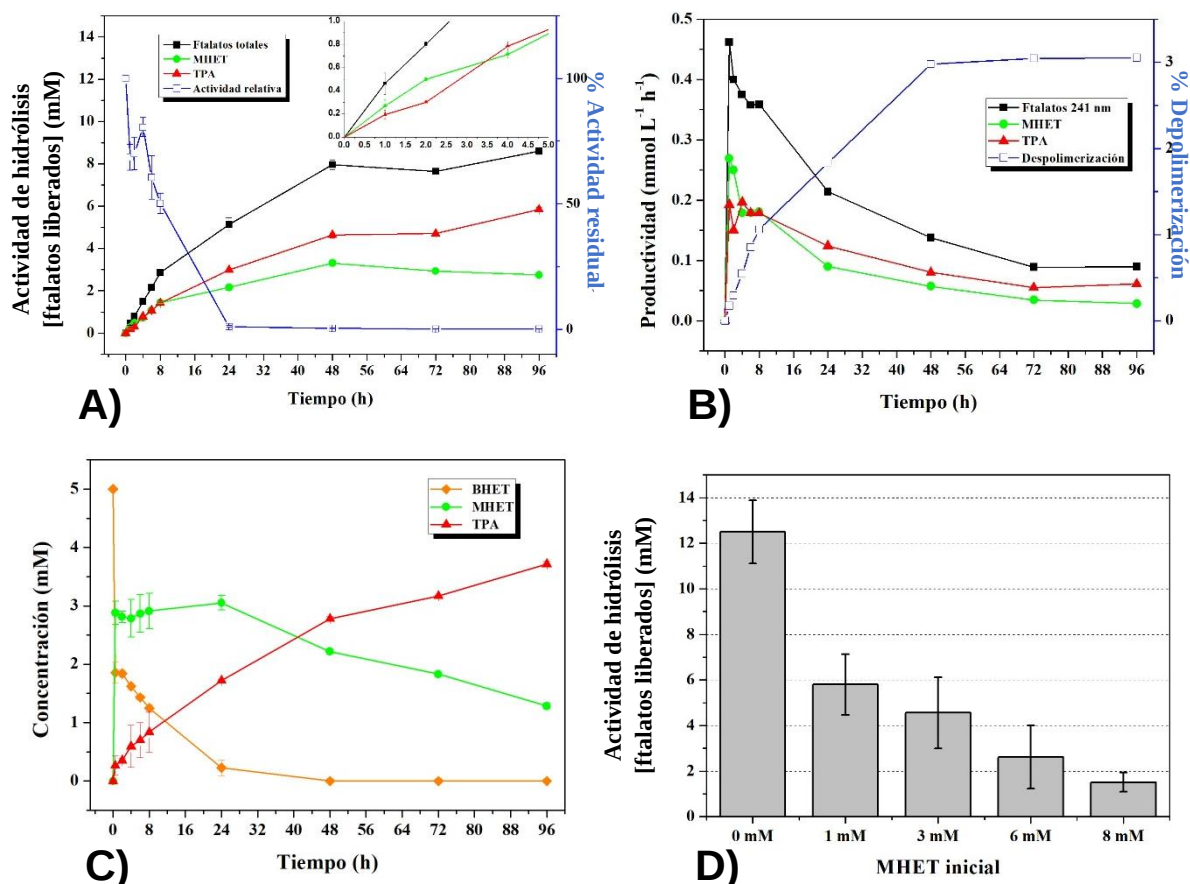


Figura 24. A) Avance de reacción en la producción de ftalatos durante la hidrólisis de PET-GF por ANCUT 1 en función del tiempo. En el aumento se observa el avance de reacción en un período de 0 a 5 h. En el segundo eje se presenta la actividad relativa de hidrólisis del pNPB ajustando inicialmente un valor de 10000 U/mL de ANCUT1 referenciadas al mismo sustrato. B) En el eje principal se muestra la productividad de ANCUT 1 en la formación de TPA, MHET y productos totales, no fue detectado BHET. En el eje secundario se presenta el grado de despolimerización de acuerdo con el valor de peso molecular del PET-GF reportado por Kawai, et al, 2022. C) Cinética de hidrólisis de 5 mM de BHET en ausencia de ANCUT 1. D) Efecto de [MHET] inicial en el medio de reacción después de 72 h. Las barras de error indican la desviación estándar de mediciones por triplicado (n = 3).

Previamente se discutió el posible mecanismo de acción endo y exo de ANCUT 1 durante la hidrólisis del PET, considerando la formación no solo de los monómeros TPA, MHET y BHET, sino también de oligómeros (Figura 23). En la cinética de reacción, se observa un incremento significativo en la concentración de ftalatos entre las 24 y 48 horas, periodo en el cual ANCUT 1 ha perdido su actividad.

Este aumento podría explicarse por la hidrólisis continua de oligómeros poco solubles, los cuales eventualmente se descomponen en ftalatos más solubles,

detectables mediante espectroscopía o HPLC. La hidrólisis de estos oligómeros pudo haber ocurrido por acción de las moléculas de ANCUT 1 adsorbidas o difundidas en el PET que permanecían activas. Alternativamente, podría atribuirse a la hidrólisis fisicoquímica provocada por las condiciones del medio de reacción. Este último planteamiento se respalda con la detección de ftalatos en concentraciones entre 20 y 80 μM (datos no mostrados) en los controles de reacción de hidrólisis de PET-GF sin enzima.

Por último, el tiempo de reacción seleccionado para posteriores experimentos fue de 72 h al no haber un incremento significativo de productos de reacción en tiempos posteriores.

10 Parte 1 B. Caracterización de los sustratos y evaluación de la fracción susceptible del PET-GF a hidrólisis por ANCUT 1.

10.1 Caracterización de los sustratos.

En esta sección se presenta la caracterización de los sustratos desde un punto de vista estructural, contemplando las zonas cristalinas y las microestructuras presentes en la fase amorfa: fase amorfa móvil y fase amorfa rígida (MAF y RAF, respectivamente, por sus siglas en inglés).

Tabla 19. Caracterización del PET-PC (botella) y referencias de PET cristalino y amorfo.

Sustrato	%Cristalinidad (DSC)	Tg (°C)	% trans _{total}	%RAF	%MAF
Botella (PET-PC)	35	ND	63.98	29.25	36.02
Biaxial (PET-BA)	35	ND	64.12	29.79	35.88
Amorfo (PET-GF)	8	72.79	61.26	53.73	38.74

RAF: Dominios *trans* en la fase amorfa. MAF: Dominios *gauche* en fase amorfa. PET-PC: PET post consumo. PET-BA: PET Biaxial (referencia de alta cristalinidad). PET-GF: PET Goodfellow® (referencia de baja cristalinidad).

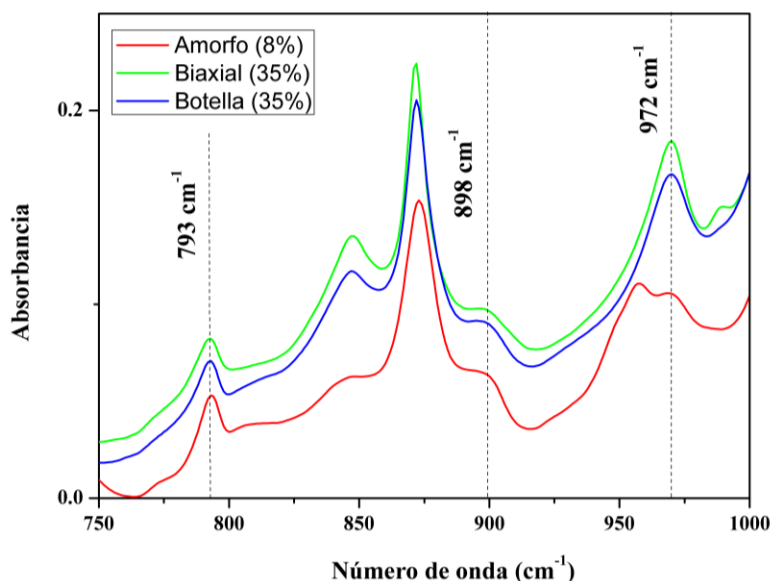


Figura 25. Espectro obtenido por ATR-FTIR. Se indican las señales de interés en la caracterización del PET en presentación de Botella (PET-PC), Biaxial (PET-BA) y Amorfo (PET-GF).

La distinción entre las zonas MAF y RAF resulta fundamental para determinar la fracción susceptible a hidrólisis por ANCUT 1. Múltiples autores (Khairul *et al*, 2022; Thomsen *et al.*, 2022a, 2022b; Thomsen *et al*, 2023) han caracterizado el PET y atribuyen la presencia de las zonas MAF a la degradación enzimática del polímero. Su planteamiento se basa en la presencia del ángulo de 60° (Figura 26) entre los grupos hidroxilo de la molécula de etilenglicol (EG). Este ángulo no favorece un alto grado de orden, a diferencia de las zonas RAF y cristalinas, que albergan el EG en una configuración *trans* con un ángulo de 180° (Figura 26). En el Anexo C (Figura 38) se plantea un esquema de la disposición de las cadenas de acuerdo con lo mencionado para hacer más visual la accesibilidad que tiene la presencia de una microestructura sobre la otra. Se ejemplifica la disposición *trans* del etilenglicol de acuerdo con lo mencionado por Sago *et al.*, 2013, estructura que favorece la formación de puentes de hidrógeno entre cadenas terminales e interacciones π - π entre los anillos aromáticos de cadenas vecinas.

Para la caracterización del PET se extrajeron y resumieron los datos obtenidos de DSC y ATR-FTIR. En ésta última técnica, la literatura cita señales (ANEXO D, Figura 37) como marcadores para diferenciar entre fracción *trans* _{total} (Cristalino + RAF) o *gauche* (MAF). Las de interés en el presente estudio son la señal a 973 cm⁻¹ relacionada con el estiramiento O-CH₂ del confórmero en *trans* del fragmento de EG en la molécula de PET. Por otro lado, la señal a 898 cm⁻¹ es atribuida al bamboleo del CH₂ en la conformación *gauche* del mismo fragmento (Figura 25)(Donelli *et al.*, 2009, 2010). La señal de referencia para la cuantificación fue a 793 cm⁻¹ (Walls, 1991). Al estar presentes los isómeros *trans* en las regiones cristalinas, se puede determinar el % Cri por una técnica distinta al IR, como la DSC para diferenciar entre zonas completamente cristalinas y las zonas RAF de la fracción *trans* total calculada por IR (ANEXO C, Figura 36) (Smole y Zipper, 2002; Donelli *et al*, 2010). Los resultados resumidos en la Tabla 19 muestran los perfiles de las microestructuras del PET-PC (post consumo), PET-BA (biaxial, referencia de alta cristalinidad) y PET-GF (Goodfellow® referencia de baja cristalinidad). Al comparar el PET-PC con las referencias nos damos cuenta de que este presenta un perfil similar al de un material

de alta cristalinidad, %Cri > 15 % (Thomsen *et al.*, 2024; Thomsen, Schubert, *et al.*, 2023).

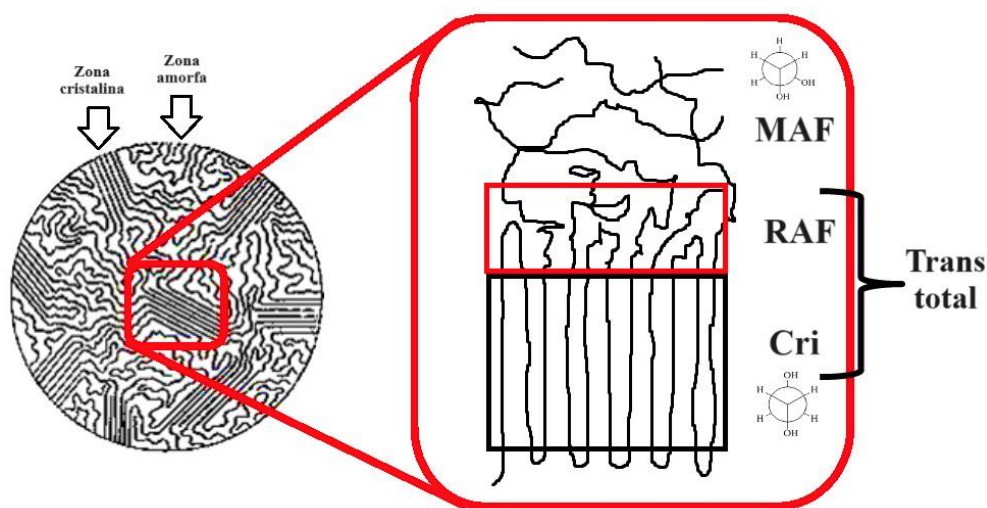


Figura 26. Distribución de las microestructuras del PET. En el recuadro rojo se representa un acercamiento para diferenciar entre la fase cristalina y diferenciar las zonas RAF y MAF de la fase amorfa. Se muestran las representaciones de Newman del etilenglicol mostrando el ángulo de 60° y 180° en las fases amorfa y cristalina respectivamente.

10.2 Identificación de la fracción del PET susceptible a hidrólisis por ANCUT

1.

Partiendo de la hipótesis donde las zonas MAF en el PET serán susceptibles a la hidrólisis por ANCUT 1, por la accesibilidad relacionada con el desorden de las cadenas del polímero, se procedió a evaluar el cambio en los parámetros %Cri, % *trans* total, % MAF y % RAF en el PET-GF. La Tabla 20 muestra el antes y después del tratamiento enzimático bajo las condiciones de tratamiento a 40 °C con Na⁺, 50 °C sin ion y a 60 °C con Mg²⁺ (condiciones con mayor producción de Ftalatos en sección: Efecto de la temperatura de reacción y la presencia de iones en el medio de reacción.).

En los 3 casos presentados se observa un incremento de la fracción *trans* total (%Cri + %X RAF) y la disminución de la fracción MAF. En la Tabla 20 se resalta en un recuadro rojo la mejor condición que fue a 50°C sin ion, donde hubo un incremento del 11.25 ± 0.35 % del *Trans* total y una disminución del 18.16 ± 0.56 % del MAF respecto al PET-GF antes del tratamiento enzimático. De acuerdo con la

conformación del EG que predomina en las fracciones cristalinas y amorfas, los resultados sugieren una selectividad preferencial de ANCUT 1 por la fracción amorfa, en específico la fracción MAF (Figura 27). Estos resultados permitieron asociar la mejor actividad de hidrólisis de ANCUT 1 cuando el sustrato de referencia contó con baja cristalinidad (% Cri < 15 %) y alto contenido de la fracción MAF, características que debe tener el PET-PC posterior al pretratamiento termomecánico (Thomsen *et al.*, 2022a, 2022b; Thomsen, Schubert, *et al.*, 2023).

Tabla 20. Cambios en la estructura del PET-GF antes y después del tratamiento con la enzima ANCUT 1 bajo las condiciones con mayor producción de ftalatos en la evaluación del efecto de la presencia de iones (40 °C con Na⁺, 50 °C sin ion y 60 °C con Mg²⁺).

Sustrato: PET-GF (amorfo)	(A) Antes de reacción	(B) 40 °C Na ⁺	(C) 50 °C sin ion	(D) 60 °C Mg ²⁺
% Trans _{total}	61.73 ± 0.54	64.98 ± 0.98	68.68 ± 0.13	63.89 ± 0.68
% Cri	6.58 ± 1.06	10.06 ± 1.22	8.82 ± 1.75	10.30 ± 0.22
% X _{RAF}	55.14 ± 1.23	54.92 ± 2.03	59.86 ± 1.62	53.60 ± 0.88
% X _{MAF}	38.27 ± 0.54	35.02 ± 0.98	31.32 ± 0.13	36.11 ± 0.68

Sustrato: PET-GF (amorfo)	(A) Antes de reacción	(B) Blanco 40 °C Na ⁺	(C) Blanco 50 °C sin ion	(D) Blanco 60 °C Mg ²⁺
% Trans _{total}	61.73 ± 0.54	60.45 ± 0.17	61.36 ± 0.49	60.52 ± 0.72
% Cri	6.58 ± 1.06	8.42 ± 1.48	8.28 ± 0.33	9.54 ± 0.95
% X _{RAF}	55.14 ± 1.23	48.18 ± 1.65	53.07 ± 0.16	50.98 ± 0.24
% X _{MAF}	38.27 ± 0.54	39.55 ± 0.17	38.64 ± 0.49	39.48 ± 0.72

Se resalta en un recuadro rojo la condición donde fue más evidente la disminución de la cristalinidad posterior a la reacción enzimática con ANCUT 1. En la tabla superior se presentan los resultados de la reacción de hidrólisis de PET con ANCUT 1. En la tabla inferior se presentan los datos de la reacción de hidrólisis en ausencia de ANCUT 1 (blanco de reacción).

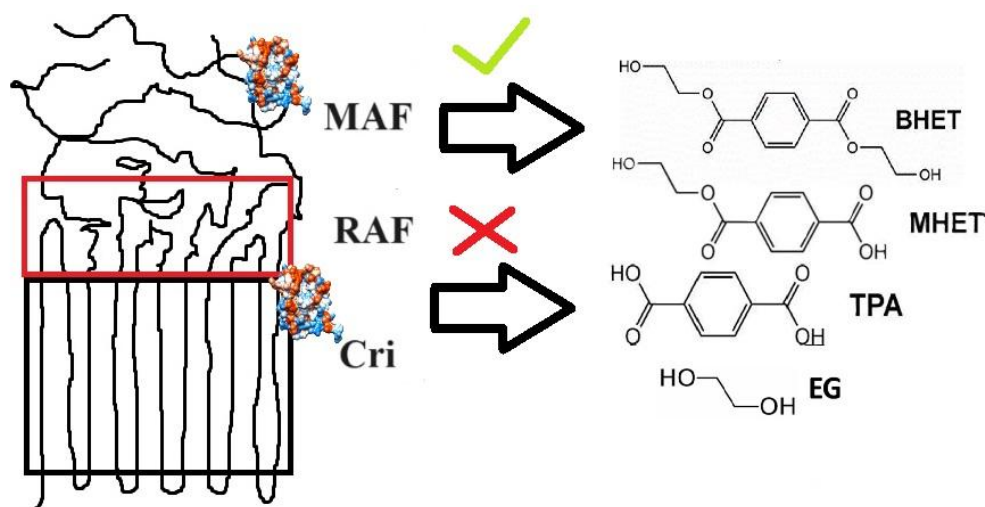


Figura 27. Representación de la zona del PET susceptible a hidrólisis por ANCUT 1 para la generación de los principales productos de reacción identificados. La presencia de estructuras con conformación MAF del etilenglicol promueven mayor movilidad entre cadenas del PET promoviendo al mismo tiempo la accesibilidad de ANCUT 1 para el ataque enzimático. La conformación RAF y núcleos ordenados con alta cristalinidad tienden a tener baja movilidad evitando la accesibilidad de ANCUT 1 entre las cadenas de PET. Elaboración propia.

11 Parte 2. Evaluación del efecto del pretratamiento termo-mecánico en PET-PC y evaluación de la actividad de ANCUT 1 frente al PET pretratado.

11.1 Efecto del pretratamiento termo-mecánico en el PET post consumo y caracterización.

La extrusión y criomolienda fueron los pretratamientos encontrados en la literatura (Tabla 8) que permiten abordar la hipótesis para la evaluación del desempeño de ANCUT 1 frente a un material de menor cristalinidad. Ante esto, se implementó un primer pretratamiento térmico al PET-PC. Los resultados del pretratamiento térmico se muestran en la Figura 28 donde se observan los patrones característicos de un material con baja o alta cristalinidad. Solo se puede distinguir el pico endotérmico del material relacionado con la transición térmica del material correspondiente al proceso de fusión.

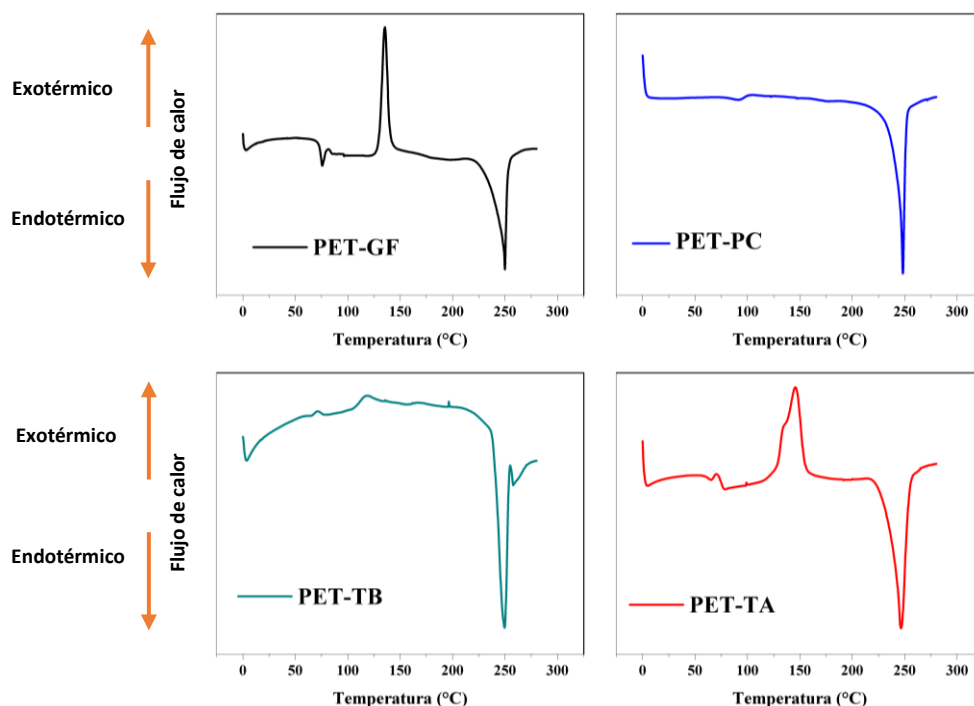


Figura 28. Efecto del tratamiento térmico de PETpost consumo de alta cristalinidad. Diagramas de DSC del PET-GF (Amorfo), PET-PC (Botella), PET-TA (tratamiento térmico enfriado rápidamente), PET-TB (tratamiento térmico enfriado lentamente).

Los diagramas DSC de materiales semi cristalinos, tienen la sensibilidad suficiente para detectar la T_g como un escalón, además de presentarse tanto el pico exotérmico como endotérmico correspondientes a los procesos de cristalización de la fase amorfa y fusión de la fase cristalina respectivamente. En el caso de materiales con alta cristalinidad solo se detecta el proceso de fusión de la fase cristalina pero no se tiene la suficiente sensibilidad del equipo para detectar la T_g .

Durante los ciclos de calentamiento/enfriamiento del pretratamiento térmico se obtuvieron 2 fracciones distintas de PET con características distintas. Una de estas fue opaca y blanca (PET-TB, Figura 29), material que fue enfriado lentamente y que, de acuerdo con los datos de caracterización, se favoreció el crecimiento de la fase cristalina. Por otro lado, un material amarillento-opaco (PET-TA, Figura 29) fue el que presentó un patrón DSC similar al del PET-GF (Figura 28) posterior al pretratamiento. Esto resalta la importancia del enfriamiento rápido en la metodología para favorecer la obtención de un material de baja cristalinidad. De la misma forma se muestra la caracterización de los materiales mencionados. Lo primero observable es el perfil de PET-TA comparado con el PET-PC, consiguiendo la

reducción del 71 % en la cristalinidad y el incremento del 20 % de la fracción MAF, susceptible a hidrólisis. Los resultados mostraron la capacidad del pretratamiento térmico del PET-PC para obtener un material similar a la referencia estudiada (PET-GF). Al comparar PET-TA contra PET-GF, también hubo un efecto favorable al haber un incremento del 11 % de la fracción MAF.

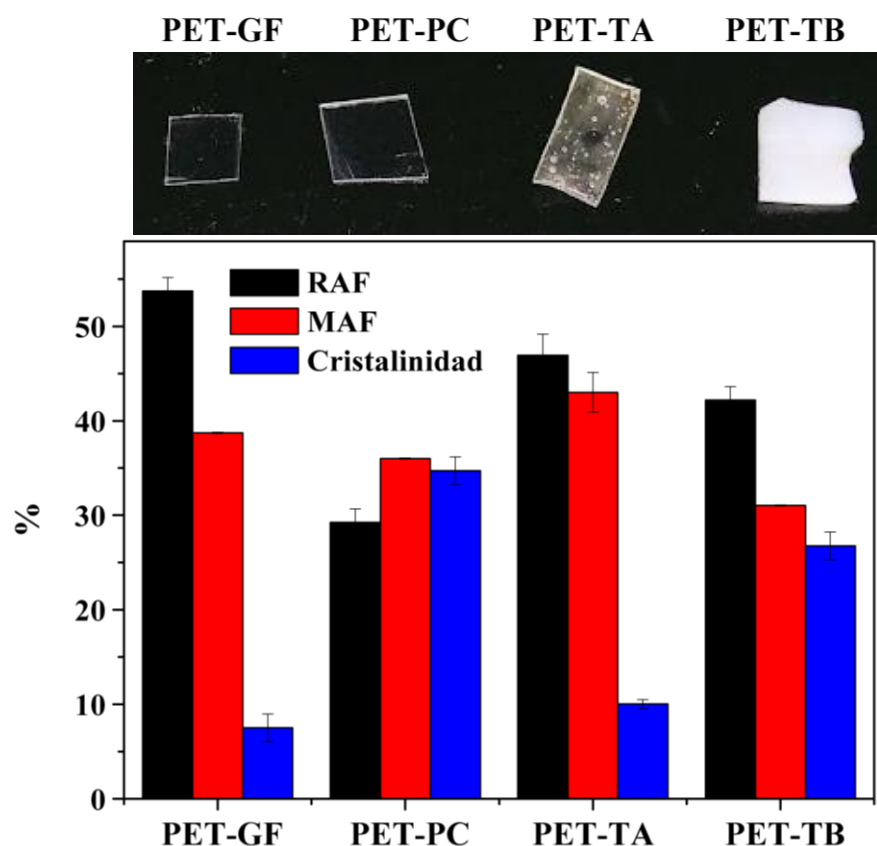


Figura 29. Porcentajes de las fracciones RAF, MAF y cristalina del material tratado térmicamente y de PET cristalino y amorfo de referencia obtenidos a través de los espectros de ATR-FTIR y DSC. El PET se encontraba en forma de láminas de ~ 5 x 5 mm (~ 7 mg c/u) para el análisis. En la parte superior se muestran los materiales de referencia y obtenidos a través del tratamiento térmico. PETGF: referencia de baja cristalinidad; PET.PC: botella; PET-TA: tratado térmicamente y enfriado rápido; PET-TB: tratado térmicamente y enfriado lento.

Como segundo pretratamiento se procedió con la crio-molienda con el uso del N₂ (1) agente criogénico. Los perfiles comparativos entre los sustratos antes y después de la crio molienda se presentan en la Figura 30. Es necesario aclarar que se contó con los sustratos en láminas para su molienda (PET-PC, PET-GF y PET-TA [Llamado PET-T desde ahora]) y nos fueron proporcionadas 2 presentaciones de PET en polvo (3A y 1A) los cuales procedieron por molienda sin pretratamiento con N₂. El PET de 1A es proveniente de botellas sin color y se obtiene un polvo blanco

con tamaño de partícula < Tamiz 40. Por otro lado, el PET de 3A es proveniente de materiales variados, y es obtenido un polvo con tono crema con una distribución heterogénea del tamaño de partícula. Ambos materiales presentaron una elevada cristalinidad, 40.64 ± 0.82 % y 48 ± 0.39 % (Figura 30A) y una baja fracción MAF 32.89 ± 1.13 % y 32.55 ± 0.31 % (Figura 30D), respectivamente. Esto, comparado con el PET-PC tratado con N_2 resultó en una cristalinidad del 39.12 ± 0.47 % y fracción MAF del 35.96 ± 0.58 %.

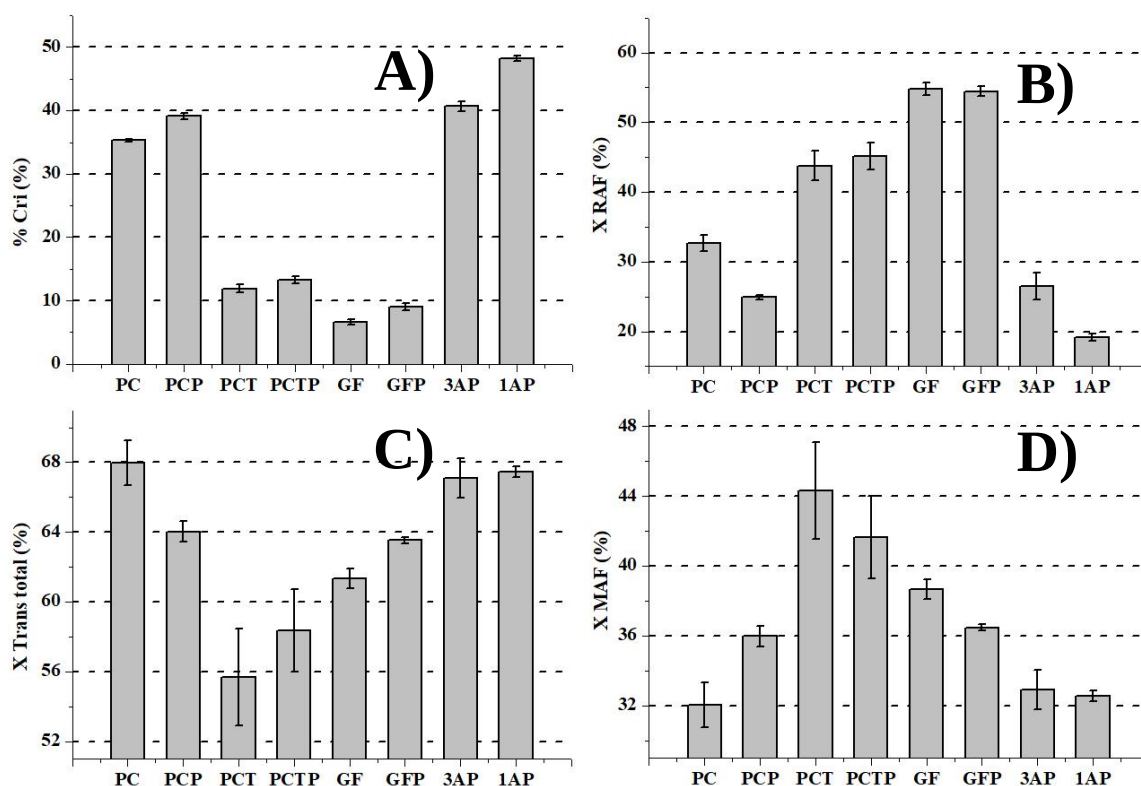


Figura 30. Efecto de la molienda con temperatura controlada. Perfil de la cristalinidad y microestructuras de las presentaciones evaluadas de PET antes y después de la crio-molienda. Fracciones determinadas a través de ATR-FTIR (X RAF, X MAF y X trans total) y DSC (% CrI). PC: PET post-consumo (lámina); PCP: PET post-consumo (polvo); PCT: PET post-consumo tratado térmicamente (lámina); PCTP: PET post-consumo tratado térmicamente (polvo); GF: PET referencia de baja cristalinidad (lámina); GFP: PET referencia de baja cristalinidad (polvo); 3AP: PET de tercera molido industrialmente; 1AP: PET de primera molido industrialmente. Las barras de error indican la desviación estándar de mediciones por triplicado (n=3).

Este comparativo permite ver el efecto de la fricción de las aspas en la molienda, siendo que al no pretratar el material con N_2 , la cristalinidad del material incrementa considerablemente. En el caso de las comparaciones de los sustratos en lámina con los respectivos polvos obtenidos, se esperaba que no hubiera un cambio significativo en los perfiles de estos, atribuido al pretratamiento con N_2 (1).

Esto fue cierto para las muestras (PET-PC, PET-GF y PET-T) observando la cristalinidad y en la fracción RAF y MAF para PET-PC y PET-T sin haber diferencia significativa. La excepción fue con PET-PC en las fracciones RAF y MAF, donde el cambio es evidente y si hubo diferencia significativa posterior a la molienda. Algo similar fue observado por Tournier *et al.*, 2020, quienes vieron una disminución en la cristalinidad de PET de alta cristalinidad en un proceso de micronización. Esto puede deberse al efecto de corte de las aspas, que al ir disminuyendo el tamaño de partícula se tenga una exposición de las fracciones MAF y RAF rodeadas por regiones de alta cristalinidad.

11.2 Evaluación de la actividad de ANCUT 1 en la hidrólisis del PET pretratado.

En esta sección se evalúa el desempeño de ANCUT 1 bajo las mejores condiciones de hidrólisis determinadas en la Parte 1 (Tabla 18), frente a las distintas presentaciones de PET discutidas en la sección anterior.

La Figura 31 muestra la cantidad de ftalatos producidos a las 72 h de reacción con relación a la cristalinidad inicial del sustrato (lámina o polvo). La relación evidente observada fue la mayor producción de Ftalatos al partir de sustratos con baja cristalinidad y de estos, se vio favorecido al haber sido reducido el tamaño de partícula. De tal forma que el PET-GF al ser molido incrementó 3 veces la cantidad de ftalatos producidos, en el caso del PET-PCT los productos incrementaron 4 veces respecto a la lámina y en el PET-PC la molienda le favoreció al incrementar 200 veces la concentración de ftalatos. Estos resultados se relacionan con la cantidad de la fracción MAF obtenida posterior a la crio molienda, siendo así un factor primordial en ANCUT 1 para proceder con la hidrólisis del sustrato.

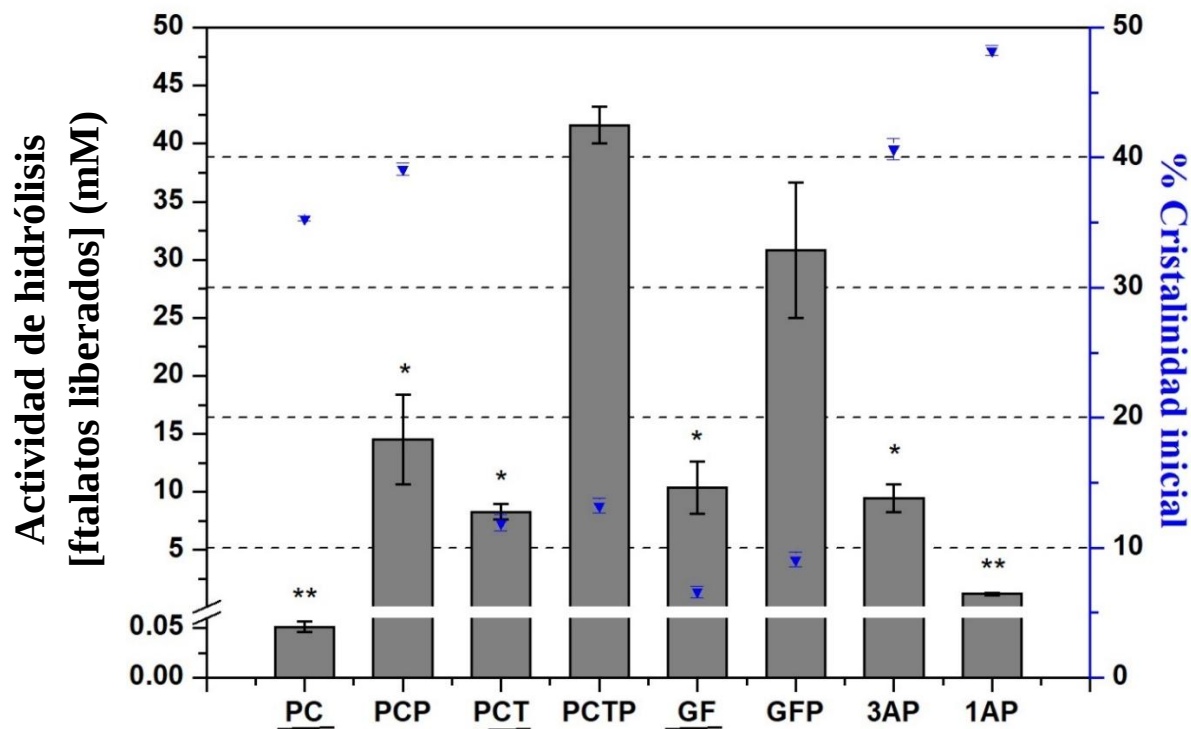


Figura 31. Producción de ftalatos en la hidrólisis por ANCUT 1 de PET en láminas y molido. Cuantificación espectrofotométrica con $Abs_{241\text{ nm}}$. Las barras de error indican la desviación estándar de mediciones por triplicado ($n=3$). PC: PET post-consumo (lámina); PCP: PET post-consumo (polvo); PCT: PET post-consumo tratado térmicamente (lámina); PCTP: PET post-consumo tratado térmicamente (polvo); GF: PET referencia de baja cristalinidad (lámina); GF: PET referencia de baja cristalinidad (polvo); 3AP: PET de tercera molido industrialmente; 1AP: PET de primera molido industrialmente. Mismos asteriscos muestran que no hay diferencia significativa entre las medias de las muestras con $P < 0.05$.

En la Figura 32 se observan los porcentajes de productos adicionales cuantificados por espectrofotometría respecto al método HPLC (triángulos rojos). Esto refuerza la idea de la presencia de moléculas que absorben a la longitud de 241 nm en el UV. De acuerdo con esto, ANCUT 1 solo a través de cortes endo en la cadena polimérica podría formar oligómeros atribuibles a los picos vistos a mayores tiempos de retención en el HPLC (12 a 12.5 min), así como cortes exo, al ser posible la cuantificación de productos solubles a los 30 min de reacción posibles al reconocer las cadenas terminales presentes en la superficie (Figura 24A).

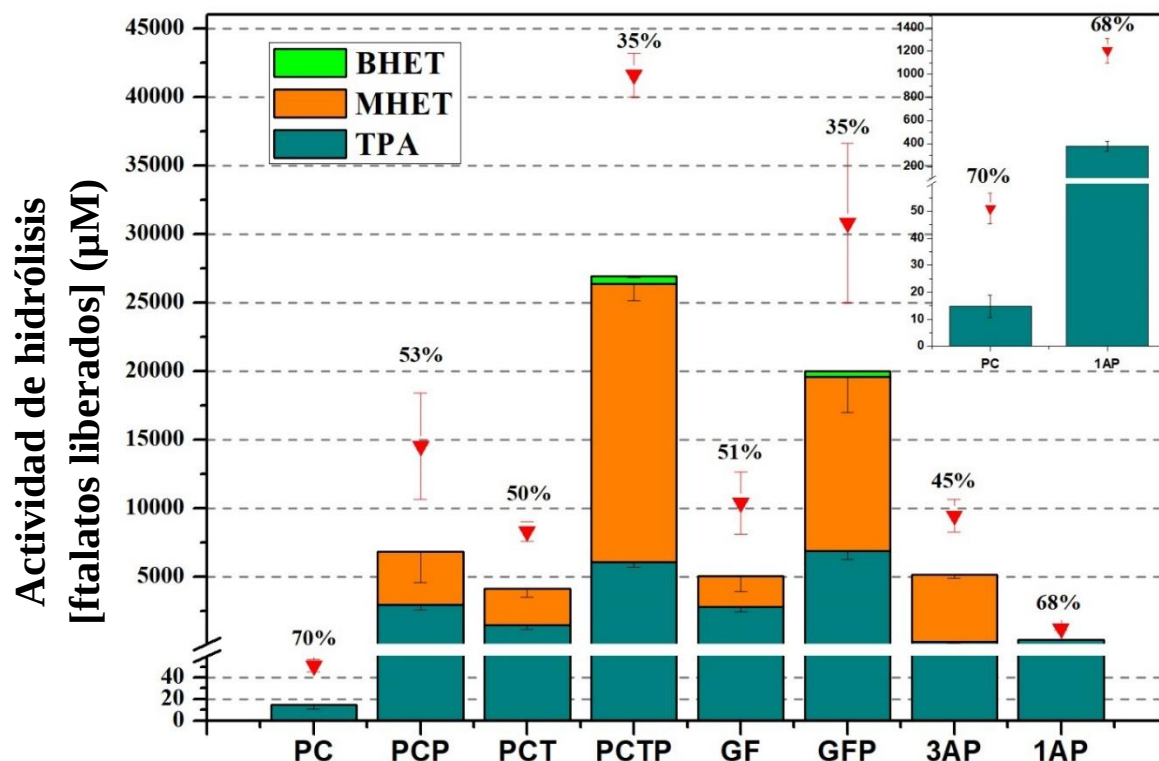


Figura 32. Producción de ftalatos en la hidrólisis por ANCUT 1 de PET en láminas y molido. Cuantificación espectrofotométrica con $Abs_{241\text{ nm}}$ (triángulos rojos) y por HPLC (barras). Los porcentajes indican la cantidad de productos adicionales cuantificados por absorbancia respecto a lo cuantificado en HPLC. Las barras de error indican la desviación estándar de mediciones por triplicado ($n=3$). PC: PET post-consumo (lámina); PCP: PET post-consumo (polvo); PCT: PET post-consumo tratado térmicamente (lámina); PCTP: PET post-consumo tratado térmicamente (polvo); GF: PET referencia de baja cristalinidad (lámina); GF: PET referencia de baja cristalinidad (polvo); 3AP: PET de tercera molido industrialmente; 1AP: PET de primera molido industrialmente. Mismos asteriscos muestran que no hay diferencia significativa entre las medias de las muestras con $P < 0.05$.

Tanto en la cuantificación por espectrofotometría como por RP-HPLC se utilizó TPA como estándar externo debido a la mejor estabilidad frente a MHET y BHET en medio acuoso a pH 9, los cuales son susceptibles a hidrólisis a pH alcalinos y ácidos respectivamente (de Queiros *et al.*, 2022). En la literatura se indica que los monómeros TPA, MHET y BHET tienen el mismo coeficiente de extinción molar (Pirillo *et al.*, 2021), por lo que a través de la elaboración de curvas de absorbancia a 241 nm de estos tres monómeros se corroboró la cercanía de las pendientes de regresión apoyando la decisión de trabajar con TPA como estándar externo (Anexos F). En el Anexo G, Figura 47 se presentan los cromatogramas amplificados de las muestras cuantificadas en esta sección junto con los respectivos blancos de reacción. En la Figura 33 se muestran los picos de los productos de reacción TPA (~6 min), MHET (~7.5 min) y de productos no identificados (12, 12.5,

13.2 y 14 min). Para la cuantificación de productos se consideraron las señales de los productos TPA, MHET y BHET usando como referencia al TPA para la curva de calibración.

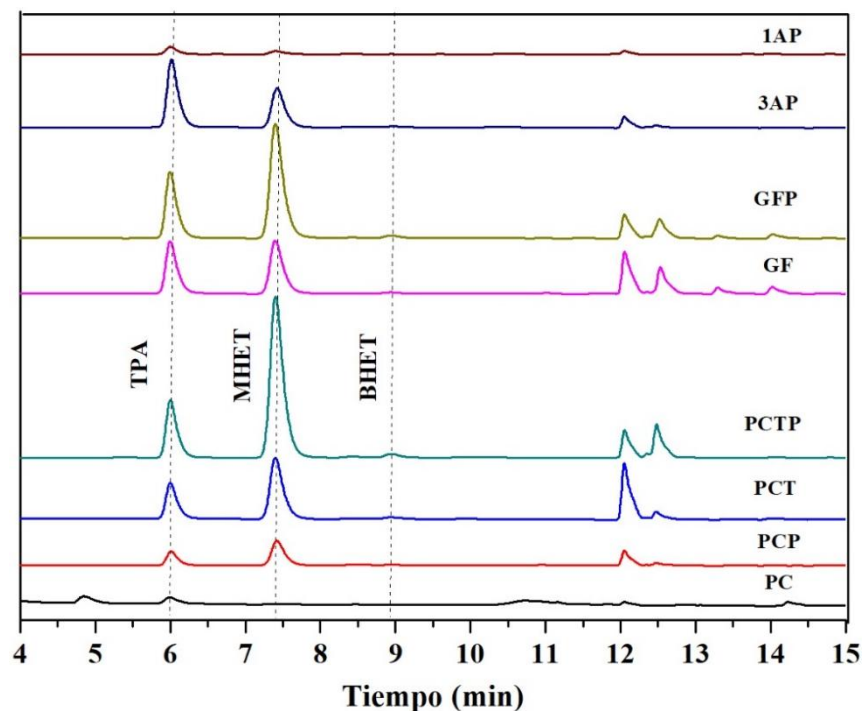


Figura 33. Cromatogramas de la producción de ftalatos en la hidrólisis de PET por ANCUT 1. PC: PET post-consumo (lámina) 1:2; PCP: PET post-consumo (polvo) 1:200; PCT: PET post-consumo tratado térmicamente (lámina) 1:100; PCTP: PET post-consumo tratado térmicamente (polvo) 1:100; GF: PET referencia de baja cristalinidad (lámina) 1:100; GF: PET referencia de baja cristalinidad (polvo) 1:100; 3AP: PET de tercera molido industrialmente 1:100; 1AP: PET de primera molido industrialmente 1:50. Blancos no se diluyeron excepto G), 1:100. El análisis se llevó a cabo en un sistema HPLC Infinity 1260 de Agilent® equipado con una columna C18, el volumen de inyección fue de 10 μ L. El análisis procedió con un gradiente isocrático, flujo de 0.5 mL/min, fase móvil de A: 0.5 % ácido acético en agua y B: acetonitrilo y detector UV-visible.

12 Conclusiones

En este trabajo se destacó la importancia de modificar las propiedades fisicoquímicas del PET para favorecer una estructura más accesible y elevada área superficial combinado con las condiciones de reacción para mejorar la eficiencia de la hidrólisis enzimática.

Las mejores condiciones para la hidrólisis del PET a escala de laboratorio se lograron utilizando un amortiguador Tris-HCl a 50 mM, pH 9, 800 rpm, con 200 mg de PET y 10,000 U/mL de ANCUT 1.

Se identificaron tres productos principales de la hidrólisis: TPA, MHET y, en menor medida, BHET a través de técnicas cuantitativas y cualitativas. Destacando el efecto inhibitorio del MHET.

Se identificó que la fracción MAF del PET fue la más susceptible a hidrólisis por ANCUT 1 al observar un incremento del 11.25 ± 0.35 % de la fracción *Trans*_{total} y la disminución del 8.16 ± 0.56 % en la fracción MAF.

Se evidenció la importancia de trabajar con PET de baja cristalinidad (6-12%) y alta fracción amorfa (38-42%) para mejorar la eficiencia ANCUT 1-sustrato destacando el efecto de los pretratamientos.

El pretratamiento termo-mecánico permitió reducir la cristalinidad del PET-PC en un 71% (34 % a 10 %) y aumentar la fracción amorfa en un 11% (38.72 % a 43.5 %). Además, el pretratamiento de crio-molienda resultó en un aumento significativo de los monómeros del PET. Para PET-PCP (200 veces), PET-PCTP (~4 veces) y PET-GFP (~3 veces) comparados con la presentación en lámina.

La adición de iones magnesio permitió un incremento en la temperatura de reacción de 10 °C, por arriba de los 50 °C reportada previamente como la temperatura de trabajo. Esto sugiere un papel de este ion en mejorar la termoestabilidad de ANCUT 1. No obstante, se observó una inhibición significativa de la actividad de hidrólisis por la acumulación de MHET, lo cual representa un desafío en su aplicación a gran escala.

Los resultados alcanzados con ANCUT 1 indican que es una candidata idónea en el proceso de reciclaje biotecnológico del PET para aportar soluciones amigables con el ambiente necesarias hoy en día.

Perspectivas.

Algunos de los aspectos no dilucidados en el presente trabajo fueron:

Identificar los productos eluídos en HPLC a tiempos de retención entre 12 y 13 min a través de la técnica de espectrometría de masas.

Diseño de estrategias para reducir la inhibición por MHET.

Realizar estudios a nivel de ingeniería de proteínas relativo con el ion magnesio para mejorar la estabilidad a temperaturas cercanas a la Tg como por ejemplo la modificación de los sitios de unión a magnesio (70 - 80 °C).

Realizar estudios a mayor escala para evaluar para evaluar otros factores como agitación y pH.

13 Referencias.

- Arnal, G., Anglade, J., Gavaldà, S., Tournier, V., Chabot, N., Bornscheuer, U. T., Weber, G., & Marty, A. (2023). Assessment of Four Engineered PET Degrading Enzymes Considering Large-Scale Industrial Applications. *ACS Catalysis*, 13(20), 13156–13166. <https://doi.org/10.1021/acscatal.3c02922>
- Armas Pacheco, Francisco Antonio. (2014). Síntesis de poliésteres biodegradables derivados del ácido tereftálico y ácido adípico con 1,4-butanodiol. Tesis de grado. Facultad de ciencias, Universidad central de Venezuela.
- Avilan, L., Lichtenstein, B. R., König, G., Zahn, M., Allen, M. D., Oliveira, L., Clark, M., Bemmer, V., Graham, R., Austin, H. P., Dominick, G., Johnson, C. W., Beckham, G. T., McGeehan, J. E., & Pickford, A. R. (2023). Concentration-Dependent Inhibition of Mesophilic PETases on Poly(ethylene terephthalate) Can Be Eliminated by Enzyme Engineering. *ChemSusChem*, 16(8), e202202277. <https://doi.org/10.1002/CSSC.202202277>
- Bastida, C. M. (2018). Detección e identificación de la cutinasa ANCUT4 de *Aspergillus nidulans* PW1. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Bauer, S.; Vasu, P.; Staffan, P.S.; Mort, A.J. y Somerville, C-R. (2006). Development and application of a suite of polysaccharide degrading enzymes for analyzing plant cell walls. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. (103): 11417-11422.
- Bermúdez García, E.P. (2020). Regulación transcripcional del sistema cutinólico en *Aspergillus nidulans*. Tesis de Doctorado en Ciencias. Facultad de Química, UNAM.
- Brackmann, R., Cláudia De Oliveira Veloso, ·, Machado De Castro, A., Antunes, M., & Langone, P. (2023). Enzymatic post-consumer poly(ethylene terephthalate) (PET) depolymerization using commercial enzymes. 3 *Biotech*, 13(135). <https://doi.org/10.1007/s13205-023-03555-6>
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72(1-2), 248-254.
- Brizendine, R. K., Erickson, E., Haugen, S. J., Ramirez, K. J., Miscall, J., Salvachúa, D. y Beckham, G. T. (2022). Particle size reduction of poly (ethylene terephthalate) increases the rate of enzymatic depolymerization but does not increase the overall conversion extent. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 10(28), 9131-9140.
- Carniel, A., Valoni, É., Junior, J. N., da Conceição Gomes, A., y de Castro, A. M. (2017). Lipase from *Candida antarctica* (CALB) and cutinase from *Humicola insolens* act synergistically for PET hydrolysis to terephthalic acid. *Process Biochemistry*, 59, 84-90.
- Castro-Ochoa, L.D.; Peña-Montes, C.; González-Canto, A.; Alva-Gasca, A.; Esquivel- Bautista, R.; Navarro-Ocaña, A. y Farrés, A. (2012). ANCUT2, an extracellular cutinase from *Aspergillus nidulans* induced by olive oil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(5), 1275-1290.
- Castro-Rodríguez, J. A., Rodríguez-Sotres, R., y Farrés, A. (2023). Determinants for an Efficient Enzymatic Catalysis in Poly(Ethylene Terephthalate) Degradation. *Catalysis*, 13(3), 591.
- Castro-Rodríguez, J.A. (2017). Mejoramiento de la producción de la cutinasa ANCUT1 utilizando el sistema de *Pichia pastoris*. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM.
- Chen, S.; Tong, X.; Woodard, R.W.; Du, G.; Wu, J. y Chen, J. (2008). Identification and characterization of bacterial cutinase. *Journal of Biological Chemistry*. 283(38).
- Cheng, Y., Cheng, Y., Zhou, S., Ruzha, Y., & Yang, Y. (2024). Closed-loop recycling of PET fabric and bottle waste by tandem pre-amorphization and enzymatic hydrolysis. *Resources, Conservation and Recycling*, 208, 107706. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2024.107706>

- Ciuffi, B., Fratini, E., & Rosi, L. (2024). Plastic pretreatment: The key for efficient enzymatic and biodegradation processes. *Polymer Degradation and Stability*, 222, 110698. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMDEGRADSTAB.2024.110698>
- Damayanti, & Wu, H.-S. (2021). Strategic Possibility Routes of Recycled PET. *Polymers*, 13(9), 1475. <https://doi.org/10.3390/polym13091475>
- de Queiros Eugenio, E., Sampaio Pereira Campisano, I., Guimarães Dias, A., Machado de Castro, A., Alice Zarur Coelho, M., & Antunes Pereira Langone, M. (2022). Novel efficient enzymatic synthesis of the key-reaction intermediate of PET depolymerization, mono(2-hydroxyethyl terephthalate)-MHET.
- Demirel, B., Yaras, A. y Elcicek, H. (2011). Crystallization Behavior of PET Materials. *BAÜ Fen Bil. Enst. Derg. Cilt.*, 13, 26–35.
- Donelli, I., Freddi, G., Nierstrasz, V. A., & Taddei, P. (2010). Surface structure and properties of poly-(ethylene terephthalate) hydrolyzed by alkali and cutinase. *Polymer Degradation and Stability*, 95(9), 1542–1550. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.06.011>
- Donelli, I., Taddei, P., Smet, P. F., Poelman, D., Nierstrasz, V. A., & Freddi, G. (2009). Enzymatic surface modification and functionalization of PET: A water contact angle, FTIR, and fluorescence spectroscopy study. *Biotechnology and Bioengineering*, 103(5), 845–856. <https://doi.org/10.1002/bit.22316>
- Du, G.C.; Zhang, S.L.; Hua, Z.Z.; Zhu, Y. y Chen, J. (2007). Enhanced cutinase production with *Termobifida fusca* by two-stage pH control strategy. *Biotechnology Journal*. 133, 942-951.
- Dutta, K.; Sen, S. y Veeranki, V.D. (2009). Production, characterization and applications of microbial cutinases. *Process Biochemistry*;44:127–34.
- Egmond, M. R., & de Vlieg, J. (2000). *Fusarium solani pisi* cutinase. *Biochimie*, 82(11), 1015-1021.
- Ellis, L. D.; Rorrer, N. A.; Sullivan, K. P.; Otto, M.; McGeehan, J. E.; Román-Leshkov, Y.; Wierckx, N. y Beckham, G. T. (2021). Chemical and biological catalysis for plastics recycling and upcycling. *Nature Catalysis*. 4, 539–556.
- Esqueda-Domínguez, K.L. (2012). Producción, identificación y caracterización de una cutinasa de *Aspergillus nidulans* PW1. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM.
- Falkenstein, P., Gräsing, D., Bielytskyi, P., Zimmermann, W., Matysik, J., Wei, R., & Song, C. (2020). UV Pretreatment Impairs the Enzymatic Degradation of Polyethylene Terephthalate. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00689>
- Farah, S. (2015). Poly(Ethylene Terephthalate) Based Blends, Composites and Nanocomposites || Molecular Weight Determination of Polyethylene Terephthalate. *William Andrew Publishing*. 143–165.
- Fontes, T. y Alves, G. (2009). Cutinases: properties and industrial applications. *Advances in Applied Microbiology*. (66): 77-95.
- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Cuomo, C., Ma, L. J., Wortman, J. R., Batzoglou, S. y Birren, B. W. (2005). Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature*, 438(7071), 1105-1115.
- Giraldo-Narcizo, S., Guenani, N., Sánchez-Pérez, A. M., y Guerrero, A. (2023). Accelerated Polyethylene Terephthalate (PET) Enzymatic Degradation by Room Temperature Alkali Pre-treatment for Reduced Polymer Crystallinity. *ChemBioChem*, 24(1).
- Hiscock, S.J.; Dewey, F.M.; Coleman, J.O.D. y Dickinson, H.G. (1994). Identification and localization of an active cutinase in the pollen of *Brassica napus* L. *Planta*. (193): 377-384.
- Jaeger, K. E.; Dijkstra, B. W. y Reetz, M. T. (1999). Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *A. Reviews in Microbiology*., 53(1), 315-351

- Jain, A. K., y Gupta, V. B. (1990). An infrared spectroscopic study of molecular orientation in heat-set poly (ethylene terephthalate) yarn using attenuated total reflection technique. *Journal of Applied Polymer science*, 41(11-12), 2931-2939.
- Kawai, F., Furushima, Y., Mochizuki, N., Muraki, N., Yamashita, M., Iida, A. y Kitajima, S. (2022). Efficient depolymerization of polyethylene terephthalate (PET) and polyethylene furanoate by engineered PET hydrolase Cut190. *Amb Express*, 12(1), 134.
- Kawai, F., Kawabata, T., & Oda, M. (2019). Current knowledge on enzymatic PET degradation and its possible application to waste stream management and other fields. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2019 103:11, 103(11), 4253–4268. <https://doi.org/10.1007/S00253-019-09717-Y>
- Kawai, F.; Oda, M.; Tamashiro, T.; Waku, T.; Tanaka, N.; Yamamoto, M.; Mizushima, H.; Miyakawa, T. y Tanokura, M. (2014). A novel Ca^{2+} -activated, thermostabilized polyesterase capable of hydrolyzing polyethylene terephthalate from *Saccharomonospora viridis* AHK 190. *Appl. Microbial Biotechnology*. 98, 10053–10064.
- Kaza, S.; Yao, L. C.; Bhada-Tata, P.; Van Woerden, F. (2018). What a Waste 2.0 : A Global Snapshot of Solid Waste Management to 2050. Urban Development; Washington, DC: World Bank. © World Bank. Recuperado el 17 de octubre de 2022, de <https://openknowledge.worldbank.org/handle/10986/30317>
- Khairul Anuar, N.F.S.; Huyop, F.; Ur-Rehman, G.; Abdullah, F.; Normi, Y.M.; Sabullah, M.K. y Abdul Wahab, R. (2022). An Overview into Polyethylene Terephthalate (PET) Hydrolases and Efforts in Tailoring Enzymes for Improved Plastic Degradation. *International Journal of Molecular Sciences*. 23, 12644.
- Khan, A., Naveed, M., Aayanifard, Z., & Rabnawaz, M. (2022). Efficient chemical recycling of waste polyethylene terephthalate. *Resources, Conservation and Recycling*, 187, 106639. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2022.106639>
- Kol, R., Roosen, M., Ügdüler, S., M. Van Geem, K., Ragaert, K., S. Achilias, D., & De Meester, S. (2021). Recent Advances in Pre-Treatment of Plastic Packaging Waste. In *Waste Material Recycling in the Circular Economy - Challenges and Developments*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.99385>
- Kolattukudy, P. E. (1980). Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. *Science*, 208(4447), 990-1000.
- Kushwaha, A., Goswami, L., Singhvi, M., y Kim, B. S. (2023). Biodegradation of poly (ethylene terephthalate): mechanistic insights, advances, and future innovative strategies. *Chemical Engineering Journal*, 457, 141230.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259):680-685.
- Liang, X. y Zou, H. (2022). Biotechnological Application of Cutinase: A Powerful Tool in Synthetic Biology. *SynBio*, 1(1), 54-64.).
- Lin, T.S. y Kolattukudy, P.E. (1980). Isolation and characterization of a cuticular polyester (cutin) hydrolyzing enzyme from phytopathogenic fungi. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. (17): 1 -15.
- Lovera-Espinosa, D. y Torres-Jiménez, M.K. (2019). Optimización de condiciones para mejorar la producción y degradación del tereftalato de Polietileno (PET) por la cutinasa anc3 expresada en *Pichia pastoris*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Lu, H., Diaz, D. J., Czarnecki, N. J., Zhu, C., Kim, W., Shroff, R., y Alper, H. S. (2022). Machine learning-aided engineering of hydrolases for PET depolymerization. *Nature*, 604(7907), 662-667.
- Maeda, H.; Youhei, Y.; Keietsu, A.; Fumihiko, H.; Masayuki, M.; Ryoji, I.; Katsuya, G. y Tasuku, N. (2002). Purification and characterization for a biodegradable plastic-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 67(1): 778-788.

- Maiti, I. B.; Kolattukudy, P. E. y Shaykh, M. (1979). Purification and characterization of a novel cutinase from *Nasturtium (Tropaeolum majus)* pollen. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. (196): 412-423.
- Martinez, C.; Geus, P.; Lauwereyes, M.; Matthyssens, G. y Cambillau, C. (1992). *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. *Nature*. 356: 615-618
- Masaki, K.; Kamini, N.R.; Ikeda, H. y Lefuji, H. (2005). Cutinase-like enzyme from the yeast *Cryptococcus sp.* strain S-2 hydrolyzes polylactic acid and others biodegradable plastics. *Applied and Environmental Microbiology Journal*. 71(11), 7548-7550.
- Miyakawa, T., Mizushima, H., Ohtsuka, J., Masayuki, O., Kawai, F. y Tanokura, M. (2015). Structural basis for the Ca^{2+} -enhanced thermostability and activity of PET-degrading cutinase-like enzyme from *Saccharomonospora viridis* AHK190. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99, 4297–4307.
- Morales-García, S.L. (2018). Degradación de Polietilen tereftalato (PET) con las cutinasas recombinantes ANCUT1 y ANCUT2 de *Aspergillus nidulans*. Tesis de Maestría en Ciencias, UNAM, Posgrado en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química.
- Müller, R.J. (2005). Biodegradability of polymers: regulations and methods for testing. In: Steinbüchel A, editor. *Biopolymers*, vol. 10. Weinheim: Wiley-VCH.
- Nawanni N, Singh R y Kaur J. (2006). Immobilization and stability Studies of a lipase from thermophilic *Bacillus sp.* The effect of process parameters on immobilization of enzyme. *Electronic Journal Biotechnology*. 9(5):559-565.
- Neves-Petersen, M. T., Fojan, P. y Petersen, S. B. (2001). How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. *Journal of Biotechnology*. 85(2), 115-147.
- O'Neill, A., Araújo, R., Casal, M., Guebitz, G., & Cavaco-Paulo, A. (2007). Effect of the agitation on the adsorption and hydrolytic efficiency of cutinases on polyethylene terephthalate fibres. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(7), 1801–1805. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.02.012>
- Oda, M., Yamagami, Y., Inaba, S., Oida, T., Yamamoto, M., Kitajima, S., y Kawai, F. (2018). Enzymatic hydrolysis of PET: Functional roles of three Ca^{2+} ions bound to a cutinase-like enzyme, Cut190*, and its engineering for improved activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 10067-10077.
- Patel, A., Chang, A. C., Perry, S., Soong, Y.-H. V., Ayafor, C., Wong, H.-W., Xie, D., & Sobkowicz, M. J. (2022). Melt Processing Pretreatment Effects on Enzymatic Depolymerization of Poly(ethylene terephthalate). *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 10(41), 13619–13628. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.2c03142>
- Peltzer, M. A., y Simoneau, C. (2013). Report of an interlaboratory comparison from the European Reference Laboratory for Food Contact Materials. *Publications Office of the European Union: Luxembourg*.
- Pirillo, V., Pollegioni, L., y Molla, G. (2021). Analytical methods for the investigation of enzyme-catalyzed degradation of polyethylene terephthalate. *The FEBS Journal*, 288(16), 4730–4745. <https://doi.org/10.1111/febs.15850>
- Purdy, R.E. y Kolattukudy, P.E. (1973). Depolymerization of a hydroxy fatty acid biopolymer, cutin, by an extracellular enzyme from *Fusarium solani f. pisi* isolation and some properties of the enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 159, 61 -69.
- Ribitsch, D.; Acero, E. H.; Greimel, K.; Eiteljoerg, I.; Trotscha, E.; Freddi, G.; Schwab, H.; Guebitz, G. M. (2012). Characterization of a new cutinase from *Thermobifida alba* for PET-surface hydrolysis. *Biocatalysis and Biotransformation*. 30, 2–9.
- Ronqvist, Å.M.; Xie, W.; Lu, W. y Gross, R.A. (2009). Cutinase-catalyzed hydrolysis of poly(ethylene terephthalate). *Macromolecules* 42:5128–5138

- S&P Global. Commodity insights. (2021). PET Polymer: Chemical Economics Handbook; IHS Markit. Recuperado en 30 de octubre del 2022, de: <https://ihsmarkit.com/products/pet-polymer-chemical-economicshandbook.html>
- Sago, T., Itagaki, H., & Asano, T. (2013). *Onset of Forming Ordering in Uniaxially Stretched Poly(ethylene terephthalate) Films Due to π - π Interaction Clarified by the Fluorescence Technique*. *Macromolecules*. <https://doi.org/10.1021/ma401806u>
- Sahihi, M., Fayon, P., Nauton, L., Goujon, F., Devémy, J., Dequidt, A., Hauret, P., & Malfreyt, P. (2024). Probing Enzymatic PET Degradation: Molecular Dynamics Analysis of Cutinase Adsorption and Stability. *Journal of Chemical Information and Modeling*. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.4c00079>
- Sánchez-Sánchez, M. (2015). Aplicación de las cutinasas ANCUT1 y ANCUT2 recombinantes de *Aspergillus nidulans* en la degradación de poliésteres. Tesis licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Schindelin, J. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 9, 676–682
- Schmidt, J., Wei, R., Oeser, T., Belisário-Ferrari, M. R., Barth, M., Then, J., & Zimmermann, W. (2016). Effect of Tris, MOPS, and phosphate buffers on the hydrolysis of polyethylene terephthalate films by polyester hydrolases. *FEBS Open Bio*, 6(9), 919–927. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12097>
- SEDEMA. (2021). Programa de Gestión Integral de Residuos para la Ciudad de México. PGIR 2021-2025. Recuperado el 17 de octubre de 2022, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802013000100001&lng=es&tlng=es.
- Seo, H.S.; Um, H.J.; Min, J.; Rhee, S.K.; Cho, T.J.; Kim, Y.H. y Lee J. (2007). *Pseudozyma jejuensis* sp. nov., a novel cutinolytic ustilaginomycetous yeast species that is able to degrade plastic waste. *FEMS Yeast Research*. 7(6):1035-45.
- Shah A.A., Hasan F, Hameed A. y Ahmed S. (2008). Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*. 26(3), 246-65.
- Sharma, V., Shrivastava, P., y Agarwal, D. D. (2015). Degradation of PET-bottles to monohydroxyethyl terephthalate (MHT) using ethylene glycol and hydrotalcite. *Journal of Polymer Research*, 22, 1-10.
- Smole, M. S., & Zipper, P. (2002). The influence of different treatment media on the structure of PET fibres. *Materials Research Innovations*, 6(2), 55–64. <https://doi.org/10.1007/s10019-002-0173-7>
- Solís-Báez, I. (2015). Producción, purificación y caracterización de la cutinasa recombinante ANCUT1 producida en *Pichia pastoris*. Tesis de Licenciatura. UNAM, Facultad de Química. México D.F. México.
- Sonnendecker, C., Oeser, J., Richter, P. K., Hille, P., Zhao, Z., Fischer, y Zimmermann, W. (2022). Low Carbon Footprint Recycling of Post-Consumer PET Plastic with a Metagenomic Polyester Hydrolase. *ChemSusChem*, 15(9), 1-10.
- Sowers, M. E., Ambrose, R., Bethea, E., Harmon, C., y Jenkins, D. (2022). Quantitative thin layer chromatography for the determination of medroxyprogesterone acetate using a smartphone and open-source image analysis. *Journal of Chromatography A*, 1669, 462942.
- Świderek, K., Velasco-Lozano, S., Galmés, M., Olazabal, I., Sardon, H., López-Gallego, F., & Moliner, V. (2023). Mechanistic studies of a lipase unveil effect of pH on hydrolysis products of small PET modules. *Nature Communications*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39201-1>
- Then, J., Wei, R., Oeser, T., Barth, M., Belisário-Ferrari, M. R., Schmidt, J., y Zimmermann, W. (2015). Ca^{2+} and Mg^{2+} binding site engineering increases the degradation of polyethylene terephthalate films by polyester hydrolases from *Thermobifida fusca*. *Biotechnology Journal*, 10(4), 592-598.
- Thomsen, T. B., Almdal, K., & Meyer, A. S. (2023). Significance of poly(ethylene terephthalate) (PET) substrate crystallinity on enzymatic degradation. *New Biotechnology*, 78, 162–172. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2023.11.001>

- Thomsen, T. B., Hunt, C. J., & Meyer, A. S. (2022a). Influence of substrate crystallinity and glass transition temperature on enzymatic degradation of polyethylene terephthalate (PET). *New Biotechnology*, 69, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2022.02.006>
- Thomsen, T. B., Hunt, C. J., & Meyer, A. S. (2022b). Standardized method for controlled modification of poly (ethylene terephthalate) (PET) crystallinity for assaying PET degrading enzymes. *MethodsX*, 9, 101815. <https://doi.org/10.1016/J.MEX.2022.101815>
- Thomsen, T. B., Radmer, T. S., & Meyer, A. S. (2024). Enzymatic degradation of poly(ethylene terephthalate) (PET): Identifying the cause of the hypersensitive enzyme kinetic response to increased PET crystallinity. *Enzyme and Microbial Technology*, 173, 110353. <https://doi.org/10.1016/j.enzmtec.2023.110353>
- Thomsen, T. B., Schubert, S., Hunt, C. J., Borch, K., Jensen, K., Brask, J., Westh, P., & Meyer, A. S. (2023). *Rate Response of Poly(Ethylene Terephthalate)-Hydrolases to Substrate Crystallinity: Basis for Understanding the Lag Phase*. <https://doi.org/10.1002/cssc.202300291>
- Tournier, V.; Topham, C. M.; Gilles, A.; David, B.; Folgoas, C.; Moya-Leclair, E.; Kamionka, E.; Desrousseaux, M.L.; Texier, H.; Gavalda, S.; Cot, M.; Guémard, E.; Dalibey, M.; Nomme, J.; Cioci, G.; Barbe, S.; Chateau, M.; André, I.; Duquesne, S. y Marty, A. (2020). An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles. *Nature*, 580(7802), 216–219.
- Vega, F. (2013). Purificación y caracterización de la cutinasa ANCUT1 de *Aspergillus nidulans*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Vertommen, M.A.M.E.; Nierstrasz, V. A.; Van Der Veer, M. y Warmoeskerken, M.M.C.G. (2005). Enzymatic surface modification of poly (ethylene terephthalate). *Journal of Biotechnology*, 120(4), 376–386.
- Walls, D. J. (1991). Application of ATR-IR to the Analysis of Surface Structure and Orientation in Uniaxially Drawn Poly(Ethyleneterephthalate). *Applied Spectroscopy*, 45(7), 1193–1198. <https://doi.org/10.1366/0003702914336147>
- Wang, X., Song, C., Qi, Q., Zhang, Y., Li, R., y Huo, L. (2022). Biochemical characterization of a polyethylene terephthalate hydrolase and design of high-throughput screening for its directed evolution. *Engineering Microbiology*, 2(2), 100020.
- Wei, R., Song, C., Gräsing, D., Schneider, T., Bielytskyi, P., Böttcher, D., Matysik, J., Bornscheuer, U. y Zimmermann, W. (2019). Conformational fitting of a flexible oligomeric substrate does not explain the enzymatic PET degradation. *Nature communications*, 10(1), 5581.
- Zhang, B.; Chen, Y.; Li, Z.; Lu, W.; y Cao, Y. (2011). Cloning and functional expression of α -galactosidase cDNA from *Penicillium janczewskii* zaleski. *Biologia*, 66(2), 205–212.
- Zhang, J., Wang, H., Luo, Z., Yang, Z., Zhang, Z., Wang, P., Li, M., Zhang, Y., Feng, Y., Lu, D., y Zhu, Y. (2023). Computational design of highly efficient thermostable MHET hydrolases and dual enzyme system for PET recycling. *Communications Biology*, 6(1), 1135. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05523-5>
- Zhong-Johnson, E. Z. L., Voigt, C. A., y Sinskey, A. J. (2021). An absorbance method for analysis of enzymatic degradation kinetics of poly (ethylene terephthalate) films. *Scientific Reports*, 11(1), 928.

14 ANEXOS.

14.1 ANEXO A. Composición de medios de cultivo y metodología para la producción de enzima a nivel matraz.

Elementos trazas.

Tabla 21. Proporciones para la preparación del stock de elementos traza.

Componente	100 mL	1 L
FeSO ₄ 7 H ₂ O	6.5 g	65 g
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	0.6 g	6 g
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	2 g	20 g
MnSO ₄ * H ₂ O	0.3 g	3 g
KI	0.042 g	0.42 g
H ₃ BO ₃	0.01 g	0.1 g
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	0.1 g	1 g
H ₂ SO ₄ 98% (v/v)	1 mL	10 mL

Cada compuesto se va disolviendo uno a uno en el 70% del volumen de la solución y se esteriliza por filtración.

Vitaminas

Tabla 22. Proporciones para la preparación del stock de vitaminas.

Componente	100 mL	1 L
Pantotenato de calcio	80 mg	800 mg
myo-inositol 800 mg	800 mg	8 g
dicloruro de tiamina	80 mg	800 mg
hidrocloruro de piridoxina	80 mg	800 mg
ácido nicotínico	20 mg	200 mg
D(+) biotina	80 mg	800 mg
K ₂ HPO ₄ 400 mg	400 mg	4 g

Cada compuesto se va disolviendo uno a uno en el 70% del volumen de la solución y se esteriliza por filtración.

Soluciones stock

Glicerol 10% (1 L).

Mezcla 126 g de glicerol con 900 ml de agua y esterilizar en autoclave. Almacenar en refrigeración.

Glicerol 10X: Agregar 10 mL de glicerol a 90 mL de agua desionizada y esterilizar en autoclave.

Buffer de fosfatos pH 6.0 (K₂HPO₄) 1M: Disolver 17.43 g de fosfato con agua desionizada, ajustar pH y aforar a 100 mL. Esterilizar en autoclave.

Medios de cultivo

Medio YPD.

Tabla 23. Proporciones para la preparación del medio YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium)

Componente	1L
Extracto de levadura 1%	10 g
Peptona 2%	20 g
Dextrosa (glucosa) 2%	20 g
Agua destilada	1000 mL

Esterilizar en autoclave. Para YPD sólido, agrega 20 g de agar antes de esterilizar. Para medio YPD/zeocina 0.01 %, después de esterilizar, deja enfriar (~60°C) y agrega 1 mL de un stock de zeocina (100 mg/mL) para obtener una concentración final de 100 µg/mL.

Medio Y.

Extracto de levadura 3% m/v.

Medio LOTO Glicerol 1%.*

Tabla 24. Medio LOTO con glicerol al 1%.

Componente	25 mL	1 L
Medio Y	20 mL	800 mL
Fosfatos de potasio 100 mM pH 6.0	2.5 mL	100 mL
Solución vitaminas	0.1 mL	4 mL
Solución de elementos trazas	0.1 mL	4 mL
Glicerol 10%	2.5 mL	100 mL

*Mezclar bien y almacenar a 4°C. Medio Y, Amortiguador y glicerol se esterilizan en autoclave. Solución de vitaminas y elementos trazas se esterilizan por filtración con membrana de 0.22 µm.

Medio LOTO MeOH 3%.*

Tabla 25. Medio LOTO con metanol al 3%.

Componente	25 mL	1 L
Medio Y	21.75 mL	870 mL
Fosfatos de potasio 100 mM pH 6.0	2.5 mL	100 mL
Solución vitaminas	0.1 mL	4 mL
Solución de elementos trazas	0.1 mL	4 mL
Metanol (100%)	0.75 mL	30 mL

*Mezclar bien y almacenar a 4°C. Medio Y y Amortiguador se esterilizan en autoclave. Solución de vitaminas y elementos trazas se esterilizan por filtración.

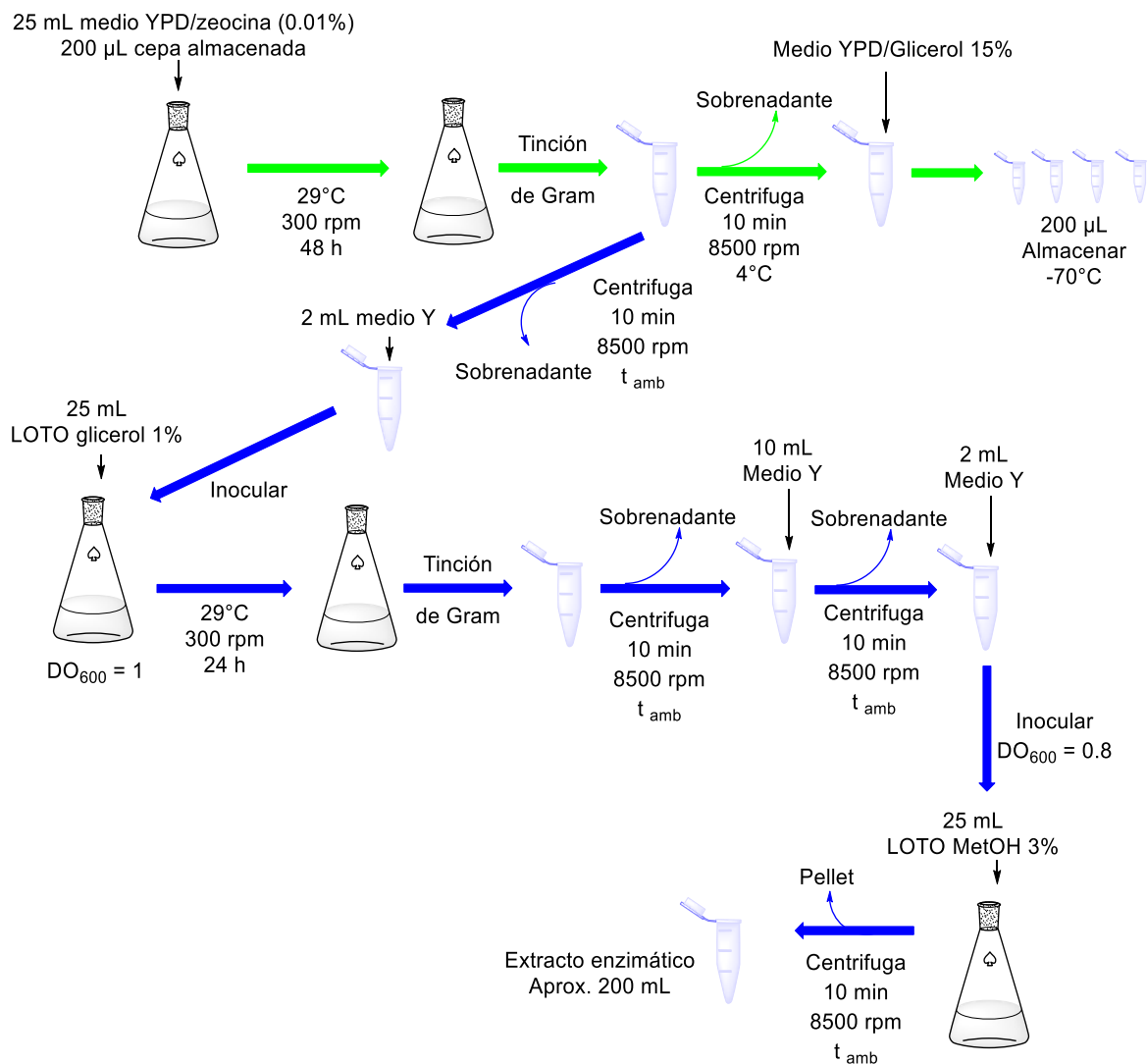
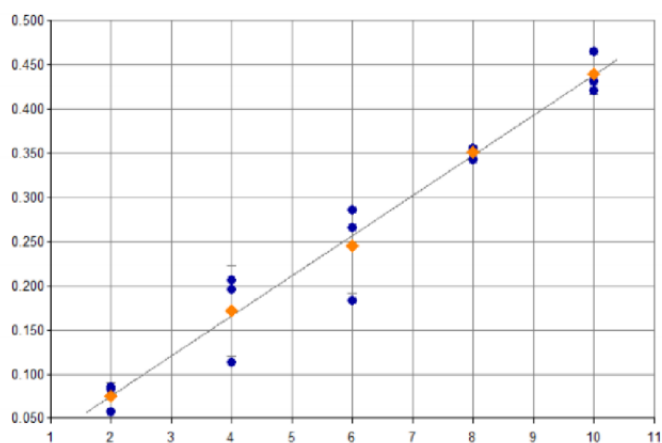


Figura 34. Metodología para la producción de glicerol y extracto enzimático.

14.2 ANEXO B: Curva de calibración de la concentración de proteína por el método de Bradford.



Curva	Fórmula de la curva	m	b	Coefficiente de correlación
Bradford (BSA)	$Y = m \cdot X + b$	0.0454	-0.0158	0.998

Figura 35. Curva de calibración para la cuantificación de proteína por el método Bradford.

14.3 ANEXO C. Caracterización de sustrato con ATR FTIR y DSC.

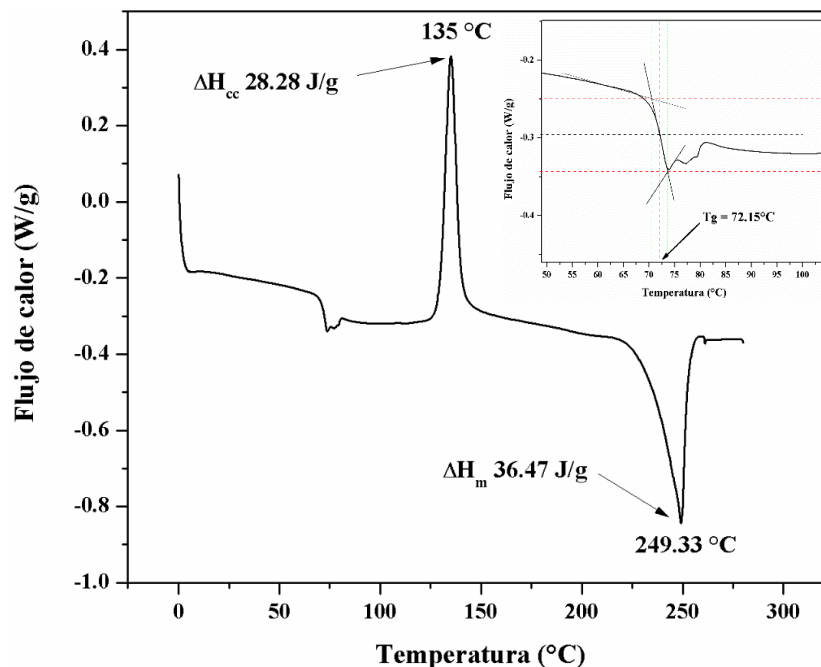


Figura 36. Termograma DSC del PET-GF. Rango 0-290°C, velocidad de calentamiento 10°C/min. Análisis llevado a cabo en un equipo DSC1 Mettler Toledo.

Es necesario obtener las áreas bajo la curva de los picos exotérmico y endotérmico. Estos valores fueron obtenidos usando el programa OriginLab 8. Área del pico exotérmico = 4.00 W°C/g; Área del pico endotérmico = 5.97 W°C/g. La T_g se calculó con base en el método del “Análisis de altura media” (Figura 36). Hay que recordar que W = J/s. ΔH_m = 140.1 J/g.

$$\Delta H_m = \frac{\left[\text{Área pico endotérmico} \left(W * \frac{^{\circ}C}{g} \right) \right]}{\left[\text{Velocidad de calentamiento} \left(\frac{^{\circ}C}{s} \right) \right]}$$

$$\Delta H_m = \frac{5.97 \frac{J * ^{\circ}C}{s * g}}{0.1667 \frac{^{\circ}C}{s}} = 35.81 \frac{J}{g}$$

$$\Delta H_m = \frac{\left[\text{Área pico exotérmico} \left(W * \frac{^{\circ}C}{g} \right) \right]}{\left[\text{Velocidad de calentamiento} \left(\frac{^{\circ}C}{s} \right) \right]}$$

$$\Delta H_{cc} = \frac{4.00 \frac{J * ^{\circ}C}{s * g}}{0.1667 \frac{^{\circ}C}{s}} = 24.01 \frac{J}{g}$$

$$\%Cri = \frac{\Delta H_m - \Delta H_{cc}}{\Delta H_m^0} = \frac{35.81 \frac{J}{g} - 24.01 \frac{J}{g}}{140.1 \frac{J}{g}} * 100 = 8.42 \%$$

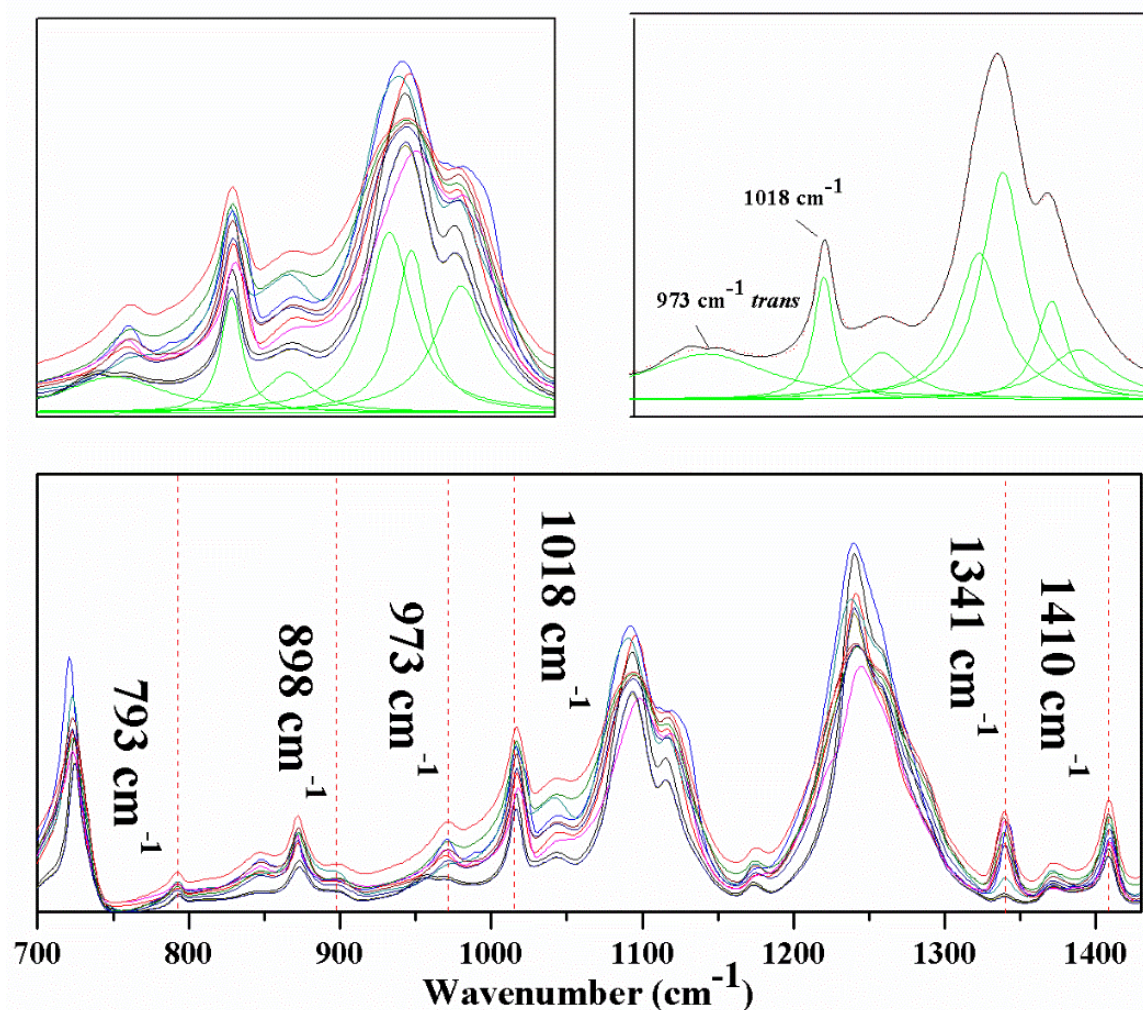


Figura 37. Arriba, Izquierda) Se muestran múltiples espectros ATR FT-IR de muestras de PET-GF y PET-PC junto con la desconvolución (líneas color verde). Arriba, derecha) Ejemplo de una muestra de PET-GF (PET referencia) y el espectro ATR FT-IR mostrando las bandas 973 cm^{-1} y 1018 cm^{-1} por desconvolución (líneas verdes) resolviendo un solo pico en 973 cm^{-1} necesario para los cálculos de las fracciones RAF y MAF. Abajo) Bandas características mencionadas por Smole y Zipper, 2002 en la identificación de PET por la técnica ATR-IR.

En la literatura se citan bandas características que sirven como referencia para los cálculos de la cristalinidad o bien de las fracciones *trans* o *gauche* del etilenglicol. Se llevó a cabo la desconvolución de los espectros en las señales de interés para corroborar la presencia de un solo pico a 793 cm^{-1} y hacer uso de las señales 973, 793, para los cálculos mencionados en la sección caracterización de los sustratos.

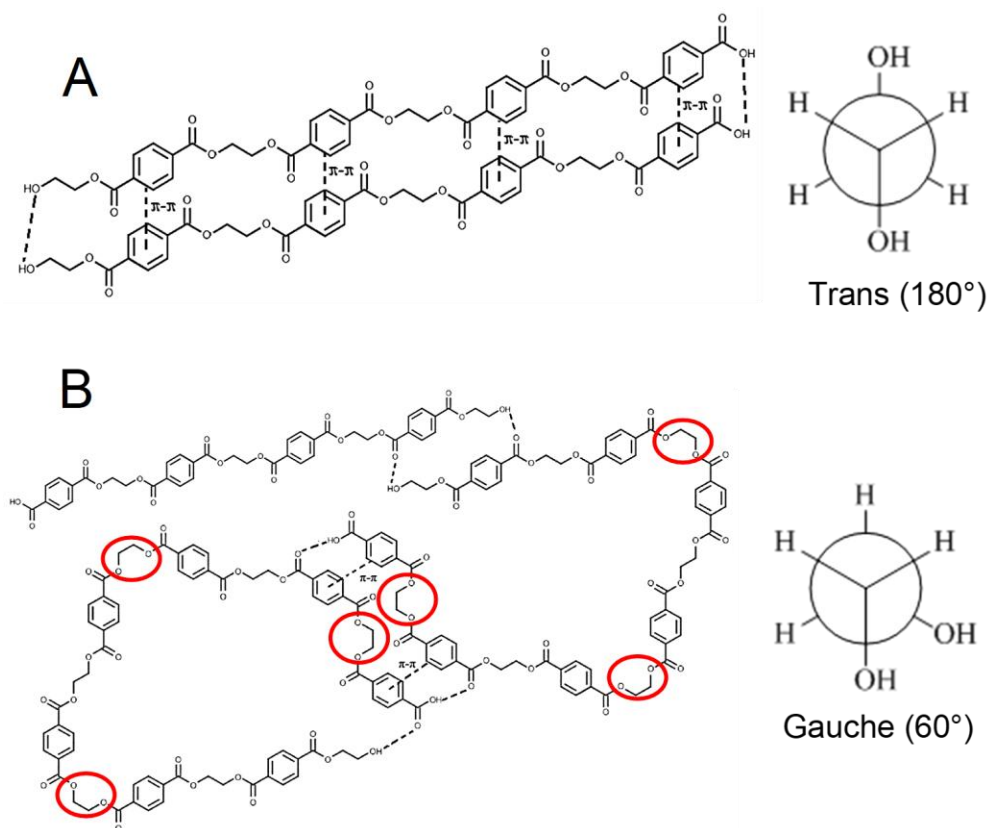


Figura 38. Representación del acomodo de las cadenas de PET en el espacio. Se ejemplifican A) cadenas con conformación del Etilenglicol únicamente en conformación trans y B) cadenas con conformaciones del Etilenglicol en conformación Trans y conformación Gauche (resaltados con círculos rojos). Se pretende hacer de forma más gráfica la mayor accesibilidad de las cadenas de PET en la fracción amorfa donde predomina la fracción MAF al haber mayor accesibilidad por las pocas interacciones de puentes de hidrógeno o π - π entre cadenas vecinas. Elaboración propia.

14.4 ANEXO D. Caracterización del intermediario de reacción (MHET).

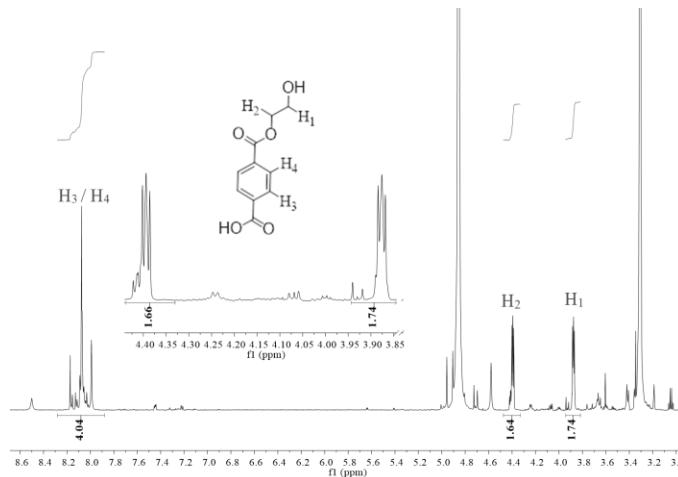


Figura 39. Espectro de ^1H -RMN del producto MHET obtenido para verificar su estructura química. Se muestran las señales características del producto: triplete 3.85-3.92 ppm atribuibles a los hidrógenos en el grupo metileno adyacentes al hidroxilo; triplete 4.38-4.42 ppm atribuible a hidrógenos del grupo metileno adyacentes al éster y multiplete 7.9-8.2 ppm atribuible a los hidrógenos del anillo aromático.

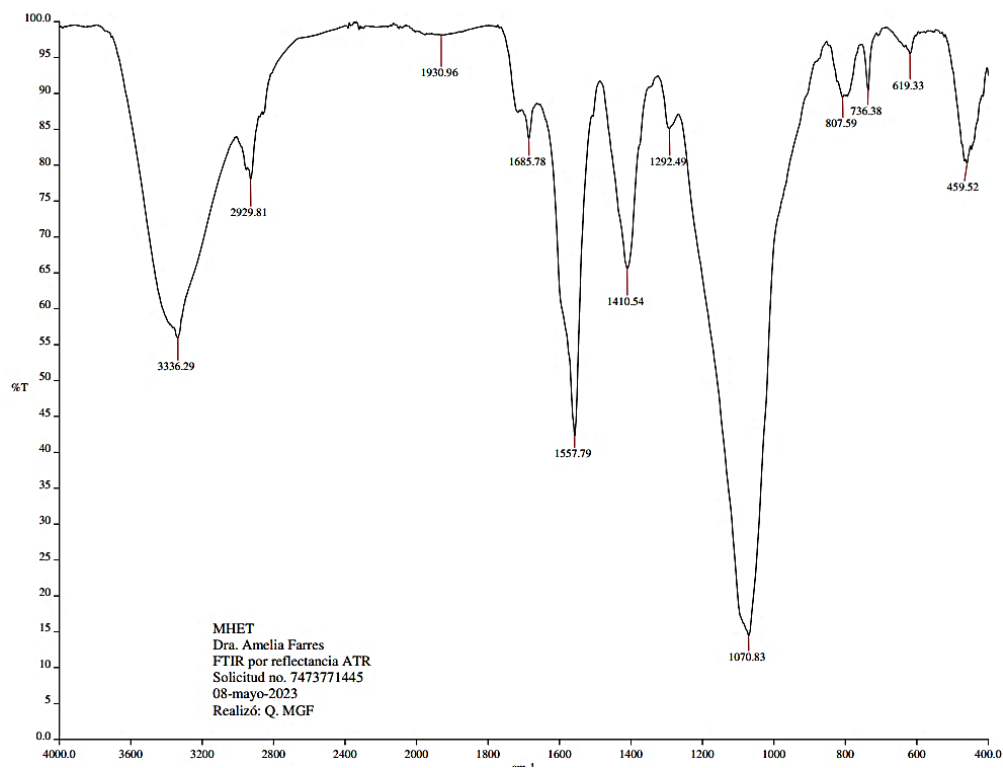


Figura 40. Espectro ATR FT-IR del producto MHET.

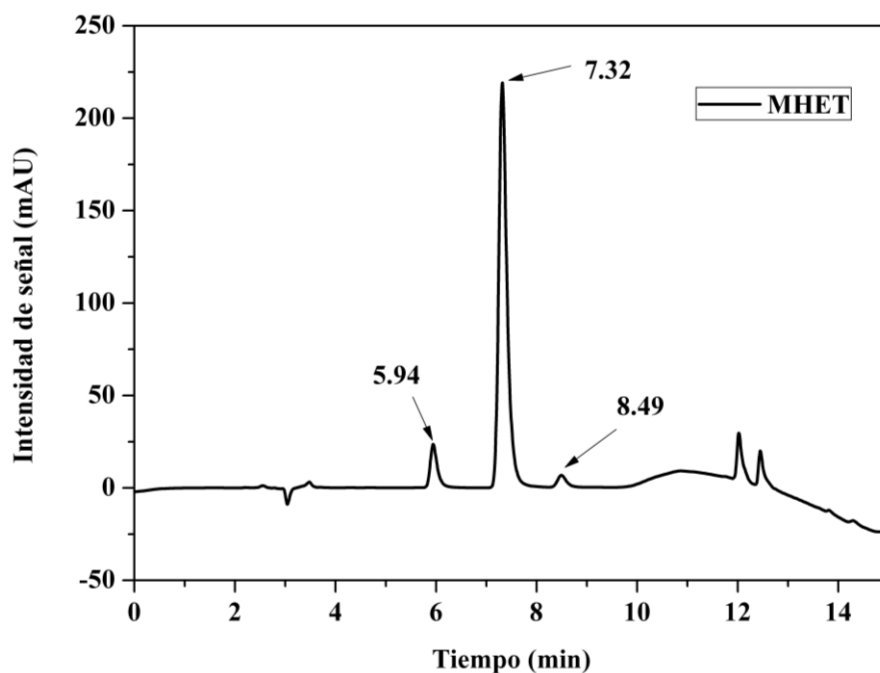


Figura 41. Cromatograma del intermediario MHET sintetizado. Tiempos de retención TPA: 5.94, MHET 7.32, BHET 8.49, 12 y 12.2 desconocidos. MHET producido por hidrólisis del BHET con CALB en amortiguador de bicarbonato de sodio 100 mM de acuerdo con *Swiderek et al., 2023* con ciertas variaciones.

14.5 Anexo E. Identificación y cuantificación de monómeros por la hidrólisis de PET por ANCUT 1.

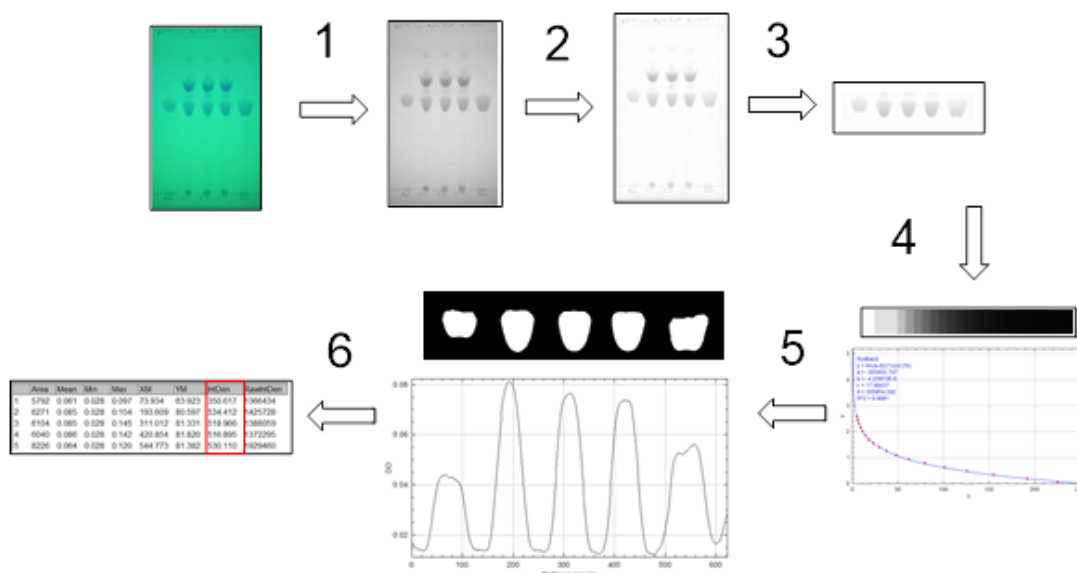
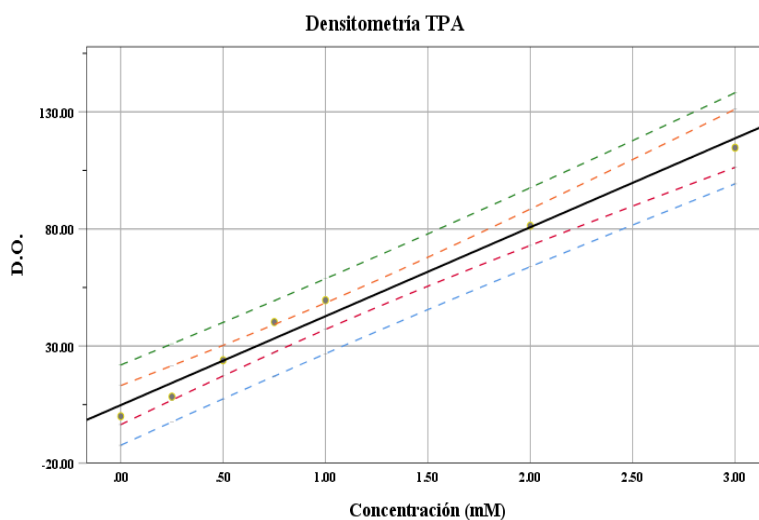


Figura 42. Estrategia en la determinación semicuantitativa de TPA por densitometría en TLC basado en lo reportado por Sowers et al, (2022) y Schindelin et al, (2012). 1) División de la imagen en sus colores RGB (red, green, blue); 2) Procesamiento de imagen en tono "Green" eliminando la luz excesiva de fondo (radio de rodillo = 2000 pixeles); 3) Corte de área de interés a analizar; 4) Calibración de la imagen. Conversión de señal de pixeles a D.O. [Rodbard $y = d + (a - d) / (1 + (x/c)^b)$]; 5) Definir límite (Threshold) a cuantificar y graficar el perfil de señales detectadas; 6) Medir la densidad integrada definido por el "Threshold".



Curva	Fórmula de la curva	m	B	R ²	Valor-P
TPA	$Y = m \cdot X + b$	37.976	4.772	0.983	0.0001

Figura 43. Curva de calibración para la cuantificación de TPA por densitometría.

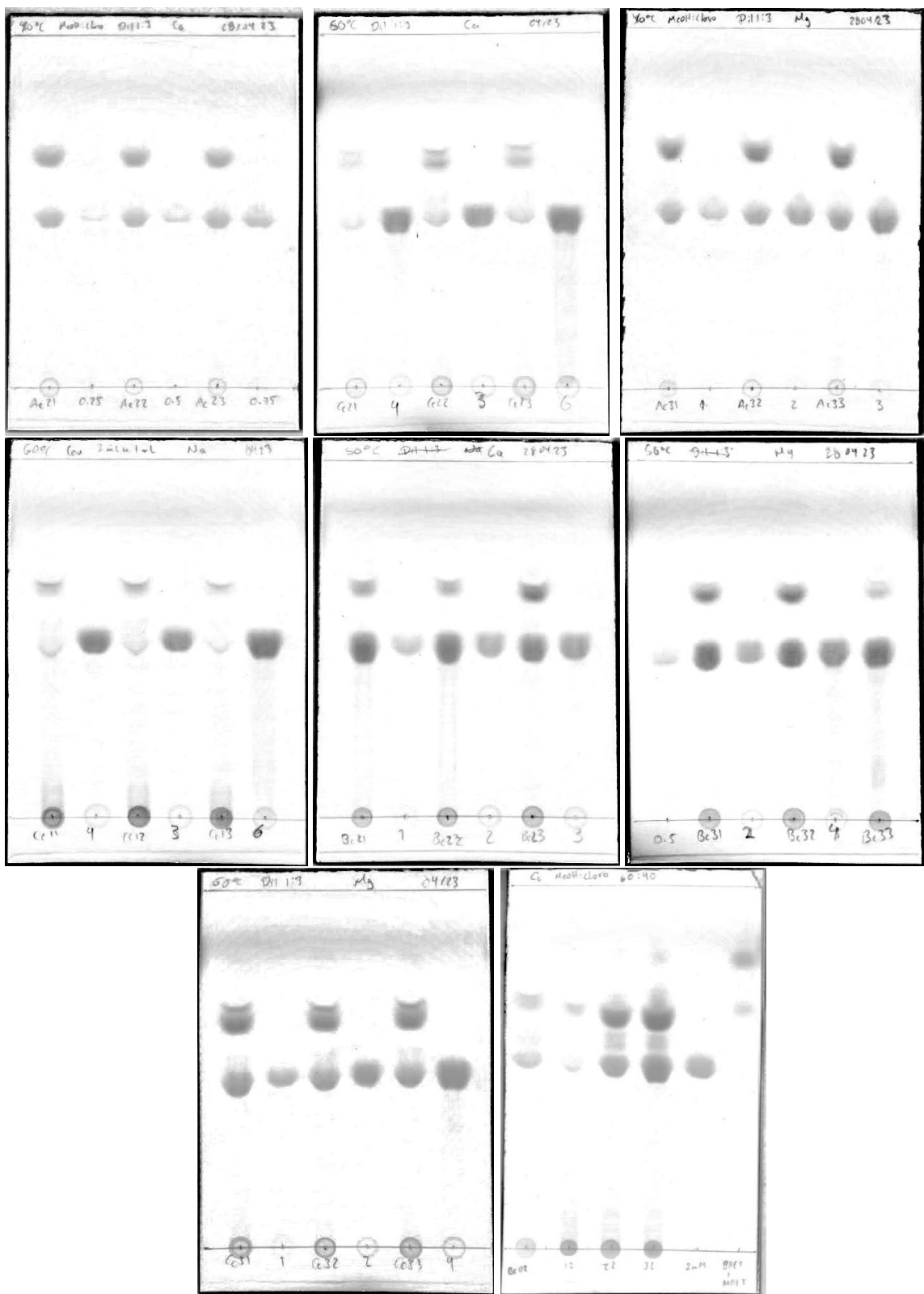


Figura 44. Resultados de la elución del medio de reacción en TLC de algunas muestras por densitometría. En cada placa se cargaban 3 muestras y entre ellas 3 puntos con concentraciones conocidas de TPA para la curva de calibración. Las placas se revelaron con luz UV a 254 nm. La fase estacionario fue sílica gel y la fase móvil consistió de una mezcla MeOH:CHCl₃ 40:60.

14.6 ANEXO F. Barridos espectrales de los monómeros TPA, MHET y BHET.

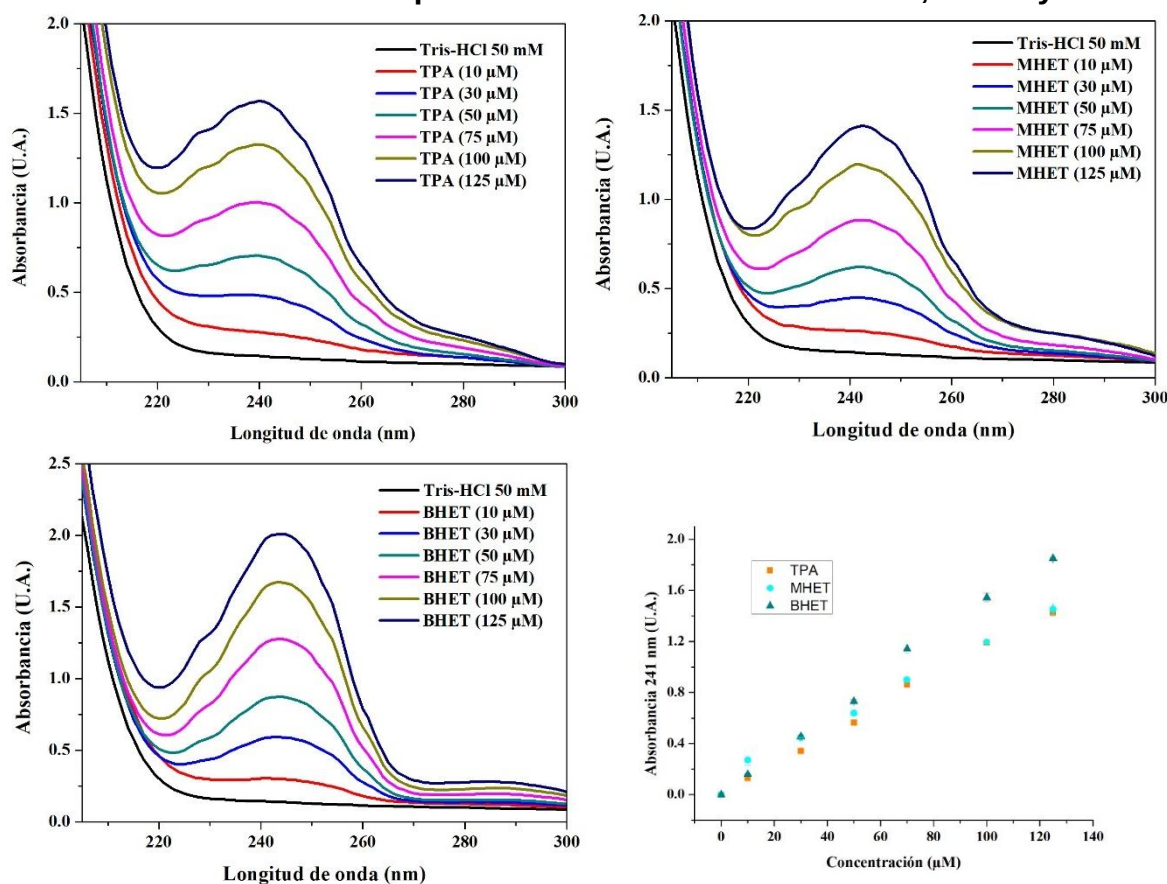
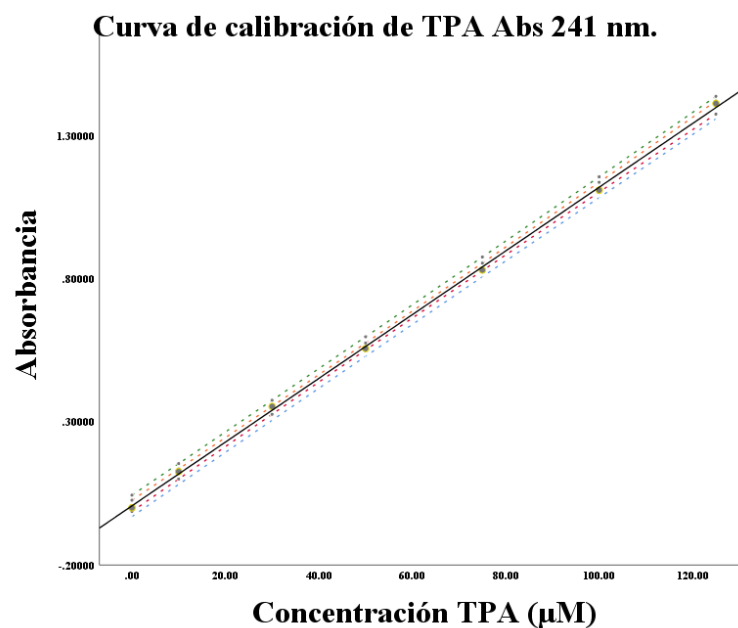


Figura 45. Barridos espectrales de los monómeros de referencia TPA (A), MHET (B) y BHET (C) en solución de Tris-HCl pH 9 50 mM. Los tres monómeros muestran un máximo de absorción entre 240 y 244 nm. C) Se muestra la respuesta lineal de la concentración vs absorbancia a 241 nm de los 3 monómeros. Se corrobora la cercanía entre los coeficientes de extinción molar de los 3 monómeros.



Linealidad, LOD y LOQ.

Compuesto	Ecuación de regresión	r^2	LOD (μM)	LOQ (μM)
TPA	$y = 3 \times 10^6 x + 339418$	0.999	3.77	11.43

Figura 46. Curva de calibración usando TPA como estándar para la cuantificación de monómeros obtenidos en la hidrólisis de PET por absorbancia a 241 nm.

Tabla 26. Comparación entre los métodos de densitometría y Absorbancia a 241 nm para la cuantificación de los productos de reacción.

	Densitometría TPA + MHET (mM)	Abs 241 nm Productos totales (mM)
Sin ion	4.18 ± 0.28	4.90 ± 0.51
NaCl	1.55 ± 0.55	3.91 ± 0.60
CaCl ₂	11.69 ± 5.68	14.00 ± 5.51
MgCl ₂	28.78 ± 2.59	36.40 ± 2.85

14.7 ANEXO G. Tiempos de retención de los monómeros TPA, MHET y BHET en RP-HPLC estándares y muestras.

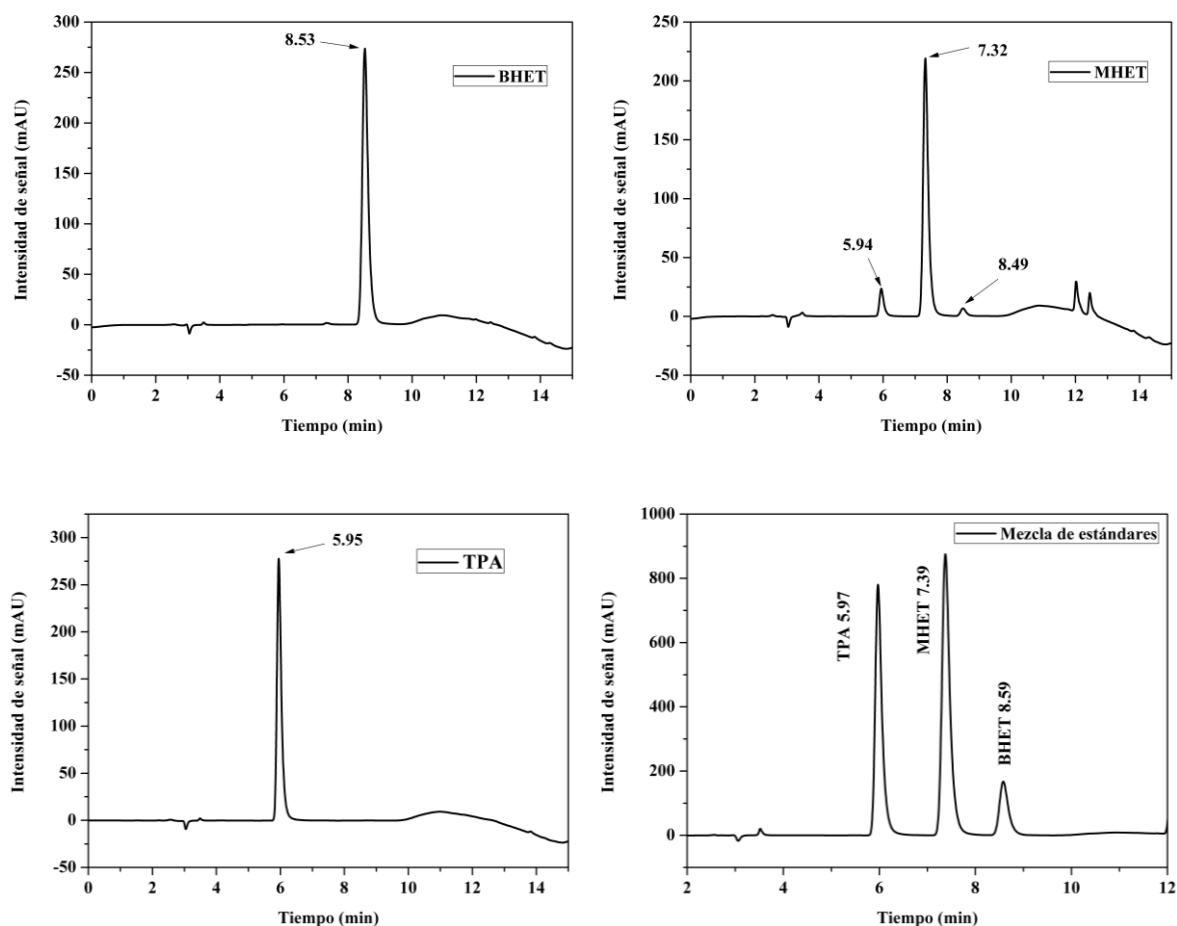


Figura 47. Cromatogramas de RP-HPLC-DAD obtenidos para los estándares individuales y la mezcla de estos. Se observan los cromatogramas individuales de cada estándar y su mezcla para observar los tiempos de retención.

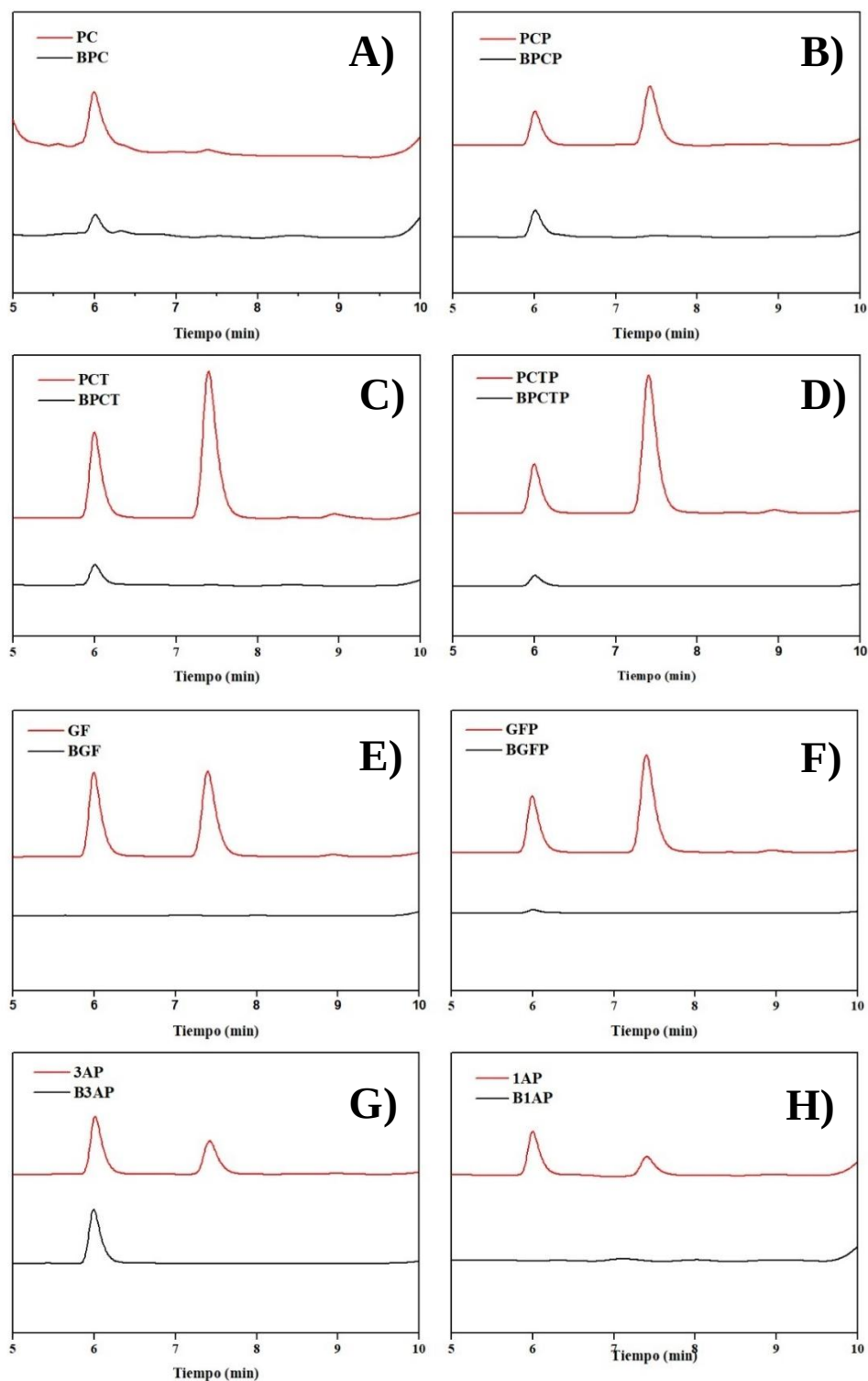
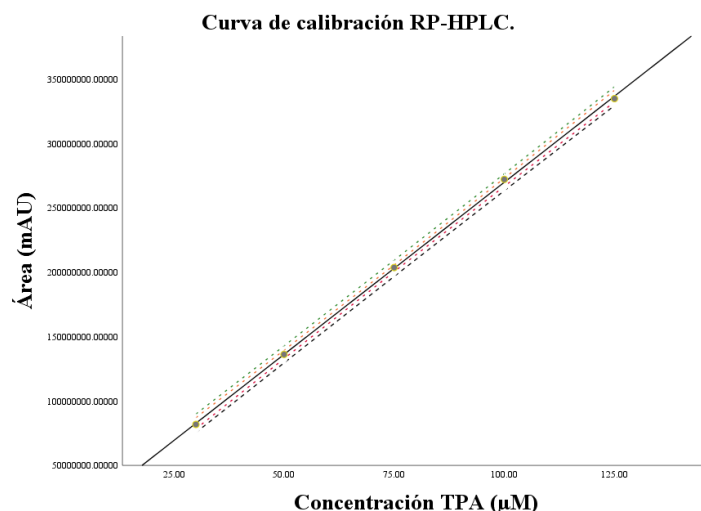


Figura 48. Ampliación de cromatogramas. Resultados de RP-HPLC en la hidrólisis enzimática de PET antes y después del pretratamiento térmico y mecánico. Se observa la muestra después del tratamiento enzimático y el respectivo blanco de reacción siendo este, PET + medio de reacción sin enzima. A): PET post-consumo (lámina) 1:2; B): PET post-consumo (polvo) 1:200; C): PET post-consumo tratado térmicamente (lámina) 1:100; D): PET post-consumo tratado térmicamente (polvo) 1:100; E): PET referencia de baja cristalinidad (lámina) 1:100; F): PET referencia de baja cristalinidad (polvo) 1:100; G): PET de tercera molido industrialmente 1:100; H): PET de primera molido industrialmente 1:50. Blancos no se diluyeron excepto de G), 1:100.



Linealidad, LOD y LOQ.

Compuesto	Ecuación de regresión	r^2	LOD (μM)	LOQ (μM)
TPA	$y = 2.67 \times 10^6 x + 2.48 \times 10^6$	0.999	2.23	6.77

Figura 49. Curva de calibración usando TPA como estándar externo para la cuantificación de monómeros obtenidos en la hidrólisis de PET usando un detector UV a 244 nm, columna C18, flujo 0.5 mL/min y una fase móvil de 0.5 % ácido fórmico en agua y acetonitrilo 80:20 con gradiente isocrático.

Precisión.

De acuerdo con la directiva ICH Q2(R2) se llevó a cabo la validación del método. Para la precisión se llevó a cabo la cuantificación de muestras preparadas con el estándar TPA a la concentración indicada como 100% (75 μM) con la finalidad de evaluar la repetibilidad y precisión intermedia (PI). Teniendo como referencia a la Farmacopea de los Estados Unidos Americanos (USP) y la Farmacopea Europea, el promedio del %Recuperación de sustancias activas debe ser $98\% \leq \% \text{Recuperación} \leq 102\%$. La precisión de las mediciones fue reportada como la Desviación Estándar Relativa (%RSD) fijando el valor a $\% \text{RSD} \leq 2$ como límite aceptable. Para evaluar este parámetro se muestran los %Recuperación para 6 réplicas por cada día.

Compuesto	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3
TPA	101.50	101.55	101.25
	101.51	100.95	101.74
	101.00	100.84	101.87
	101.99	101.41	101.58
	101.42	100.08	102.52
	101.64	100.90	101.47
%RSDr	0.32	0.52	0.44
PI (%RSD)		0.53	

*Para el valor 102.52 al aplicar la prueba de Dixon con 6 observaciones y con un nivel de confianza del 95%, $Q_{\text{calc}} = 0.511 < 0.625$ por lo tanto no es considerado un valor atípico.

Para el cálculo de %RSD se usó la siguiente ecuación:

$$\% \text{Relative standard deviation} = \text{Standard deviation} / \text{Mean} \times 100$$

Para el %Recuperación se usó la siguiente ecuación:

$$\% \text{Recovery} = \text{Recovered concentration} / \text{Injected concentration} \times 100$$

14.8 ANEXO H. Cálculo teórico del % Depolimerización del PET-GF (PET de referencia).

El peso molecular promedio (M_w) del PET-GF de acuerdo con el valor obtenido por Kawai, *et al*, 2022 es igual a $M_{w, PET-GF} = 24100 \frac{g}{mol}$ determinado por permeación en gel.

El peso molecular de la unidad monomérica del PET es igual a $M_{w, monómero} = 192 \frac{g}{mol}$ de acuerdo con la estructura de la Figura 6.

El grado de polimerización (DP) es obtenido a través de la ecuación:

$$PD = \frac{M_{w, PET-GF}}{M_{w, monómero}} = \frac{24100 \frac{g}{mol}}{192 \frac{g}{mol}} = 125.52$$

Considerando una masa de 14 mg de PET

$$mol_{teórico, monómero} = 0.014 g PET * \frac{1 mol PET}{24100 g PET} * \frac{125.52 mol monómero}{1 mol PET} * \frac{1 \times 10^6 \mu mol}{1 mol monómero}$$

$$mol_{teórico, monómero} = 72.91 \mu mol monómero$$

Ahora, para el cálculo del % depolimerización considerar una concentración de ftalatos de 11.45 mM cuantificados posterior a una reacción de hidrólisis de 14 mg de PET-GF con ANCUT 1:

$$\% \text{ Depolimerización} = \frac{11.45 mmol ftalatos}{1000 mL} * \frac{1 \times 10^3 \mu mol}{1 mmol monómero} * 1 mL reacción * \frac{1}{72.91 \mu mol monómero} * 100 = 15.70 \%$$

14.9 ANEXO I. Tratamientos estadísticos.

Efecto del tipo de amortiguador.

Hipótesis nula: Las medias entre todos los niveles son iguales.

Hipótesis alternativa: Las medias de uno o más niveles son diferentes.

ANOVA una vía					
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	3	2.66E+07	8.87E+06	10.07537	0.00431
Error	8	7.04E+06	880491.8		
Total	11	3.37E+07			

A un nivel de 0.05, hay diferencia significativa entre las medias.

Prueba de Tukey

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig
fosfatos tris	-606.234	766.1557	1.11902	0.85652	0.05	0
gly NaOH tris	-2229.54	766.1557	4.11541	0.07553	0.05	0
gly NaOH fosfatos	-1623.31	766.1557	2.99639	0.22601	0.05	0
bicarbonato tris	-3823.56	766.1557	7.05774	0.00468	0.05	1
bicarbonato fosfatos	-3217.32	766.1557	5.93872	0.01278	0.05	1
bicarbonato gly NaOH	-1594.02	766.1557	2.94232	0.23772	0.05	0

Sig igual a 1 indica que la diferencia de medias es significativa a un nivel de 0.05

Sig igual a 0 indica que la diferencia de medias no es significativa a un nivel de 0.05

Fisher Test

	MeanDiff	SEM	t Value	Prob	Alpha	Sig
fosfatos tris	-606.234	766.1557	0.79127	0.45161	0.05	0
gly NaOH tris	-2229.54	766.1557	2.91004	0.01959	0.05	1
gly NaOH fosfatos	-1623.31	766.1557	2.11877	0.06695	0.05	0
bicarbonato tris	-3823.56	766.1557	4.99057	0.00107	0.05	1
bicarbonato fosfatos	-3217.32	766.1557	4.19931	0.003	0.05	1
bicarbonato gly NaOH	-1594.02	766.1557	2.08054	0.07106	0.05	0

Sig igual a 1 indica que la diferencia de medias es significativa a un nivel de 0.05

Efecto de la concentración de amortiguador.

Hipótesis nula: Las medias entre todos los niveles son iguales.

Hipótesis alternativa: Las medias de uno o más niveles son diferentes.

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	3	52.33705	17.44568	31.98563	4.91E-09
Error	27	14.72641	0.54542		
Total	30	67.06346			

A un nivel de 0.05, hay diferencia significativa entre las medias.

Prueba Tukey

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig
100 50	-3.19619	0.37218	12.14483	2.93E-08	0.05	1
150 50	-2.83986	0.38222	10.50735	3.02E-07	0.05	1
150 100	0.35633	0.35886	1.40426	0.75463	0.05	0
200 50	-3.22529	0.39476	11.55449	6.25E-08	0.05	1
200 100	-0.0291	0.37218	0.11056	0.99982	0.05	0
200 150	-0.38543	0.38222	1.42607	0.74592	0.05	0

Sig igual a 1 indica que la diferencia de medias es significativa a un nivel de 0.05

Sig igual a 0 indica que la diferencia de medias no es significativa a un nivel de 0.05

Efecto de la proporción de enzima.

ANOVA una vía

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	3	3853.12784	1284.37595	134.56602	3.48E-07
Error	8	76.35663	9.54458		
Total	11	3929.48447			

A un nivel de 0.05, hay diferencia significativa entre las medias.

Prueba de Tukey

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig
25 10	3.46431	2.52251	1.94222	0.54734	0.05	0
50 10	33.37394	2.52251	18.71069	4.64E-06	0.05	1
50 25	29.90963	2.52251	16.76847	1.09E-05	0.05	1
100 10	40.81961	2.52251	22.88501	8.65E-07	0.05	1
100 25	37.3553	2.52251	20.94279	1.87E-06	0.05	1
100 50	7.44567	2.52251	4.17432	0.07121	0.05	0

Prueba de Fisher

	MeanDiff	SEM	t Value	Prob	Alpha	Sig
25 10	3.46431	2.52251	1.37336	0.20689	0.05	0
50 10	33.37394	2.52251	13.23045	1.02E-06	0.05	1
50 25	29.90963	2.52251	11.8571	2.35E-06	0.05	1
100 10	40.81961	2.52251	16.18214	2.14E-07	0.05	1
100 25	37.3553	2.52251	14.80879	4.26E-07	0.05	1
100 50	7.44567	2.52251	2.95169	0.01838	0.05	1

Sig igual a 1 indica que la diferencia de medias es significativa a un nivel de 0.05

Sig igual a 0 indica que la diferencia de medias no es significativa a un nivel de 0.05

Efecto de la presencia de iones y temperatura de reacción.

Hipótesis nula: Las medias entre todos los niveles son iguales.

Hipótesis alternativa: Las medias de uno o más tratamientos son diferentes.

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	11	3350.18798	304.56254	86.34173	1.11E-16
Error	24	84.65781	3.52741		
Total	35	3434.84579			

A un nivel de 0.05, hay diferencia significativa entre las medias de los tratamientos.

Prueba de
Tukey

alfa	0.05
------	------

		MeanDiff	q Value	Prob	Sig
40 Na	40 Sin	8.12897	7.49667	9.50E-04	1
40 Ca	40 Sin	-6.04889	5.57839	0.02363	1
40 Ca	40 Na	-14.17787	13.07506	9.45E-08	1
40 Mg	40 Sin	-0.16421	0.15144	1	0
40 Mg	40 Na	-8.29318	7.64811	7.33E-04	1
40 Mg	40 Ca	5.88468	5.42695	0.03006	1
50 Sin	40 Sin	9.61272	8.865	9.31E-05	1
50 Sin	40 Na	1.48374	1.36833	0.99712	0
50 Sin	40 Ca	15.66161	14.44339	4.41E-08	1
50 Sin	40 Mg	9.77693	9.01644	7.23E-05	1
50 Na	40 Sin	-9.17096	8.45761	1.85E-04	1
50 Na	40 Na	-17.29993	15.95427	7.13E-08	1
50 Na	40 Ca	-3.12206	2.87922	0.66732	0
50 Na	40 Mg	-9.00675	8.30617	2.39E-04	1
50 Na	50 Sin	-18.78367	17.32261	2.38E-07	1
50 Ca	40 Sin	-11.7731	10.85735	3.55E-06	1
50 Ca	40 Na	-19.90207	18.35401	2.60E-07	1
50 Ca	40 Ca	-5.72421	5.27896	0.03791	1
50 Ca	40 Mg	-11.60889	10.70591	4.52E-06	1
50 Ca	50 Sin	-21.38582	19.72235	1.48E-06	1
50 Ca	50 Na	-2.60214	2.39974	0.85291	0
50 Mg	40 Sin	-11.30413	10.42485	7.12E-06	1
50 Mg	40 Na	-19.4331	17.92152	2.51E-07	1
50 Mg	40 Ca	-5.25524	4.84647	0.07299	0
50 Mg	40 Mg	-11.13992	10.27342	9.11E-06	1
50 Mg	50 Sin	-20.91685	19.28986	1.42E-06	1
50 Mg	50 Na	-2.13318	1.96725	0.95436	0
50 Mg	50 Ca	0.46897	0.43249	1	0
60 Sin	40 Sin	-18.63392	17.18451	2.35E-07	1
60 Sin	40 Na	-26.7629	24.68118	6.70E-08	1
60 Sin	40 Ca	-12.58503	11.60612	1.06E-06	1
60 Sin	40 Mg	-18.46971	17.03307	6.99E-08	1
60 Sin	50 Sin	-28.24664	26.04951	6.56E-08	1
60 Sin	50 Na	-9.46297	8.7269	1.17E-04	1
60 Sin	50 Ca	-6.86082	6.32716	0.00691	1
60 Sin	50 Mg	-7.32979	6.75965	0.00333	1
60 Na	40 Sin	-21.2694	19.61499	1.46E-06	1
60 Na	40 Na	-29.39837	27.11166	6.45E-08	1
60 Na	40 Ca	-15.22051	14.0366	5.75E-08	1
60 Na	40 Mg	-21.10519	19.46355	1.44E-06	1
60 Na	50 Sin	-30.88212	28.47999	9.87E-10	1
60 Na	50 Na	-12.09844	11.15738	2.19E-06	1

60 Na	50 Ca	-9.4963	8.75764	1.12E-04	1
60 Na	50 Mg	-9.96527	9.19013	5.41E-05	1
60 Na	60 Sin	-2.63548	2.43048	0.84299	0
60 Ca	40 Sin	-7.86064	7.24921	0.00145	1
60 Ca	40 Na	-15.98961	14.74588	3.85E-08	1
60 Ca	40 Ca	-1.81175	1.67082	0.98562	0
60 Ca	40 Mg	-7.69643	7.09777	0.00188	1
60 Ca	50 Sin	-17.47336	16.11421	7.09E-08	1
60 Ca	50 Na	1.31032	1.2084	0.99903	0
60 Ca	50 Ca	3.91246	3.60814	0.35724	0
60 Ca	50 Mg	3.44349	3.17564	0.53592	0
60 Ca	60 Sin	10.77328	9.9353	1.58E-05	1
60 Ca	60 Na	13.40876	12.36578	3.10E-07	1
60 Mg	40 Sin	5.959	5.49548	0.02697	1
60 Mg	40 Na	-2.16998	2.00119	0.94898	0
60 Mg	40 Ca	12.00789	11.07387	2.50E-06	1
60 Mg	40 Mg	6.12321	5.64692	0.02116	1
60 Mg	50 Sin	-3.65372	3.36952	0.45218	0
60 Mg	50 Na	15.12995	13.95309	6.15E-08	1
60 Mg	50 Ca	17.7321	16.35283	7.05E-08	1
60 Mg	50 Mg	17.26313	15.92034	7.14E-08	1
60 Mg	60 Sin	24.59292	22.67999	6.84E-08	1
60 Mg	60 Na	27.2284	25.11047	6.66E-08	1
60 Mg	60 Ca	13.81964	12.74469	1.66E-07	1

Sig igual a 1 indica que la diferencia de medias es significativa a un nivel de 0.05

Sig igual a 0 indica que la diferencia de medias no es significativa a un nivel de 0.05

Perfil de los principales monómeros cuantificados en diferentes condiciones evaluadas a través del trabajo.

Condición evaluada	Productos	TPA	MHET	BHET
Efecto de la agitación	Estático	0.290 ± 0.092	0.040 ± 0.016	ND
	800 rpm	13.784 ± 1.012	18.646 ± 2.284	ND
40 °C Tris-HCl	Sin ion	9.174 ± 2.015	13.644 ± 1.458	ND
	NaCl	12.644 ± 1.203	18.302 ± 0.608	ND
	CaCl ₂	7.250 ± 0.606	9.519 ± 1.273	ND
	MgCl ₂	10.079 ± 0.801	12.574 ± 0.698	ND
50 °C Tris-HCl	Sin ion	13.784 ± 1.012	18.646 ± 2.284	ND
	NaCl	6.404 ± 0.754	7.243 ± 0.416	ND
	CaCl ₂	7.746 ± 2.646	3.298 ± 1.366	ND
	MgCl ₂	8.221 ± 1.624	3.292 ± 1.314	ND
60 °C Tris-HCl	Sin ion	2.787 ± 0.374	1.397 ± 0.094	ND
	NaCl	0.629 ± 0.318	0.919 ± 0.235	ND
	CaCl ₂	4.521 ± 2.304	7.169 ± 3.406	ND
	MgCl ₂	11.492 ± 1.191	17.285 ± 1.415	ND
PET pretratado	PET-PC	14.95 ± 4.12	NC	ND
	PET-PCP	2921.507 ± 327.773	3898.013 ± 2261.948	ND
	PCT	1440.634 ± 273.253	2668.888 ± 599.027	ND
	PCTP	6057.563 ± 363.929	20331.313 ± 1265.763	534.694 ± 93.119
	GF	2775.021 ± 340.691	2248.209 ± 1099.697	ND
	GFP	6856.027 ± 632.949	12718.528 ± 2596.769	388.461 ± 22.828
	3AP	216.133 ± 74.221	4908.796 ± 254.831	ND
	1AP	378.992 ± 41.204	NC	ND

ND: no detectable. NC: no cuantificable.