



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE MEMBRANAS DE POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:

Q. GUILLERMO ANTONIO HUERTA MIRANDA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARCELA AYALA ACEVES,  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTOR: DR. EDMUNDO CASTILLO ROSALES,  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

DR. JORGE LUIS FOLCH MALLOL,  
CENTRO DE INVESTIGACION EN  
BIOTECNOLOGÍA, UAEM

CUERNAVACA, MORELOS,

MAYO 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**“Nuestras virtudes y nuestros defectos son inseparables, como la fuerza y la materia. Cuando se separan, el hombre deja de existir”...**

**-Nikola Tesla**

**AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Marcela Ayala Aceves por la gran asesoría, la confianza, paciencia y demás aprendizajes valiosos adquiridos desde el inicio hasta el final del proyecto.

Al Dr. Lorenzo Segovia Forcella y al Dr. Rafael Vázquez Duhalt por permitirme ser parte de sus grupos de trabajo en procesos diferentes pero que acompañaron mi vida académica en el IBT.

Al comité tutor: Dr. Edmundo Castillo Rosales y Dr. Jorge Luis Folch Mallol por el aporte y acertadas observaciones durante el trascurso del proyecto.

A los miembros del comité revisor y jurado: Dr. Carlos Peña, Dr. Víctor Bustamante, Dra. Clarita Olvera, Dra. Carmina Montiel y Dr. Claudio Cadena.

Al apoyo técnico y parte analítica: Biol. Rosa Román Miranda por su apoyo y asesoría técnica, Dr. Claudio Cadena (CeCiM), Dr. Alfredo Maciel (IIM-UNAM), QFB. Maricela Bermúdez (IIM-UNAM) por su asistencia, tiempo y espacio en las mediciones realizadas en sus equipos de laboratorio. A la Dra. Guadalupe Zavala (IBT-UNAM) y al Dr. Fernando García (IFC-UNAM) por las imágenes de microscopía SEM, Al Dr. Jorge Luis Folch Mallol por la cepa de *T. sanguineus*.

Al programa de becas para estudios de posgrado otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), 2012-2014.

Al apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) 179241.

A mis padres Margarita y José Antonio por ser mi fuente de fuerza e inspiración para continuar

avanzando en mi vida personal y académica. Los quiero mucho. Gracias.

A mi hermana Ayla por siempre estar ahí incondicionalmente y acompañarme durante tantas cosas.

Al clan Huerta y al clan Miranda que incluye primos(as), sobrinos(as), tíos(as), abuelos(as), etc. Gracias también por sus ánimos y sonrisas siempre que los veo.

A mis camaradas y cuates Abraham y Andrés que las anécdotas, las risas y la amistad nunca se terminen. Les agradezco mucho por influir en mí y por estar conmigo en las buenas y en las malas. La maestría hubiera sido otra cosa completamente distinta (para mal) sin ustedes dos.

A mis hermanitos académicos Estefa, Mayra y Joako, ya que compartimos muchas cosas dentro y fuera de los laboratorios. Me llevo muchas cosas de ustedes. Gracias y saben que cuentan conmigo.

Al laboratorio Vázquez: Karina, Sergio, Chris, Martín, Lore S, Edna Lore, Rouse y Lucy. Porque ustedes me dieron la bienvenida al IBT, me ayudaron a iniciar el recorrido y me la pasé muy bien, me llevo muchísimos recuerdos bonitos. Al laboratorio Segovia: Dra. Claudia, Mario, Dago, Fer, Emmanuel, Gus, Iris, Vane, Miguel, Mabel. Me adoptaron y me acompañaron al final de la meta. Gracias a todos.

A mis amigos "IBETEÑOS" Dulce, Nadia, Arlene, Lili, Domingo, Oscar, Diana, Rodrigo I., Rodrigo A., Felipe, Raúl, Cynthia, Grecia, Francia, Jorge, Daniel. Momentos increíbles a lado de personas increíbles. Mejor compañía no se puede pedir. Gracias.

# Índice de contenido

ÍNDICE DE TABLAS.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS.....	2
RESUMEN.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. Generalidades de los plásticos.....	4
1.2. Problemática generada por los plásticos.....	5
1.3. Polietileno.....	7
1.4. Degradación abiótica y biótica del polietileno.....	8
1.6 Oxidación enzimática del polietileno.....	13
1.7. Oxidoreductasas empleadas en este estudio.....	14
1.7.1 Lacasa.....	14
1.7.2. Citocromo c modificado con polietilenglicol.....	15
2. HIPÓTESIS.....	17
3. OBJETIVO GENERAL.....	17
3.1. Objetivos particulares.....	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
4.1. Enzimas.....	18
4.1.1. Laccasa (Lac).....	18
4.1.2. Citocromo c modificado (Cit C-PEG).....	18
4.2. Sustrato.....	20
4.3. Tratamientos enzimáticos.....	20
4.4. Caracterización del polietileno.....	21
4.4.1. Ángulo de contacto.....	21
4.4.2. Espectroscopía infrarroja (FTIR-ATR).....	22
4.4.3. Resistencia a la tensión y elongación relativa.....	23
4.4.4. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	24
4.4.5. Incubación con microorganismos.....	25

4.4.6. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	26
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
5.1. Tratamientos de polietileno con el sistema lacasa-mediador.....	27
5.1.1. Medición de la hidrofobia de la superficie del polietileno tratado enzimáticamente.....	27
5.1.2. Detección de nuevos grupos funcionales a través de FTIR.....	34
5.2.3. Determinación de las propiedades mecánicas del polietileno.....	42
5.1.4. Cambio en entalpía y arreglo molecular.....	45
5.1.5. Interacción de un microorganismo con el polietileno oxidado enzimáticamente.....	48
5.1.6. Comparación con otros trabajos en los que se empleó el sistema lacasa-mediador.....	51
5.2. Tratamiento con citocromo c modificado químicamente.....	53
6. CONCLUSIONES.....	57
7. BIBLIOGRAFÍA.....	59

## **ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1.1. Producción mundial de plásticos en el año 2012.....	5
Tabla 1.2. Catálisis oxidativa de polietileno por factores abióticos, prooxidantes metálicos y su posterior tratamiento con microorganismos.....	12
Tabla 5.1. Ángulos de contacto y tensión de adhesión en PEBD tratado con HBT y lacasa.....	29
Tabla 5.2. Ángulos de contacto y tensión de adhesión en PEBD tratado con fenol y lacasa.....	30
Tabla 5.3. Ángulos de contacto y tensión de adhesión en PEBD tratado con ABTS y lacasa.....	32
Tabla 5.4. Ángulos de contacto y estructuras químicas de algunos polímeros biodegradables.....	33
Tabla 5.5. Valores del índice de carbonilo ICO determinados por FTIR-ATR. Sistema lacasa-mediador. .....	41
Tabla 5.6. Índices de carbonilo de polietileno tratado con distintos catalizadores metálicos.....	42
Tabla 5.7. Resultados de las pruebas mecánicas realizadas al polietileno tratado con lacasa y HBT.....	43
Tabla 5.8. Resultados de las pruebas mecánicas realizadas al polietileno tratado con lacasa y fenol.....	44
Tabla 5.9. Resultados de las pruebas mecánicas realizadas al polietileno tratado con lacasa y ABTS..	45
Tabla 5.10. Caracterización calorimétrica del polietileno oxidadas con el sistema lacasa-mediador.....	46
Tabla 5.11. Resultados del análisis de hidrofobia y pruebas mecánicas sobre las muestras de polietileno tratadas con cit c-PEG.....	54



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Fórmula química del polietileno y síntesis a partir del etileno.....	7
Figura 1.2. Arreglo molecular de algunos tipos de polietileno.....	8
Figura 1.3. Productos de degradación abiótica del polietileno.....	9
Figura 1.4. Transformaciones redox del ABTS.....	15
Figura 4.1. Reacción de modificación del polietilenglicol con cloruro cianúrico.....	19
Figura 4.2. Reacción del citocromo c con el polietilenglicol modificado.....	20
Figura 4.3. Posiciones en la superficie de las membranas de polietileno evaluadas con ángulo de contacto.....	21
Figura 4.4. Procesamiento de imagen utilizado para la medición de ángulo de contacto en las películas de polietileno.....	22
Figura 4.5. <i>Trichoderma sanguineus</i> en medio PDA a los siete días de incubación.....	25
Figura 5.1. Espectro de infrarrojo de polietileno (negro) y las zonas principales en donde se esperarían la aparición de nuevos modos vibracionales.....	36
Figura 5.2. FTIR de la reacción de polietileno con diversos reactivos.....	36
Figura 5.5. Aspecto visual de las membranas de polietileno (PE) después del tratamiento con lacasa y fenol.....	37
Figura 5.3 FTIR del polietileno tratado con el sistema lacasa y HBT.....	38
Figura 5.4. FTIR del polietileno tratado con el sistema lacasa y fenol.....	38
Figura 5.6. FTIR del polietileno tratado con el sistema lacasa y ABTS.....	40
Figura 5.7. FTIR de los tratamientos control del polietileno con los mediadores en ausencia de lacasa. ....	40
Figura 5.8. Curvas calorimétricas de las películas de polietileno tratadas con el sistema lacasa- mediador.....	48
Figura 5.9. Crecimiento de <i>Trichoderma sanguineus</i> en polietileno como única fuente de carbono.....	49
Figura 5.10. Micrografías de SEM de la interacción del hongo <i>T. sanguineus</i> con polietileno de baja densidad (PE).....	50
Figura 5.11. Curso temporal de la actividad residual del Cit c-PEG.....	54
Figura 5.12. Espectros de infrarrojo de las películas de polietileno después del tratamiento con citocromo c.....	55

## RESUMEN

Los plásticos forman parte fundamental en las actividades cotidianas del hombre moderno, son materiales muy versátiles que en el transcurso de los años se convirtieron en una industria completamente independiente que desplazó a otros materiales como el metal y el vidrio en distintas aplicaciones. Ligado a la amplia utilización de los plásticos, el problema de la contaminación a causa de estos materiales es un tema que también ha generado tecnologías y líneas de investigación con la finalidad de buscar soluciones al problema ambiental.

La degradación biológica es el proceso más amigable con el medio ambiente en la gestión de residuos de plástico. Para facilitar el proceso de mineralización el material debe sufrir cambios físicos y químicos para permitir que los microorganismos metabolicen estos polímeros sintéticos. Tales cambios se hacen posibles cuando los plásticos son oxidados por factores abióticos o por catalizadores. En este trabajo se investigó la utilización de catalizadores biológicos para modificar químicamente uno de los plásticos más abundantes utilizados hoy en día, el polietileno. En el plástico tratado con la enzima lacasa del hongo *C. gallica* UAMH 8260 auxiliada de moléculas denominadas mediadores se observaron cambios en la hidrofobia de la superficie de las películas de polietileno. Químicamente la superficie se vio alterada a causa de la oxidación producida por la enzima y los mediadores. A través de espectroscopia infrarroja se detectaron nuevos modos vibracionales diferentes a los del polietileno original, principalmente vibraciones características de grupos carbonilo en la región de  $\lambda=1720\text{ cm}^{-1}$ . Sin embargo esta oxidación fue superficial y no generó cambios en las propiedades mecánicas y termodinámicas del polietileno que tuvieran correlación con lo observado en la superficie. Posteriormente se determinó que lo que se observó en las propiedades mecánicas y termodinámicas del polietileno fue producto de la hidratación de las películas al estar sumergidas en solución amortiguadora durante el tratamiento enzimático.

Finalmente el plástico fue incubado en presencia de un microorganismo modelo (*T. sanguineus* CEIBMD01) y a través de microscopía electrónica de barrido (SEM) se encontró que aquellas muestras que fueron previamente tratadas con la lacasa y los mediadores favorecieron la pesencia del hongo a la superficie. Lo cual, en algún momento pudiera traducirse en la biodegradación de este polímero bajo ciertas condiciones las cuales no pudieron ser exploradas durante la realización de este trabajo.

## **1. INTRODUCCIÓN.**

### **1.1. Generalidades de los plásticos.**

“Plástico” proviene de *plastikos* palabra griega que significa susceptible de ser moldeado. Los plásticos se llaman así porque en alguna etapa de su fabricación o de su utilización tienen propiedades plásticas o “moldeables”. Estos materiales pueden ser plásticos sólo una vez, o pueden ser tantas veces como se quiera. Sin embargo, esta propiedad no basta para distinguir a los plásticos de otros materiales. El vidrio y el hormigón pueden tener un comportamiento análogo, pero no son plásticos<sup>1</sup>. Los plásticos son materiales basados en la química del carbono de elevado peso molecular formados por unidades repetidas conocidas como monómeros, los cuales se enlazan para formar moléculas de alto peso molecular<sup>2</sup>.

Los primeros plásticos, como el celuloide o la malaquita, partían de polímeros a los que se añadían sustancias plastificantes. El proceso que condujo a los plásticos modernos fue la síntesis química a partir de moléculas sencillas para obtener polímeros<sup>3</sup>. En la década de los 1930s, se descubrió que el gas etileno polimerizaba bajo la acción del calor y la presión, formando un termoplástico al que llamaron polietileno (PE). Al reemplazar en el etileno un átomo de hidrógeno por uno de cloruro se produjo el cloruro de polivinilo (PVC), un plástico duro y resistente al fuego. Al agregarles diversos aditivos se logra un material más blando, sustituto del caucho, comúnmente usado para ropa impermeable, manteles, cortinas y juguetes<sup>4</sup>. Un plástico parecido al PVC es el politetrafluoretileno (PTFE), conocido popularmente como teflón y usado para rodillos y sartenes antiadherentes. Otro de los plásticos desarrollados en los años 1930s en Alemania fue el poliestireno (PS). También en esta época se creó la primera fibra artificial, el nylon. Su primer uso fue la fabricación de paracaídas para las fuerzas armadas estadounidenses durante la Segunda Guerra Mundial, extendiéndose rápidamente a la industria textil en la fabricación de medias y otros tejidos combinados con algodón o lana. En 1942 aparecieron las melaminas, las resinas epoxicas, el poliuretano y en 1952 el policarbonato. La evolución de este tipo de materiales ha sido muy rápida, al grado que hoy en día se pueden tener miles de materiales plásticos tomando en cuenta los tipos, subtipos, mezclas, etc<sup>3</sup>.

Aunque existen numerosos sistemas de clasificación para los plásticos dependiendo de sus

propiedades fisicoquímicas, casi todos los polímeros sintéticos pueden ser colocados dentro de dos grupos principales: materiales termoestables y materiales termoplásticos. A su vez, los materiales termoestables y termoplásticos pueden subdividirse en espumas, adhesivos, resinas, elastómeros, y así sucesivamente. Los plásticos termoestables se “curan” o adoptan una forma rígida de manera permanente<sup>5</sup>. El “curado” es una reacción química irreversible conocida como reticulación que generalmente se produce bajo calor. Los termoplásticos difieren de los plásticos termoestables en que no pasan por el fenómeno de “curado” como lo hacen los termoestables. Los termoplásticos simplemente se ablandan o se derriten cuando se calientan y bajo estas condiciones pueden ser transferidos a un molde frío para tomar la forma del mismo<sup>3</sup>. Esta característica permite a los termoplásticos tener varios ciclos de fundición y endurecimiento de manera limitada, ya que la exposición repetida a altas temperaturas produce un desgaste en el material, la cual conduce a la eventual degradación de los materiales. En general, los materiales termoplásticos tienden a ser más duro y menos frágiles que los termoestables<sup>6</sup>.

## 1.2. Problemática generada por los plásticos.

Los polímeros sintéticos se han vuelto tecnológicamente importantes desde décadas pasadas, reemplazando diversos materiales dentro de diversas aplicaciones industriales, comerciales y domésticas<sup>7</sup>. Las características que han integrado a los materiales plásticos en la vida cotidiana del ser humano han sido también las causantes del grave problema ecológico que rodea a estos materiales. La producción anual de los plásticos en el año 2012 rondó cerca de las 290 millones de toneladas en el mundo, En América del Norte se produjeron cerca de 60 millones de toneladas (20% del total) en ese mismo año<sup>8</sup>. Dentro de los plásticos sintéticos de mayor consumo en el mundo están los polietilenos (Polietilenos de alta densidad, baja densidad, etc.), seguido del polipropileno, cloruro de polivinilo poliestireno, como se presenta en la Tabla 1.1.<sup>9,10</sup>

**Tabla 1.1.** Producción mundial de plásticos en el año 2012 <sup>8</sup>.

Plástico	Porcentaje de producción (%)
Polietilenos (alta densidad, baja densidad y lineal de baja densidad)	28
Polipropileno	19
Cloruro de polivinilo (PVC)	13
Polietilentereftalato (PET)	5
Poliestireno	4
Otros	31

Una vez terminada su vida útil, estos materiales se acumulan en el medio ambiente ya que no se tiene un sistema de desecho adecuado<sup>11</sup>. La mayoría de los plásticos se confinan en rellenos

sanitarios o se incineran, en promedio sólo un 7% se recicla. Actualmente, la opción del relleno sanitario se considera inadecuada, ya que los volúmenes de los residuos plásticos actuales hacen que los espacios para rellenos sanitarios sean cada vez más escasos y por lo tanto, también elevan su costo<sup>12</sup>. Por su parte, la incineración de plásticos podría ser considerada una alternativa aceptable tomando en cuenta la gran cantidad de energía liberada por la combustión de los plásticos (46000 KJ/Kg vs 4300 KJ/L de petróleo); sin embargo, las legislaciones dentro de diversos países prohíben esta práctica ya que se liberan productos contaminantes como CO, CO<sub>2</sub>, dioxinas, hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs), hollín, entre otros<sup>6</sup>.

Una alternativa que ha funcionado en algunos países es la pirólisis. La pirólisis es la incineración de un material en ausencia de oxígeno, produciendo moléculas de menor peso molecular evitando oxidación del material en CO<sub>2</sub> y agua<sup>6,12</sup>. La investigación se enfoca en el uso de esta tecnología para eliminar los residuos plásticos y obtener nuevos productos, principalmente líquidos, que pueden ser utilizados directamente como combustible u otros productos químicos de valor agregado. Algunos autores<sup>12-14</sup> mencionan una alta flexibilidad con respecto a las características de la materia prima, así como también la posibilidad de utilizar residuos plásticos mixtos tomados de los desperdicios, y plásticos laminados y películas de envasado que son difíciles de reciclar con el uso de tecnologías de reprocesamiento tradicionales<sup>13</sup>. Sin embargo, el método de pirólisis sufre de varios inconvenientes. En el documento de Kumar<sup>6</sup> y colaboradores se menciona que los catalizadores empleados en la pirólisis pueden desactivarse por la deposición de residuos carbonosos, sales, compuestos nitrogenados y demás compuestos presentes en el residuo plástico. Estos materiales pueden permanecer en los catalizadores, lo que dificultaría su reutilización. Esta discrepancia entre autores es importante de considerar, ya que por un lado, se menciona que los residuos plásticos pueden ser empleados sin ningún inconveniente y por otro lado, se menciona que se requiere de una pureza relativamente alta en éstos últimos. Por lo tanto, diversos estudios son necesarios todavía para poder considerar a la pirólisis como una alternativa al tratamiento de los residuos plásticos.

Otra de las alternativas para reducir la velocidad de acumulación de desechos es el reciclado; sin embargo, esta metodología conduce inevitablemente a que los nuevos productos tengan una calidad inferior y con esto se limita el reciclaje a sólo unos cuantos ciclos de utilización<sup>15</sup>. El reciclaje primario es el más popular y consiste en la conversión de los residuos plástico en productos que tienen un nivel de rendimiento comparable al de los productos hechos a partir de plásticos vírgenes. Los residuos pueden ser mezclados con material nuevo para asegurar la calidad del producto<sup>6</sup>. Posteriormente, sigue el reciclaje secundario, del cual se obtienen productos de menor calidad que la del ciclo anterior. Existe la posibilidad en este ciclo de reciclado de volver a separar a los plásticos por tipos genéricos o utilizarlos de manera mixta<sup>6,12</sup>. Finalmente, el orden y el número de operaciones en

un sistema de reciclado secundario, dependerá de los residuos y la calidad final deseada, ya que estos pueden continuar hasta un tercer ciclo, en donde se incluye un reciclado químico como la pirólisis, la cual ya fue explicada previamente<sup>16</sup>. Tomando en cuenta el grave impacto ambiental producido por compuestos xenobioticos como los plásticos, es posible que en algún momento otro tipo de materiales como los bioplásticos resulten en la mejor alternativa a nivel mundial. Sin embargo, a la par del desarrollo de nuevos materiales, se necesitan nuevas técnicas que resuelvan los problemas ecológicos que se generaron a partir de la gran utilización de los plásticos de alta recalcitrancia<sup>1</sup>.

### 1.3. Polietileno.

Como ya se mencionó anteriormente, el polietileno representa un volumen muy importante a nivel mundial en cuanto a producción<sup>8</sup>. Comercialmente es el material termoplástico mejor conocido y cuya estructura se muestra en la figura 1.1.

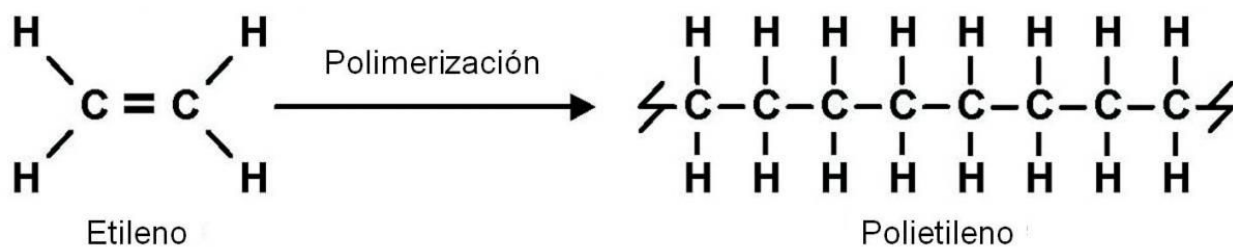
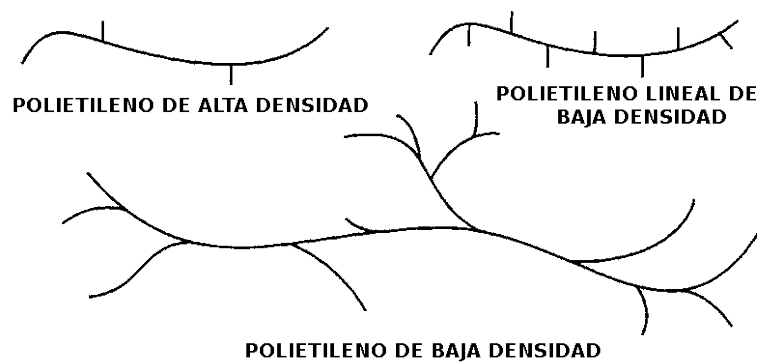


Figura 1.1. Fórmula química del polietileno y síntesis a partir del etileno.

Se trata de un polímero muy versátil debido a sus propiedades químicas, las cuales le proporcionan al material una alta tenacidad, ductilidad, resistencia química, permeabilidad y absorción de agua muy baja. El polietileno es estable a 290°C en ausencia de O<sub>2</sub> y a temperaturas mayores se descompone y genera polímeros de menor peso molecular. Cuando se incrementa la temperatura a más de 350°C se generan productos gaseosos como buteno. En presencia de oxígeno el polietileno es mucho menos estable y a temperaturas menores es posible generar cambios fisicoquímicos, producto de la oxidación del material<sup>17</sup>. Los cambios producidos impactan en su mayoría en la disminución del peso molecular.

Un carácter importante de la estructura química del polietileno es la cristalinidad parcial del sólido. Las variedades de polietileno producido comercialmente tienen que ver con el grado de ramificación del material y por ende, con el grado de cristalinidad del mismo, de esta manera se tendrá un material más cristalino mientras menos ramificaciones se tengan<sup>3</sup>. En la figura 1.2 se puede observar el grado de ramificación de polietilenos de diferentes densidades.



**Figura1.2.** Arreglo molecular de algunos tipos de polietileno<sup>3</sup>.

## 1.4. Degradación abiótica y biótica del polietileno.

La degradación abiótica es aquella que sucede por fuentes de energía naturales como la radiación solar y la temperatura<sup>7,10</sup>. Durante este proceso se ha observado que se generan grupos polares en el polietileno, así como también escisiones en las cadenas moleculares. Los efectos netos de este proceso son disminución del peso molecular, disminución de las propiedades mecánicas, disminución de las regiones cristalinas, en la densidad y, en etapas prolongadas, rupturas superficiales<sup>18</sup>. De manera general, los factores que retrasan la degradación del polietileno y otros plásticos son los siguientes:

- Alta hidrofobia.
- Alto peso molecular.
- Arreglos moleculares cristalinos.
- Grupos funcionales poco reactivos.

Debido a esas barreras energéticas, en condiciones naturales la degradación de los plásticos, incluyendo al polietileno, ocurre de manera muy lenta y requiere de ciertas condiciones tales como temperatura, radiación solar y presencia de oxígeno<sup>19</sup>. Cuando el polietileno se degrada abióticamente se incorporan nuevos grupos funcionales de menor energía de enlace (Ej. Enlace C-H: 414 KJ / mol v.s. enlace C-O: 352 KJ / mol). En la figura 1.3 se muestran algunos productos de degradación del polietileno debido a factores abióticos.

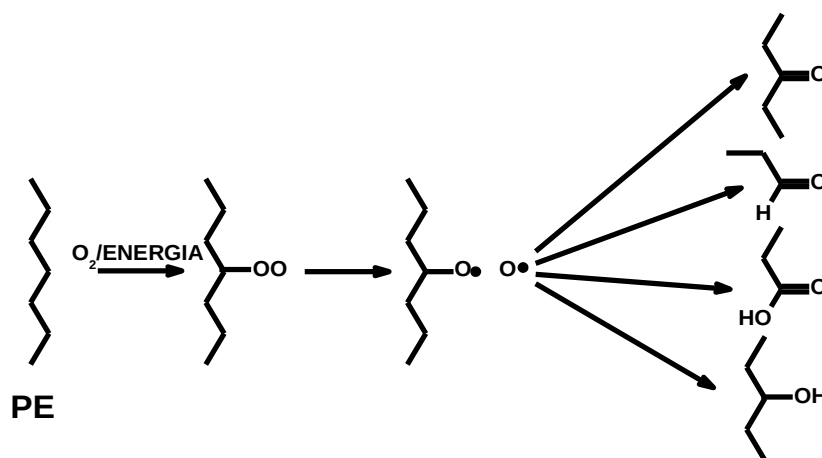


Figura 1.3. Productos de degradación abiótica del polietileno.

Estas modificaciones impactan en las características antes mencionadas, de esta forma es posible que estos materiales puedan ser más susceptibles a ser atacados por poblaciones microbianas inespecíficas, lo cual lleva a su biodegradación<sup>1</sup> (degradación biótica). Un material puede ser considerado como biodegradable cuando se vuelve susceptible al ataque microbiano. El resultado de la biodegradación es la formación de  $H_2O$ ,  $CO_2$  ó  $CH_4$ ; nueva biomasa y ausencia de materiales tóxicos u otro tipo de subproductos<sup>19,20</sup>.

Entendiendo la gran importancia que representa el polietileno en la actualidad y que su baja reactividad es una barrera energética que necesita superarse para lograr su biodegradabilidad, la necesidad de convertir al polietileno en un material menos recalcitrante en un tiempo significativamente corto se ha vuelto un campo de estudio actual. Una propuesta es la utilización de aditivos capaces de acelerar la reacción del plástico con el oxígeno atmosférico, a los cuales se les denomina como prooxidantes, con los cuales se puede acelerar el proceso abiótico de degradación oxidativa<sup>18-21</sup>. Este tipo de tecnología es la que se emplea en los plásticos oxodegradables cuyo mecanismo general inicia cuando los iones metálicos incorporados en los plásticos forman especies oxidantes a causa de la radiación solar o la temperatura. Estas especies metálicas serán capaces de tomar electrones del polietileno, generar radicales libres que inicien una cadena de reacciones de óxido-reducción que finalmente produzcan grupos funcionales como los que se observan en la figura 1.3. Se debe mencionar que en proceso de degradación abiótica no hay mineralización de los plásticos, en otras palabras, el plástico no es convertido a  $CO_2$ , agua o metano<sup>18,21,22</sup>.

En cuanto a la biodegradación de polietileno, se ha observado que una vez oxidado el plástico abióticamente, los microorganismos son capaces de crecer en la superficie del polímero y utilizarlo como fuente de carbono<sup>23-25</sup>. Por ejemplo, cuando el polietileno se trata con agentes abióticos como luz UV (durante 8 semanas) y posteriormente es incubado con *Streptomyces viridosporus*, se



comprobó que el polímero resultante es de un tamaño menor debido a la presencia de la bacteria (pérdida de peso molecular de 60000 Da a 40800 Da) y además de que las propiedades mecánicas también se vieron afectadas (el polímero tratado es 50 % menos elástico que el control). La evidencia que asociara las pérdidas de las propiedades del polímero con el metabolismo bacteriano (como evolución de CO<sub>2</sub> o aumento de la biomasa) no fueron demostrados, sin embargo, si se evidenció que un tratamiento abiótico permitiera que un polímero sintético presentara deterioros propios de una biodegradación<sup>26</sup>.

La hipótesis que se ha planteado es que una vez incorporado el plástico al interior de las células las enzimas metabólicas, como la alcohol deshidrogenasa, serán capaces de utilizar y seguir oxidando al sustrato hasta que se incorpore al metabolismo central de los microorganismos. Lo anterior se comprobó parcialmente cuando se incubaron muestras de polietileno con cultivos celulares de *Pseudomonas putida* y *Bacillus brevis*<sup>7</sup>, encontrándose que al colocar un inhibidor como CO, la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa se abatió y no fue posible encontrar cambios oxidativos en el polímero incubado en este sistema<sup>27</sup>. El mecanismo exacto de incorporación de los plásticos al metabolismo microbiano es aún desconocido, sin embargo, sí existen evidencias de la biodegradación de polietileno en ambientes aerobios controlados, ya que se ha detectado la incorporación de nuevos grupos funcionales en el polímero residual, el incremento en la producción de CO<sub>2</sub> y consumo de O<sub>2</sub>, así como el aumento de la biomasa durante periodo de incubación, entre otros<sup>7,21,28</sup>.

En la literatura existen trabajos en los que se asocia la oxidación del polietileno con la biodegradación por distintos microorganismos. En la tabla 1.2 se muestran algunos trabajos seleccionados en los que se describen los cambios oxidativos que sufre el polietileno y como es que posteriormente, este puede ser biodegradado por distintos microorganismos, ya sean hongos o bacterias identificados<sup>25,29-32</sup> o poblaciones inespecíficas de microorganismos provenientes de suelos de composta<sup>28,33,34</sup>. Los trabajos de biodegradación fueron realizados en polietileno de baja densidad (LDPE) así como en polietileno linear de baja densidad (LLDPE), mezclados con iones metálicos como moléculas prooxidantes. Los polietilenos utilizados no se mezclaron con ningún otro material como almidón u otro material biodegradable, así que los efectos observados fueron directamente a causa de la de oxidación abiótica (envejecimiento acelerado con luz UV y temperatura); y posteriormente, a causa de la incubación con microorganismos. Sin embargo, los mecanismos por los cuales los microorganismos provocan la biodegradación de un material como el polietileno no ha sido descrito en la literatura, ni tampoco el papel que pueden jugar enzimas extracelulares como las celulasas, en el caso de microorganismos celulolíticos, por ejemplo<sup>35</sup>.

En el trabajo de Santo y colaboradores se logró aislar y caracterizar una oxidorreductasa

bacteriana la cual se propuso como la principal responsable de las oxidaciones observadas en polietileno, pero no de que esta enzima participara de manera directa en el mecanismo de biodegradación. Al comparar esta la lacasa aislada de *R. ruber* con una lacasa comercial del hongo *T. Versicolor* se observó que sólo la lacasa de *R. ruber* generaba oxidaciones en el polietileno mientras que la otra enzima no lo pudo hacer ya que la enzima bacteriana se encuentra adaptada a ser activa a temperaturas superiores a los 60°C, mientras que la enzima fúngica no<sup>32</sup>.

De esta manera, al encontrar una enzima que forma parte de un microorganismo que es capaz de proliferar en presencia del polietileno, se pudiera pensar que tal vez esta lacasa sí es parte del mecanismo de biodegradación del polietileno ya que quizá el microorganismo necesita un polietileno oxidado para posteriormente continuar, mediante otros procesos, la utilización de este sustrato como parte de su metabolismo.

## DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD

**Tabla 1.2.** Catálisis oxidativa de polietileno por factores abióticos, prooxidantes metálicos y su posterior tratamiento con microorganismos.

Ref.	Catalizador	Condiciones oxidativas	Microorganismo	Observaciones finales
33	Identidades no mencionadas.	Luz solar Oxidación térmica (45. 55. 65 °C).	Hongos aislados del medio ambiente (detalle de las especies no mencionados)	Fragmentación molecular Enlaces C - O $I_{CO} = +47\%$ Colonizaciój
34	Estearatos: Mn y Fe.	Oxidación térmica (70°C)	Poblaciones microbianas inespecíficas de suelo de composta y de suelo forestal	Enlaces C - O $I_{CO} = +100\%$ PM = -15 %
29	Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPION)	Medio mínimo	<i>Microbacterium sp.</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Bacterium Te68R</i> Cepa PN12	Enlaces C - O Cambio en PM Fragmentación molecular
30	Estearatos: Ca y Fe.	Radiación ( $\lambda=300-800\text{nm}$ )	<i>Bacillus cereus</i> <i>B. megaterium</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. borstelensis.</i>	$\theta = -11.5\%$ $\tau = +44.1\%$ Enlaces C - O $I_{CO} = -75\%$ Colonización $m = -0.6\%$ $R_T = -50\%$ $E_R = -99\%$ Colonización $m = -3\%$
28	Bionolle® polyester.	Medio acuoso	Poblaciones microbianas del suelo.	PM = -20% (de 120 a 96 KDa) Enlaces C - O $I_{CO} = +40\%$ Cri% = + 42%
32	-	Radiación UV	<i>Rhodococcus ruber</i> C208	60% de mineralización del sustrato.
31	-	HNO <sub>3</sub> (0.65%)	<i>Microbacterium paraoxydans</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PM = -96% (de 71 a 2.5 KDa) Enlaces C - O $I_{CO} = -90\%$ 50% de mineralización del sustrato
25	Estearatos: Fe, Co y Mn.	Oxidación térmica (55. 60 y 70°C) Radiación ( $\lambda=300-800\text{nm}$ )	<i>Bacillus cereus</i> <i>B. megaterium</i> <i>B. subtilis</i>	

**I<sub>CO</sub>**: Índice de carbonilo, **PM**: peso molecular relativo,  **$\theta$** : ángulo de contacto,  **$\tau$** : tensión de adhesión, **m**: pérdida de masa, **R<sub>T</sub>**: resistencia a la tensión, **E<sub>R</sub>**: elongación relativa, **Cri%**: porcentaje de cristalinidad.

## 1.6 Oxidación enzimática del polietileno.

Maneras alternativas y recientes para la oxidación del polietileno involucran la maquinaria enzimática de ciertos microorganismos capaces de producir un efecto oxidante sobre este polímero. Tal es el caso de algunas oxidoreductasas, principalmente se han reportado lacasas y peroxidasas como los principales biocatalizadores de estas reacciones de oxidación<sup>11,32,36,37</sup>, aunque en algunos casos no es evidente el efecto de la enzima. En la tabla 1.3 se encuentran algunos trabajos en los que se han empleado alguna de estas enzimas para la oxidación de polietileno y los cambios fisicoquímicos que han producido en el material, cabe señalar que estos trabajos se enfocan a describir los cambios físicos y químicos sobre el plástico y no se ha tratado de comprobar el efecto en la biodegradación después del tratamiento enzimático.

**Tabla 1.3.** Utilización de oxidoreductasas como agentes oxidantes de polietileno.

Referencia	Enzima	Observaciones
38	Peroxidasa de soya	Nuevos grupos funcionales ( -C=O. - C-OH) $\theta = -28.7\%$
32	Lacasa ( <i>R. rubber</i> )	Nuevos grupos funcionales ( -C=O. - C-OH) PM= -20%
36	Manganeso peroxidasa (IZU-154. <i>Deuteromycotina</i> )	PM= -83% R <sub>T</sub> = -50% E <sub>R</sub> = -100%
37	Lacasa + HBT ( <i>T. versicolor</i> )	PM= -88% R <sub>T</sub> = -50% E <sub>R</sub> = -100%

PM: peso molecular relativo,  $\theta$ : ángulo de contacto,  $\tau$ : tensión de adhesión, m: pérdida de masa, R<sub>T</sub>: resistencia a la tensión, E<sub>R</sub>: elongación relativa.

Estas oxidoreductasas son capaces de catalizar reacciones de oxidación en una variedad amplia de sustratos con estructuras químicas muy diversas<sup>39</sup>. En estas enzimas, el sitio activo se encuentra parcialmente expuesto al disolvente, son capaces de generar radicales libres o especies reactivas, llamados mediadores, los cuales difunden al medio de reacción y son capaces de oxidar sustratos de gran tamaño, sin necesidad de que el sustrato se interne en la cavidad del sitio activo<sup>37</sup>. En el caso específico de plásticos como el polietileno, debido a la alta energía del enlace C-C (375 KJ/mol) se requiere que las especies involucradas en las reacciones enzimáticas tengan suficiente poder oxidante para modificar la estructura del plástico<sup>40</sup>. Por este motivo, es deseable utilizar aquellas enzimas de mayor poder oxidante que son capaces de generar radicales libres lo suficientemente reactivos como para vencer la barrera energética dentro de las moléculas de los

plásticos. Adicionalmente, estas reacciones pueden llevarse a cabo a temperaturas moderadas y en condiciones de bajo niveles de toxicidad.

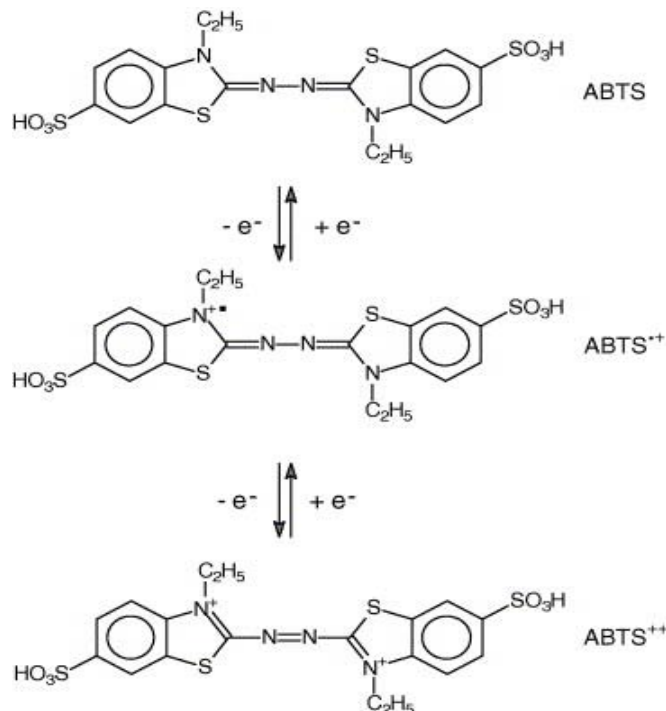
## 1.7. Oxidoreductasas empleadas en este estudio.

### 1.7.1 Lacasa.

Las lacasas (EC 1.10.3.2) son enzimas oxidorreductasas que contienen átomos de cobre en su sitio activo. Pueden catalizar la oxidación de una gran variedad de sustratos, tales como fenoles y anilinas, utilizando como aceptor de electrones al oxígeno, el cual se reduce a agua. Durante la reacción de oxidación del sustrato se forman radicales libres, los cuales pueden reaccionar entre sí para formar dímeros, trímeros y polímeros<sup>41</sup>; aductos con otras moléculas<sup>42</sup> o pueden actuar como mediadores, oxidando o generando radicales libres sobre otros compuestos<sup>39,43</sup>. Este tipo de enzimas pueden ser obtenidas a partir de los denominados hongos de pudrición blanca, tal es el caso de *Coriopsis gallica*, el cual es un hongo capaz de producir lacasa y manganeso peroxidasa. Las capacidades oxidativas de estas enzimas son de gran interés ya que está reportado que la enzima lacasa de *C. gallica* (UAMH 8260) es capaz de oxidar una gran variedad de compuestos en disolventes orgánicos como acetonitrilo al 20% y retener hasta 80% de su capacidad catalítica<sup>43,44</sup>. Esta enzima tiene además un valor de potencial redox alto comparado con otras lacasas<sup>45</sup>, lo cual, como se mencionó anteriormente, es deseable para contender con sustratos difíciles de oxidar. Por otro lado, el rango de sustratos para las lacasas puede ser extendido con la adición de sustratos mediadores como ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) ó HBT (1-hidroxibenzotriazol). De manera general, un mediador debe ser una molécula que tenga las siguientes características<sup>46-48</sup>:

- Sea sustrato de lacasa.
- Sea suficientemente estable en su forma radical para difundir en el medio de reacción y alcanzar el sustrato blanco.
- Tener energía de ionización o potencial redox lo suficientemente altos para llevar a cabo la oxidación del sustrato blanco.
- Preferentemente barato y de bajo impacto ambiental.

Ejemplificando la reacción de un mediador, en la figura 1.4, se muestra los estados de oxidación del ABTS, uno de los mediadores más utilizados en reacciones de oxidación con lacasa, de acuerdo con la literatura<sup>49,50</sup>.



**Figura 1.4.** Transformaciones redox del ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) a su forma radical catiónica (ABTS<sup>•+</sup>) y dicatiónica (ABTS<sup>2+</sup>)

### 1.7.2. Citocromo c modificado con polietilenglicol.

El citocromo c no es una enzima, es una proteína que participa en la cadena de transporte de electrones en las células eucariotas. Su función biológica es transportar electrones entre los complejos citocromo c oxidasa y citocromo c reductasa. En su sitio activo tiene un grupo prostético hemo el cual, a diferencia de las peroxidasa clásicas, está ligado a la proteína por dos enlaces covalentes del tipo tioéter a través de las cadenas laterales de las cisteínas 14 y 17. Su actividad catalítica en sistemas vivos no se ha reportado hasta la fecha sin embargo existen trabajos en los que se reporta su actividad peroxidasa en solución, degradando hidroperóxidos, oxidando 4-nitrofenol, ácido 2-ceto-4-tiometil butírico, ABTS, entre otros<sup>51</sup>.

El uso de esta proteína como catalizador puede justificarse por el hecho de que es bastante versátil en cuanto al rango de pH (entre 5 y 9) y temperaturas (de 50 a 80 °C) en las cuales mantiene arriba del 60% de su actividad catalítica tipo peroxidasa<sup>51</sup>. Adicionalmente, como ya se mencionó, el grupo hemo se encuentra unido covalentemente, estabilizando la estructura y reduciendo así la pérdida del grupo prostético por la adición de disolventes orgánicos: por ejemplo, se ha reportado que este citocromo c es catalíticamente activo en 90% de tetrahidrofurano<sup>52</sup>.

Se sabe que la modificación química de las enzimas con PEG o polisacáridos puede conferir

cierta termoestabilidad en un intervalo de temperatura de 50 a 70° C. Dicha estabilización se explica por la solvatación de los residuos de aminoácidos unidos al PEG, ya que éste restringe su movilidad molecular, disminuyendo así la tasa de desnaturalización de la proteína<sup>53</sup>. Utilizando esta técnica se ha demostrado que el citocromo c de corazón de caballo modificado con PEG puede llegar a ser termoestable en temperaturas superiores a los 80°C en solución acuosa y además ser catalíticamente superior a la proteína original (incremento del doble en actividad) en presencia de sustratos hidrófobos como los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH's)<sup>53</sup>. De esta manera se podría incrementar la oxidación del polietileno, ya que como se sabe, al incrementar la temperatura, éste material se puede volver más reactivo, al ser más susceptible a la oxidación en presencia de agentes oxidantes como el oxígeno<sup>17</sup>.

## **2. HIPÓTESIS.**

La oxidación enzimática del polietileno generará un material más susceptible a la biodegradabilidad.

## **3. OBJETIVO GENERAL.**

Establecer condiciones de reacción y utilizar una batería de análisis para evidenciar que el polietileno de baja densidad puede ser oxidado por enzimas

### **3.1. Objetivos particulares.**

1. Evaluar diferentes sistemas enzimáticos (sólo enzima, enzima + mediador. temperaturas elevadas) que favorezcan que membranas de polietileno de baja densidad sean oxidadas.
2. Caracterizar las propiedades mecánicas y fisicoquímicas del polietileno oxidado por las enzimas.
3. Observar a través de SEM la interacción entre el PE tratado enzimáticamente y un microorganismo modelo (*T. Sanguineus*) para.



## 4. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 4.1. Enzimas.

Las enzimas a emplear en este trabajo, son enzimas producidas en el laboratorio y consisten en una lacasa del basidiomiceto *Coriolopsis gallica*<sup>44</sup> y un citocromo c modificado con polietilenglicol (PEG)<sup>53</sup>.

#### 4.1.1. Laccasa (Lac).

La enzima lacasa se produjo en laboratorio de acuerdo a Pickard y colaboradores<sup>43</sup> y se purificó de acuerdo a Rodríguez y colaboradores<sup>54</sup>. Debido a que la enzima se encontraba en una solución de glicerol, antes de utilizarla fue necesario dializarla contra una solución amortiguadora de 60mM de fosfatos, pH=6.0. Para la diálisis se utilizó una membrana de 12-14 KDa marca Spectrum Labs®.

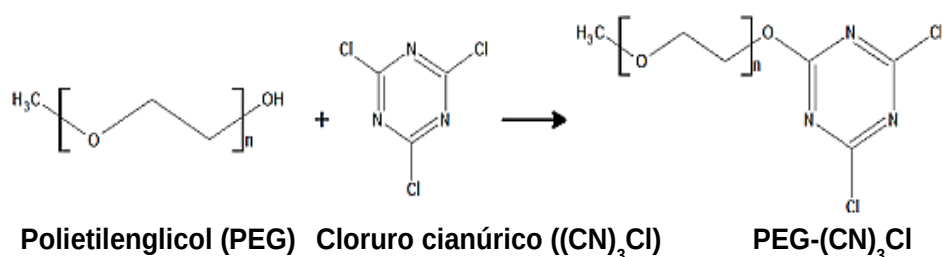
#### 4.1.2. Citocromo c modificado (Cit C-PEG).

El citocromo c (C2506) y el metiléter de polietilenglicol de peso molecular 5 KDa (81323) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI). El polietilenglicol activado con cloruro cianúrico (PEG-(CN)<sub>3</sub>Cl) se utilizó para modificar las lisinas (20 residuos) en la superficie del citocromo c a través de una reacción de sustitución nucleofílica entre el carbono del grupo nitrilo y el amino primario de las lisinas. El procedimiento anterior se basó de acuerdo a lo descrito por Boada<sup>55</sup>, Abuchowski<sup>56</sup> y Garcia-Arellano<sup>53</sup>. A continuación se desglosan brevemente los pasos seguidos para la síntesis del PEG-Cl(CN)<sub>3</sub>.

1. En un matraz de 250mL se colocan 10g de PEG y aproximadamente 1mL de acetonitrilo, para ayudar a disolver el PEG, esta operación se realizó a 70°C en un baño de agua.
2. Una vez disuelto el PEG, esta solución se le añadió a 40mL de tolueno en donde previamente se le había agregado el carbonato de sodio y el cloruro cianúrico.
3. La mezcla se agitó por 24h. Finalizada la reacción, en un embudo de vidrio y con papel filtro del No. 1 se separó el carbonato de la solución.
4. Al filtrado se le agregaron 100mL de hexano frío (ayudándose de un baño de hielo).
5. El precipitado junto con la solución se dividió dentro de tubos de teflón para su posterior centrifugación a 12100 g durante 10min a 4°C.

6. Se desechó el sobrenadante y se realizaron lavados y centrifugados consecutivos para eliminar el cloruro cianúrico residual.
7. El PEG activado se secó por 48h en presencia de malla molecular para reducir su hidratación.
8. Al registrar un peso constante. se calculó el rendimiento con base en la cantidad de producto final.

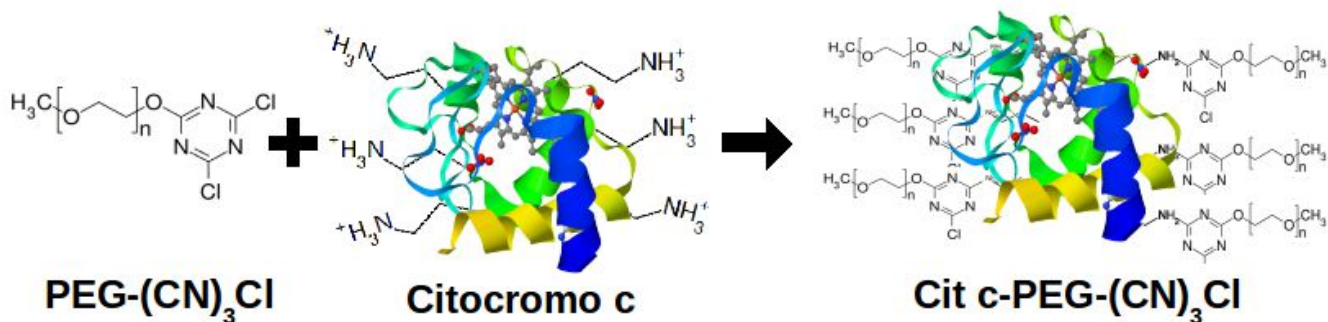
El rendimiento de la reacción de modificación del PEG, se determinó con la metodología descrita por García-Arellano<sup>53</sup> en la cual se realizó una valoración de los iones cloruros disueltos en agua mediante la técnica de nitrato de plata y cromato de potasio<sup>57</sup>. Los rendimientos alcanzados fueron alrededor del 30%.



**Figura 4.1.** Reacción de modificación del polietilenglicol con cloruro cianúrico. La reacción se llevó a cabo en tolueno bajo agitación constante durante 24h.

La modificación del citocromo c se realizó de la siguiente manera:

1. Se pesaron 9mg de Cit C y se disolvieron en 5mL de solución amortiguadora de boratos 40mM. pH=10.
2. Por separado se pesó el PEG-Cl (CN)<sub>3</sub> tomando en cuenta el número de lisinas presentes en el citocromo. en este caso 20. Se requiere un exceso molar de 20:1. por lo que se utilizó al rededor de 2g de PEG-Cl(CN)<sub>3</sub>.
3. Una vez disueltos ambos reactivos en la solución amortiguadora se dejaron en agitación suave por 24h en un vial de vidrio a temperatura ambiente.
4. Al terminar la reacción. la mezcla se dializó durante 24h a 4°C contra un volumen de 4L. Durante ese periodo se realizaron tres cambios de una solución amortiguadora de fosfatos 60mM, pH=6.
5. Para observar el grado de modificación del citocromo se realizó una electroforesis en gel desnaturalizante de acrilamida (SDS-PAGE) y se comprobó el aumento en peso molecular del citocromo modificado. Como control. se utilizó un Cit C puesto en contacto con PEG-Cl (CN)<sub>3</sub> en un amortiguador a pH=6. en donde no debería ocurrir la reacción de sustitución nucleofílica que ocurre cuando el pH es básico.



**Figura 4.2.** Reacción del citocromo c con el polietilenglicol modificado (PEG-(CN)<sub>3</sub>Cl). El citocromo c reacciona a través de los residuos de lisinas que se encuentran en su superficie. Se forma un citocromo que se encuentra rodeado de una capa de polietilenglicol.

## 4.2. Sustrato.

El sustrato a oxidar fue polietileno comercial de baja densidad (no se posee información sobre el peso molecular ni la densidad del sustrato) en forma de película con 32  $\mu\text{m}$  de espesor y 1.5 cm x 3.5 cm ó 1.5 cm x 14 cm, dependiendo de la prueba a realizar. Para obtener el ancho de 1.5 cm se utilizó una guillotina con doble hoja y con un espacio de corte estándar de 1.5cm de espesor. El polietileno una vez en película se preparó lavándolo dentro de tubos falcon de 35mL en el vortex con agua desionizada y una solución de extran, posteriormente con etanol al 96% y finalizando con un secado a temperatura ambiente.

## 4.3. Tratamientos enzimáticos.

Los tratamientos enzimáticos se realizaron en medios acuosos, en el pH óptimo para cada enzima y por periodos de 24 h. Para la lacasa, se utilizó un amortiguador de succinatos pH = 4.5, 60 mM, así como también soluciones de los mediadores ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), HBT (1-hidroxibenzotriazol) y fenol a concentraciones de 0.1mM, 1mM y 10mM.

Para el citocromo C se utilizó una solución amortiguadora de fosfatos pH=6 y concentración de 60mM. En este caso en particular, la temperatura utilizada fue de 80°C controlada mediante un baño de agua y adicionando al medio de reacción 5 $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrógeno 200mM cada hora hasta cumplidas 18h de tratamiento, posteriormente se dejó que la reacción continuara hasta cumplir las 24 h.

## 4.4. Caracterización del polietileno.

### 4.4.1. Ángulo de contacto.

Originalmente los plásticos están diseñados para no ser permeables al agua, su naturaleza hidrófoba se debe a que las moléculas que los componen tienen enlaces que no son polarizables y que no presentan afinidad por el agua. Para esta técnica se utilizó un goniómetro marca Ramé-Hart® modelo 100-07-00. Las condiciones de operación fueron 16µL de agua destilada grado laboratorio en 3 distintas posiciones de la superficie de la membrana de polietileno (ver figura 4.1).

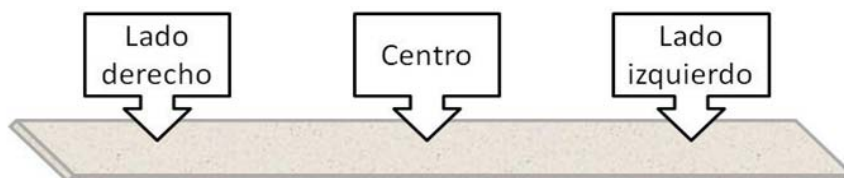


Figura 4.3. Posiciones en la superficie de las membranas de polietileno evaluadas con ángulo de contacto.

Se utilizó una atmósfera saturada de agua y una temperatura de  $28 \pm 2$  °C. Para cuantificar el ángulo de contacto, se grabó una filmación de 1.5 minutos de duración con una video cámara con lente ajustado a grabar únicamente la superficie de polietileno. El programa en el que se grabó fue "Pinnacle studio15". Posteriormente para cada filmación se extrajeron 4 imágenes a los 22.5, 45.0, 67.5 y 90.0 segundos y se visualizaron con el programa "ImageJ 1.48r". Para obtener las mediciones del ángulo de contacto se siguió la metodología establecida por Kwok y colaboradores<sup>58</sup> y Neumann y colaboradores<sup>59</sup>. En ésta se debe de seguir un análisis de imagen para reducir el ruido generado por la poca calidad de la imagen digitalizada. Primero se debe transformar una imagen en escala de grises a una en blanco y negro capaz de ser analizada fácilmente por el programa ImageJ (ver figura 4.2).

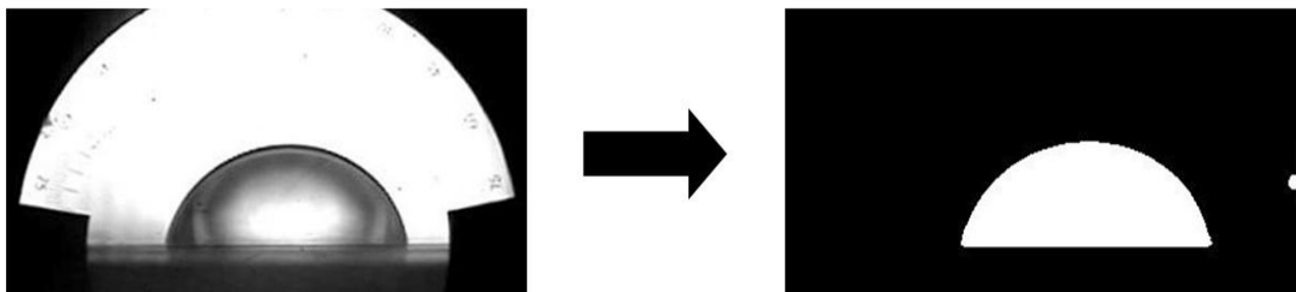


Figura 4.4. Procesamiento de imagen utilizado para la medición de ángulo de contacto en las películas de polietileno.

El programa mediante un método de iteraciones determinó el área en blanco y el ángulo que

se forma con la horizontal. La metodología se le conoce como el método de Análisis Axisimétrico de la Forma de la Gota (método ADSA por sus siglas en inglés<sup>59</sup>). Finalmente través de este análisis de imagen se obtiene de manera directa el valor del ángulo de contacto ( $\theta$ ) el cual sirve para calcular la tensión de adhesión ( $\tau$ ). Ambos parámetros son importantes en cuanto a la identidad hidrófoba de la superficie<sup>30,60</sup>. La ecuación para determinar la tensión de adhesión ( $\tau$ ) es la siguiente:

$$\tau = \gamma_{H_2O} \cos(\theta) \quad (1)$$

En donde " $\gamma_{H_2O}$ " es la tensión superficial del agua y " $\theta$ " es el ángulo de contacto determinado.

#### 4.4.2. Espectroscopía infrarroja (FTIR-ATR).

Debido a que el polietileno se encuentra conformado únicamente por enlaces carbono e hidrógeno (C-H), una forma de evaluar la oxidación es determinar si después del tratamiento oxidativo hay presencia de nuevos grupos funcionales, principalmente aquellos en donde haya oxígeno unido a través de un doble enlace con carbono (C = O). La espectroscopía infrarroja es una técnica analítica que ayuda a determinar los modos vibracionales de los enlaces covalentes en moléculas orgánicas, de esta manera se pudo comparar el tipo de enlaces en el polietileno control y en el polietileno tratado.

Se utilizó un equipo PerkinElmer® Spectrum RXI con un accesorio "Miracle Single-Reflection ATR". Los espectros fueron obtenidos en el equipo previamente mencionado y analizados en el software "Spectrum v5.3.1". A través de esta técnica analítica fue posible obtener el parámetro  $I_{CO}$  (índice de carbonilo)<sup>33</sup>, el cual es una relación entre absorbancias y se determina a través de la siguiente ecuación:

$$I_{CO} = \frac{A_{\lambda=1720}}{A_{\lambda=1462}} \quad (2)$$

Donde  $A_{1720}$  y  $A_{1462}$  corresponde a la absorbancia de las bandas de los modos vibracionales que aparecen a  $1720 \text{ cm}^{-1}$  y  $1462 \text{ cm}^{-1}$  respectivamente. El índice de carbonilo es considerado una medida de la oxidación del polímero de polietileno, ya que establece la relación de grupos carbonilo (aldehídos, cetonas, etc.) en relación a los grupos metilenos del polietileno.

#### 4.4.3. Resistencia a la tensión y elongación relativa.

Las propiedades mecánicas de los plásticos que se trataron enzimáticamente fueron la

resistencia a la tensión (RT) y la elongación relativa (ER). Se empleó un tensiómetro marca Instron®, de la serie 5860. Con la ayuda de este instrumento las películas de polietileno de dimensiones 1.5cm x 15cm fueron sometidas a un estrés mecánico en el cual se estiraron longitudinalmente hasta el punto de ruptura. Para cada película se obtuvo los datos de carga máxima (cmax) y longitud máxima (li) que finalmente fueron utilizados en las siguientes ecuaciones.

$$R_T = \frac{c_{max} \cdot g}{15mm \cdot 32\mu m} \times 1000 \quad (3)$$

Donde  $g$  es la constante de aceleración de la gravedad ( $9.81 \text{ m/s}^2$ ), 15mm representa la longitud transversal de la película de polietileno que es sometida a la tensión y  $32\mu\text{m}$  es el espesor de la muestra.

$$E_R = \frac{\Delta l}{l_0} \times 100 \quad (4)$$

En donde  $\Delta l$  es la diferencia de longitudes máximas alcanzadas por las películas de polietileno antes y después del tratamiento enzimático y  $l_0$  es la longitud máxima de la película antes del tratamiento.

#### **4.4.4. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).**

Con el fin de determinar los cambios en la reactividad del polímero transformado enzimáticamente, se realizó una calorimetría diferencial de barrido empleando alrededor de 4mg de polietileno dentro de crisoles de aluminio con tapa. La medición se realizó en un calorímetro marca NETZSCH® modelo DSC 200F3. Se siguió una rampa de calentamiento de  $10^\circ/\text{min}$  durante 30min hasta llegar a los  $160^\circ\text{C}$ , posteriormente se mantuvo la temperatura durante 5min y se prosiguió con el enfriado a la misma rampa de  $10^\circ/\text{min}$  hasta llegar a los  $50^\circ\text{C}$  (ISO 11357-3). Mediante esta técnica fue posible la determinación de la temperatura de fusión ( $T_m$ ), la entalpía de fusión ( $\Delta H_m$ ) y el porcentaje de cristalinidad de la muestra de polietileno (Cri%).

La determinación de la temperatura de fusión se realizó de manera gráfica a partir del termograma obtenido por el equipo con el programa "NETZSCH Advanced Software".

Para la obtención de la entalpía y el grado de cristalinidad, los datos se graficaron en el programa "QtiPlot 0.9.8.8 svn 2255", las gráficas se integraron en una región que comprendió desde los  $45.5$  hasta los  $133.5 \text{ }^\circ\text{C}$  a través del método de la regla del trapecoide. Cuando se obtuvo el valor

correspondiente al área se empleó la siguiente ecuación:

$$\Delta H_m = \frac{A}{m \cdot k} \quad (5)$$

Donde  $A$  es el área medida por el programa,  $m$  es la masa de la muestra colocada en el equipo y  $k$  es una constante que corresponde al material de referencia utilizado en la termo balanza, en éste caso se utilizó un valor de 144.14 que corresponde a los crisoles de aluminio. Para la estimación del porcentaje de cristalinidad se empleó la siguiente ecuación, que parte del valor de la entalpía de fusión de polietileno 100% cristalino (293 J/g).

$$cri(\%) = \frac{\Delta H_m}{293 \frac{J}{g}} \times 100 \quad (6)$$

#### 4.4.5. Incubación con microorganismos.

Una forma complementaria de evaluar la disminución en las propiedades recalcitrantes del polietileno fue la incubación del plástico tratado en presencia de un microorganismo del suelo. De esta forma se pensó en que si se encontraba evidencia de la interacción de dicho microorganismo en las membranas de polietileno, esto podría indicar que la oxidación enzimática favorece la biodegradabilidad del polietileno ya que en los medios de cultivo, el polietileno sería la única fuente de carbono.

El medio que se empleó fue un medio mineral cuya composición en gramos por litro fue de<sup>61</sup>:  $K_2HPO_4$ , 1 g;  $KH_2PO_4$ , 0.2 g; NaCl, 1 g;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0.002 g;  $(NH_4)_2SO_4$ , 1 g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.5 g;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 0.001 g;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.001 g;  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 0.001 g y  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ . 0.01 g, pH=7.0.

El microorganismo empleado fue un *Trichoderma sanguineus* (CEIBMD01)<sup>62</sup> (Figura 4.3) obtenido del laboratorio de biología molecular de hongos del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB), UAEM, Cuernavaca, Morelos, mediante la colaboración con el Dr. Jorge Luis Folch Mallol. Este hongo fue aislado de un sitio del estado de Veracruz contaminado por un derrame de petróleo. La cepa mostró ser termorresistente, halorresistente y además de tener actividad de lacasa



**Figura 4.5.** *Trichoderma sanguineus* en medio PDA a los siete días de incubación.

#### **4.4.6. Microscopía electrónica de barrido (SEM).**

La microscopía electrónica de barrido fue utilizada para observar la interacción entre las membranas de polietileno tratadas enzimáticamente y el microorganismo seleccionado. De tal manera que en aquellos tratamientos en donde hubiera presencia microbiana se pudiera encontrar una co-relación entre la oxidación del plástico y la colonización de las películas por parte de *T. Sanguineus*. Aunque la colonización no es un indicador determinante de la biodegradación del plástico, si puede ayudar para evidenciar que el tratamiento enzimático disminuye la energía interfacial del polietileno debido a la oxidación.

Las micrografías se realizaron en el Instituto de Fisiología de la UNAM (IFC-UNAM) en Ciudad Universitaria bajo la asesoría del Dr. Fernando García. Se utilizó un microscopio JEOL®, modelo JSM-5410LV. La fijación y la preparación de las muestras corrió a cargo del Dr. García y el procedimiento seguido se puede consultar en la página del IFC-UNAM (<http://www.ifc.unam.mx/servicios/imagenologia>). Finalmente, con ayuda del equipo se exploró toda la superficie de cada muestra y se tomaron micrografías que evidenciaron la interacción del microorganismo y la película de plástico.



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 5.1. Tratamientos de polietileno con el sistema lacasa-mediador.

Para oxidar al polietileno se realizaron experimentos en los cuales se empleó una lacasa proveniente del basidiomiceto *C. gallica* (UAMH 8260), en pruebas preliminares se empleó la enzima en un amortiguador de succinatos 60mM, pH= 4.5 y en cantidades relativamente elevadas, considerando que es un catalizador biológico (30 U/mL, equivalentes a 61µg/mL). En estos experimentos (no mostrados en este trabajo), no se logró detectar algún cambio que nos indicara que el polietileno estuviera siendo oxidado por la lacasa (disminución de la hidrofobia, nuevos grupos funcionales, disminución de las propiedades mecánicas). Una posible razón por la cual la enzima por sí sola no pudo oxidar al polietileno es el gran tamaño de ésta, entonces se decidió emplear otro tipo de sistema de oxidación que no involucrara la interacción directa de la enzima con el sustrato.

#### 5.1.1. Medición de la hidrofobia de la superficie del polietileno tratado enzimáticamente.

Una de las ventajas de utilizar la lacasa es que cuando hay reacciones en las cuales la enzima lacasa no cataliza por sí sola la oxidación de algún compuesto, es posible incrementar su capacidad oxidativa con el empleo de moléculas que cumplan el papel de acarreadores de electrones y los cuales son capaces de oxidar moléculas que no son sustrato de la enzima a través de un mecanismo no enzimático<sup>39</sup>. A tales moléculas se les conoce como mediadores, en este trabajo como ya se mencionó en la parte de métodos, se emplearon dos mediadores comúnmente utilizados en la literatura: Hidroxibenzotriazol (HBT) y ABTS<sup>39,43,46-49,63-65</sup>, y otro que en principio no funciona como mediador, el fenol.

El ángulo de contacto es una propiedad superficial de los sólidos que cuantifica su hidrofobia y es un parámetro importante para analizar la interacción entre dos fases: una sólida y otra líquida<sup>66</sup>. De acuerdo a la literatura, al observar el ángulo de contacto formado por un líquido sobre un sólido se puede obtener información de las propiedades energéticas de los primeros 5 Å de un material<sup>67</sup>, en este caso, el polietileno. En el experimento realizado en este trabajo se compararon películas de polietileno sin tratamiento, contra películas tratadas mediante el sistema lacasa-mediador. En las superficies hidrófobas, como el caso del polietileno sin tratamiento, se midieron ángulos por arriba de los 80° siendo el disolvente agua destilada; lo observado indica que el polietileno posee una superficie hidrófoba.

Por otro lado, la tensión de adhesión es un parámetro que sirve para caracterizar la afinidad de un líquido hacia una superficie sólida<sup>68</sup>. Este parámetro es la resultante de una suma vectorial de tensiones superficiales de las tres interfaces involucradas en el fenómeno del ángulo de contacto (sólido/ líquido, sólido/vapor y líquido/vapor), la cual, si es igual a cero, quiere decir que la gota mantendrá su forma esférica, en caso contrario, cuando la superficie es hidrófila, la tensión de adhesión disminuye y la gota pierde su forma dispersándose en el sólido<sup>59,69</sup>. Como un parámetro dependiente del ángulo de contacto, la tensión de adhesión cambiará con el valor de éste, con la diferencia que su valor se incrementará al disminuir el ángulo de contacto. Cuando el ángulo de contacto es muy elevado (>90°), los valores de tensión superficial tienden a cero, ya que  $\cos 90^\circ = 0$  y de acuerdo a la ecuación (2) de la sección 4.4.1:

$$\lim_{\theta \rightarrow 90^\circ} \gamma_{H_2O} \cdot \cos(\theta) = 0 \quad (7)$$

El incremento de la tensión de adhesión físicamente quiere decir que el líquido se vuelve muy afín a la superficie del material, y además, que el trabajo necesario para separar estas dos sustancias incrementará<sup>69</sup>. La tensión de adhesión es el producto de la tensión superficial del agua ( $\gamma$ ), que es una constante, multiplicada por la función coseno del ángulo de contacto ( $\theta$ ), debido a esta relación, ambos parámetros no cambiarán linealmente entre dos sistemas distintos. En otras palabras, la diferencia entre los ángulos de contacto medidos en dos sistemas distintos no será igual que la diferencia entre las tensiones de adhesión de los mismos sistemas ya que la función coseno provocará que un cambio pequeño en el ángulo de contacto sea un cambio grande en tensión de adhesión<sup>70</sup>. Por lo tanto se compararon los sistemas de manera independiente, únicamente a través de ángulo de contacto o a través de tensión de adhesión.

**Tabla 5.1.** Ángulos de contacto y tensión de adhesión en PEBD tratado con HBT y lacasa.

Concentración de HBT		Ángulo de contacto (°) $\theta$	Tensión de adhesión (dyn/cm) $\tau$
0 mM	Control	86.13 ± 3.42	4.91 ± 4.32
	Lacasa	82.84 ± 5.79	9.03 ± 7.28
0.1 mM	Control	83.57 ± 3.19	8.14 ± 4.02
	Lacasa	81.83 ± 7.64	10.24 ± 9.52
1.0 mM	Control	81.55 ± 4.72	10.66 ± 5.87

	Lacasa	68.30 ± 4.88	26.83 ± 5.72
10.0 mM	Control	82.75 ± 4.72	9.16 ± 5.93
	Lacasa	69.59 ± 5.16	25.28 ± 6.0

En la tabla 5.1 se muestran los datos obtenidos para las muestras tratadas con el sistema lacasa-HBT, en donde durante un periodo de 24h se incubaron las películas de polietileno en amortiguador de succinatos 60mM y pH=4.5 con 1.2 U/mL de lacasa y tres concentraciones diferentes del mediador HBT.

Lo esperado era que únicamente en aquellos sistemas en donde hubiera lacasa y HBT se observaran cambios, pero para confirmar que dichos cambios fueran provocados por la reacción de lacasa + mediador se tuvieron que realizar diversos controles. Por ejemplo, en ausencia del mediador (0mM) el ángulo medido ( $\theta \geq 80^\circ$ ) indica una superficie hidrófoba<sup>69</sup> y es estadísticamente similar al sistema con lacasa (1.2 U/mL) (comprobado a través de una prueba t de Student con un  $\alpha$  de 0.05). Por otro lado se observó que el mediador por sí sólo (en los controles) no fue capaz de generar un cambio en el ángulo de contacto en ninguna de las tres concentraciones de HBT empleadas (0.1, 1.0 y 10 mM).

Como era de esperarse solamente en los sistemas en donde el mediador y la lacasa estuvieron presentes se pudieron detectar cambios en las películas de polietileno, sin embargo, no fue así para todas las concentraciones de HBT empleadas. Sólo en los sistemas lac\_HBT 1 mM y lac\_HBT 10mM fue posible generar cambios en la superficie del sustrato y se encontró que el ángulo de contacto disminuyó, en ambos casos, 16% aproximadamente (ver tabla 5.1). El valor del ángulo de contacto para estos dos sistemas se evaluó a través de una prueba t de student (con un  $\alpha$  de 0.05) y se determinó que los valores son estadísticamente similares, esto sugiere que el HBT, como mediador, tiene un efecto máximo en términos de cambios en la hidrofobia de la superficie del polietileno.

En el caso de la tensión de adhesión, los tratamientos control, en los cuales el HBT estuvo ausente (primeras filas tabla 5.1), tuvieron un valor de  $\tau$  entre 5 y 9 dyn/cm, en otras palabras, la superficie no tuvo afinidad por el agua o ésta es muy baja. Los tratamientos que lograron un aumento en la tensión de adhesión fueron lac\_HBT 1mM ( $\tau=26.8$  dyn/cm) y lac\_HBT 10mM ( $\tau=25.2$  dyn/cm), en los cuales se logró incrementar la afinidad de la superficie por el agua casi tres veces más que en el control ( $\tau=9$  dyn/cm). En cuanto al sistema con 0.1mM de HBT, se encontró que la tensión de adhesión ( $\tau=10.2$  dyn/cm) es muy similar a la de su control lo cual confirma que en este sistema no hubo ningún cambio, como se observó a través del ángulo de contacto.

**Tabla 5.2.** Ángulos de contacto y tensión de adhesión en PEBD tratado con fenol y lacasa.

Concentración de Fenol		Ángulo de contacto ( $^{\circ}$ ) $\theta$	Tensión de adhesión (dyn/cm) $\tau$
0 mM	Control	86.12 $\pm$ 3.42	4.91 $\pm$ 4.32
	Lacasa	82.84 $\pm$ 5.79	9.03 $\pm$ 7.28
0.1 mM	Control	80.48 $\pm$ 5.44	11.99 $\pm$ 6.82
	Lacasa	70.66 $\pm$ 9.89	23.74 $\pm$ 11.55
1.0 mM	Control	78.83 $\pm$ 3.96	14.07 $\pm$ 4.91
	Lacasa	65.33 $\pm$ 6.84	30.18 $\pm$ 7.88
10.0 mM	Control	79.47 $\pm$ 2.40	13.30 $\pm$ 3.01
	Lacasa	77.82 $\pm$ 3.02	15.34 $\pm$ 3.76

Posteriormente se evaluó el fenol como mediador. De acuerdo a las características que debe de tener un mediador<sup>39</sup> el fenol resulta ser una molécula que una vez oxidada no realiza el ciclo completo de transferencia de electrones entre la enzima y el sustrato principal (polietileno en este caso). El radical libre formado sobre el fenol es altamente reactivo y capaz de reaccionar con otros radicales o moléculas de fenol para formar polímeros. Sin embargo, su alto potencial redox (1.03 V)<sup>46</sup> lo hizo interesante para nuestro estudio. Para este mediador los resultados se muestran en la tabla 5.2. En los controles de las tres concentraciones de fenol ensayadas (0.1, 1 y 10 mM) se observó una disminución de un 8% aproximadamente en el valor del ángulo de contacto ( $\theta$ ). Al analizar estos datos estadísticamente, se encontró que las diferencias no fueron estadísticamente significativas (comprobado por t de Student, con un  $\alpha=0.05$ ); el error experimental se encuentra en un intervalo aceptable, de 10% o menos. Por tanto, se encontró que a través de la técnica del ángulo de contacto, el fenol por sí sólo puede disminuir la hidrofobia del polietileno. Y que esta disminución es la misma sin importar la concentración en la que se utilizó el fenol. Posiblemente esto se deba a que haya un poco de fenol formando radicales libres y éstos oxiden al polietileno. Pero a ciencia cierta no se supo con claridad el motivo de dicho efecto.

En presencia de fenol y lacasa, la hidrofobia en las películas de polietileno disminuyó aún más. En el sistema lacasa\_fenol 0.1mM el ángulo de contacto disminuyó 14% con respecto a su control; y 24% en el sistema lacasa\_Fenol 1mM. Para este último sistema, se comprobó que la diferencia entre control y tratamiento fue significativa y que el efecto que produce el fenol fue mayor en presencia de la enzima que cuando ésta no esta presente en el sistema. Sin embargo, no fue posible distinguir un efecto claro como consecuencia de la actividad enzimática en el caso del fenol a una concentración de 10mM ya que el valor de  $\theta$  calculado para el control y el tratamiento con enzima tienen valores estadísticamente son muy similares.

Los cambios en la tensión de adhesión entre una muestra y otra ayudaron a establecer mejor

las diferencias que el fenol produjo sobre el polietileno en los sistemas ensayados. En otras palabras, las muestras que mostraron ser menos hidrófobas a través de ángulo de contacto confirmaron su afinidad por el agua a través de la tensión de adhesión, como en el caso de los controles (0.1, 1 y 10 mM) los cuales clara mente triplicaron su afinidad por el agua comparada con la del polietileno incubado en buffer (ver tabla 5.2). En cuanto a los sistemas con fenol y lacasa, específicamente en concentraciones de fenol de 0.1 y 1mM, se pudo observar que la afinidad por el agua en presencia de la enzima incrementó al doble, con respecto a los controles.

Cuando el ABTS fue utilizado como mediador se encontró que entre tratamientos y los controles, los valores de  $\theta$  y  $\tau$ , no tienen diferencias estadísticamente significativas (ver tabla 5.3). Sin embargo, más adelante se confirmó a través de otras técnicas, como el FTIR-ATR (espectroscopía infrarroja), que el ABTS es un mediador que sí pudo oxidar al polietileno aunque no fue tan activo para la oxidación superficial del polietileno como el HBT (ver tabla 5.1).

El ABTS al igual que el fenol, fue capaz de reducir el ángulo de contacto cuando la enzima está ausente (muestras control), una posible explicación a este fenómeno es que por experiencia previa, y por reportes de la literatura<sup>71,72</sup> se sabe que el ABTS es poco estable en condiciones ambientales y es capaz de oxidarse sin necesidad de algún catalizador. Pero a diferencia del fenol en donde la enzima ayudó a que el ángulo de contacto disminuyera aún más, en estos sistemas no fue el caso. Lo cuál no quiere decir que no hubiera oxidación, sino que el efecto final del ABTS sobre el polietileno no pudo ser detectado por la técnica del ángulo de contacto, ya que como se dijo anteriormente, el ángulo de contacto permite el estudio de los primeros 5 Å de espesor del material<sup>67</sup> mientras que el infrarrojo permite explorar de 2 a 5 µm de profundidad (de acuerdo a las especificaciones del equipo).

**Tabla 5.3.** Ángulos de contacto y tensión de adhesión en PEBD tratado con ABTS y lacasa.

Concentración de ABTS		Ángulo de contacto ( $^{\circ}$ ) $\theta$	Tensión de adhesión (dyn/cm) $\tau$
0 mM	Control	86.12 ± 3.42	4.91 ± 4.32
	Lacasa	82.84 ± 5.79	9.03 ± 7.28
0.1 mM	Control	79.84 ± 3.90	12.81 ± 4.84
	Lacasa	78.46 ± 2.88	14.55 ± 3.58
1.0 mM	Control	78.77 ± 2.50	14.17 ± 3.12
	Lacasa	72.32 ± 4.87	22.03 ± 5.87
10.0 mM	Control	81.12 ± 2.04	11.23 ± 2.56
	Lacasa	78.04 ± 2.97	15.07 ± 3.69

En otros trabajos, como el de Abrusci y colaboradores<sup>30</sup>, a través de un tratamiento oxidativo

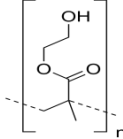
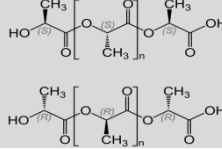
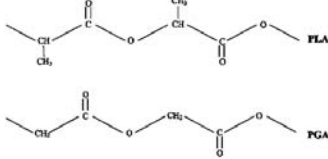
con estearatos de hierro y calcio se puede incrementar el valor de  $\tau$  en membranas de polietileno de 0 a 0.1 dyn/cm en un periodo de 90 días empleando radiación UV-Vis como factor abiótico. Estos valores bajos de la tensión de adhesión se deben a que en sus muestras control se tiene un ángulo de contacto  $\theta > 95^\circ$ , a diferencia de este trabajo, en donde los controles si tuvieron cierta afinidad al agua ( $90^\circ > \theta > 80^\circ$ ), lo que indicó que a pesar de utilizar polietileno en ambos trabajos, el origen de fabricación del material pudiera influir en el grado de cristalinidad o en la pureza del plástico, siendo el polímero de este trabajo, una muestra que es capaz de permear cierta cantidad de agua que otros tipos de polietileno no pueden<sup>73</sup>.

Estos cambios superficiales asociados a la oxidación de las películas pueden ser comparados a la de otros plásticos reportados en la literatura. En la tabla 5.4 se muestran los valores de los ángulos de contacto de agua con algunos otros polímeros hidrófilos y considerados como biodegradables. El poli-2-hidroximetilmetacrilato es un polímero utilizado en aplicaciones médicas y es un material biocompatible. El ácido poliláctico y sus copolímeros con ácido poliglicólico son utilizados para la encapsulación y liberación de medicamentos<sup>74</sup>, pero también puede ser empleado para la fabricación de envases tipo PET. Las características químicas de estos materiales los hacen muy afines al agua ya que como se observa en la tabla 5.4 tienen enlaces con oxígeno del tipo éter, carbonilo e hidroxilo, los cuales son enlaces polares que pueden interactuar con moléculas de agua resultando en superficies altamente hidrófilas, Debido a la naturaleza polar de los tipos de enlaces que poseen, hace que los valores de los ángulos de contacto estén por debajo de los  $80^\circ$ , mientras que nuestros resultados arrojaron que el tratamiento enzimático disminuyó el valor de ángulo de contacto en la superficie del polietileno de  $90^\circ$  a  $65^\circ$  aproximadamente, el cual es un valor mayor que el ángulo de contacto del PHEMA ( $43.5^\circ$ ) y que el PLA/PGA ( $54.1^\circ$ ) pero es menor que el PLA solo ( $71.5^\circ$ ).

El mediador que redujo más la hidrofobia fue el HBT, la acción oxidante de este mediador se demostró claramente cuando la enzima estuvo presente a diferencia del fenol y el ABTS, los cuales fueron mediadores que posiblemente debido a su inestabilidad en solución reaccionaron con el plástico y tratamientos donde no hubo enzima se midieron ángulos de contacto menores a los de las películas que únicamente fueron sumergidas en solución. Por último, para confirmar que los cambios en la hidrofobia se debieron a la oxidación del polietileno a causa del sistema lacasa-mediador, fue necesario emplear otra técnica que permitiera analizar la naturaleza química del polietileno, tal fue el caso de la espectroscopía infrarroja (FTIR-ATR).

**Tabla 5.4.** Ángulos de contacto y estructuras químicas de algunos polímeros biodegradables.

Ref.	Polímero	Angulo de contacto ( $^\circ$ ) $\theta$
------	----------	---

75	Poli-2-hidroxietilmetacrilato PHEMA		43.5
75	Poli(L- ácido láctico) PLA		71.5
74	poli-acido láctico/poli-acido glicólico 50:50 PLA/PGA		54.1

### 5.1.2. Detección de nuevos grupos funcionales a través de FTIR.

Se ha observado que a través de tratamientos oxidativos en el polietileno aparecen nuevos grupos funcionales dentro de su estructura molecular y estos cambios pueden ser estudiados a través de técnicas espectroscópicas como el infrarrojo<sup>2,15,29,31,76,77</sup>. En este trabajo se esperaba que el tratamiento enzimático oxidara al polietileno y que esta oxidación se pudiera monitorear mediante espectroscopía infrarroja como bandas de modos vibracionales distintas a las del polietileno original. Este estudio nos permitió conocer zonas del polietileno que el ángulo de contacto no permitió explorar, de acuerdo con las especificaciones del equipo utilizado, el aditamento de reflectancia (ATR) permite un estudio que abarca entre los 2 y 5  $\mu\text{m}$  de profundidad del analito, entonces fue esperado que el análisis por FTIR-ATR revelara fenómenos que por ángulo de contacto no pudieron encontrarse.

El polietileno tiene tres modos vibracionales característicos del enlace covalente simple entre el carbono y el hidrógeno los cuales se encuentran en las siguientes longitudes de onda<sup>78</sup>:

- $\lambda = 3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ : Vibraciones simétricas y asimétricas de tensión dentro del plano.
- $\lambda = 1462\text{ cm}^{-1}$ : Vibraciones de deformación angular dentro del plano.
- $\lambda = 720\text{ cm}^{-1}$ : Vibraciones de balanceo fuera del plano.

De acuerdo a lo reportado en la literatura, cuando hay un tratamiento oxidativo en polietileno

se esperan nuevas bandas, sobretodo en la zona comprendida entre 1740-1650  $\text{cm}^{-1}$ , la cual corresponde a las vibraciones del enlace carbonilo (C=O). En la figura 5.1 se muestra el espectro característico del polietileno (PE) junto con las principales zonas en donde se esperarían las nuevas bandas producto de un tratamiento oxidativo y el tipo de vibraciones correspondientes a esas longitudes de onda.

Antes de realizar los tratamientos enzimáticos, se corrieron pruebas control para descartar que las películas de polietileno fueran adsorbentes de proteína, medir su susceptibilidad a la oxidación por un agente químico y evaluar la capacidad de la lacasa como oxidante. Primero, se incubó el polietileno en presencia de albúmina de suero bovino. En caso de que existiera una afinidad del polietileno por proteínas, se esperarían bandas principalmente en las zonas del enlace amida (1630 y 825  $\text{cm}^{-1}$ )<sup>31</sup> y como se puede observar en el espectro de infrarrojo (color verde) de la figura 5.2, no se detectaron bandas diferentes a las típicas de la membrana de polietileno (gráfica color negro).

Cuando se observaron las muestras tratadas con 30 U/ml de lacasa durante 24 horas de incubación en solución amortiguadora de succiantos, no fue posible observar nuevos modos vibracionales en las películas de polietileno. Las lacasas en solución tienen un potencial redox no superior a los 0.8 V<sup>47,48</sup>, este potencial redox relativamente bajo de la enzima y la dificultad del sustrato para acceder al sitio activo, hacen que la lacasa por sí sola no haya logrado oxidar al polietileno (ver espectro de infrarrojo color azul en la Figura 5.2).

Por último, con el empleo de un oxidante químico como el ácido nítrico como control positivo se observaron cambios en la película de polietileno (ver figura 5.2). El ácido nítrico tiene un potencial redox de 0.94 V cuando se reduce a  $\text{NO}_2^-$ . En el espectro de infrarrojo color rojo de la figura 5.2 se observaron dos nuevas bandas a 1630 y 1550  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a grupos carbonilos de amida y a grupos  $\text{NO}_2$  respectivamente<sup>31,78</sup>. En este tratamiento oxidativo con ácido nítrico se determinó el índice de carbonilo ( $I_{\text{CO}}$ ) el cual es un parámetro que nos indicó de manera semicuantitativa el grado de oxidación del material; el índice de carbonilo se calculó como la relación entre la absorbancia de la banda de carbonilos (>C=O) entre 1750 y 1620  $\text{cm}^{-1}$  y la absorbancia en la banda de 1462 $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a los grupos metilenos del plástico (-  $\text{CH}_2$  -). La magnitud de esta relación fue de 0.27 aproximadamente, valor muy similar al reportado por Abrusci y colaboradores<sup>30</sup> en donde se obtuvo un  $I_{\text{CO}} = 0.44$  en PE fotooxidado y utilizando iones metálicos como catalizadores. De manera similar, en el trabajo de Rajandras y colaboradores<sup>31</sup> se encontraron bandas en 1630 y 830  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a la formación de amidas producto de la reacción de oxidación con ácido nítrico. De esta forma quedó comprobado que sí fue posible la oxidación y determinación de una magnitud semicuantitativa que permitió evidenciar un proceso oxidativo.



Debido a que el polietileno es un sustrato muy hidrófobo y recalcitrante, el cual es difícilmente oxidado por alguna sustancia química como el ácido nítrico o la lacasa, se decidió utilizar el sistema de mediadores: lacasa\_HBT, lacasa\_fenol y lacasa\_ABTS a tres concentraciones distintas: 0.1, 1 y 10mM; y estudiar los cambios provocados por estos mediadores a nivel de grupos funcionales, ya que en la sección anterior se demostró que hay sistemas como lacasa\_HBT 10mM y lacasa\_fenol 1mM que pueden disminuir la hidrofobia superficial del polietileno.

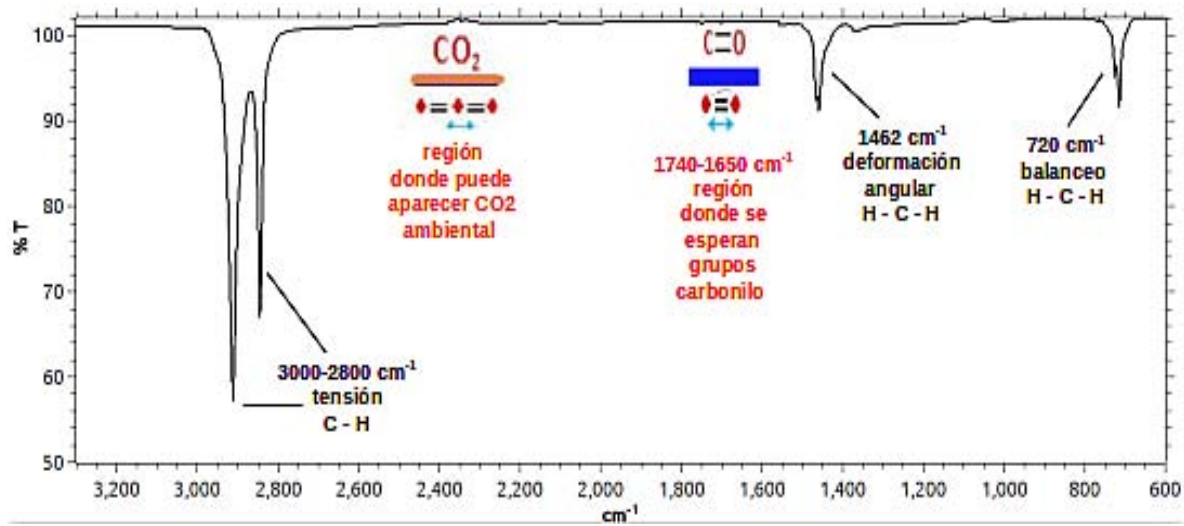


Figura 5.1. Espectro de infrarrojo de polietileno (negro) y las zonas principales en donde se esperarían la aparición de nuevos modos vibracionales debido a la oxidación tratamiento enzimático.

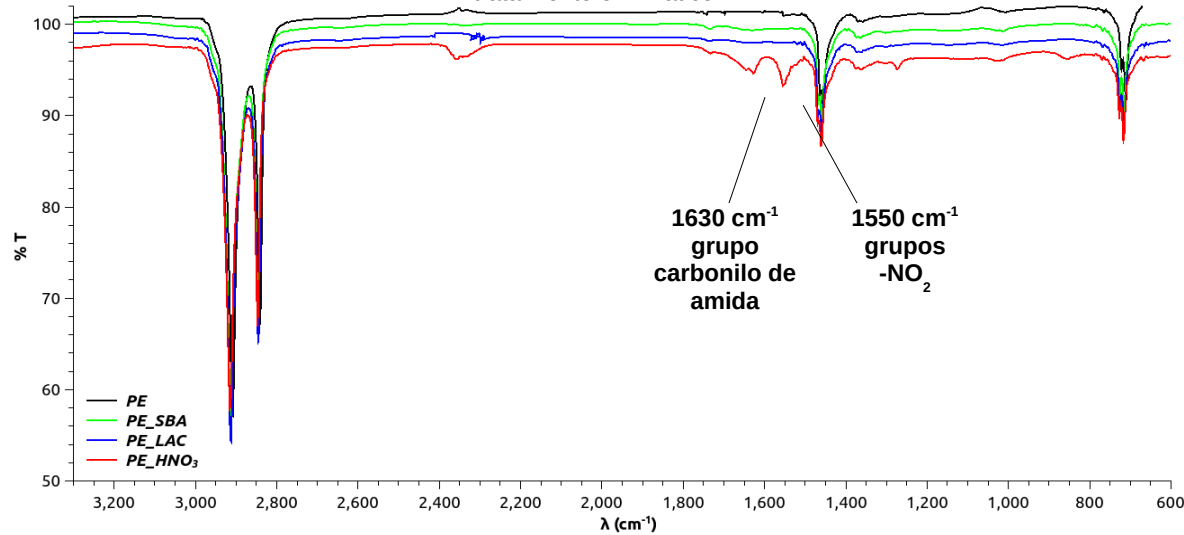


Figura 5.2. FTIR de la reacción de polietileno con diversos reactivos. Polietileno original (negro); Polietileno incubado con albúmina de suero bovino SBA (verde); Polietileno incubado con lacasa (azul), Polietileno incubado en ácido nítrico al 65 % (rojo).

En el sistema lacasa\_HBT se pudo detectar una nueva banda a  $1720\text{ cm}^{-1}$ , la cual incrementó su intensidad al aumentar la concentración del mediador (figura 5.3), a su vez, esto contrastó con lo observado mediante el ángulo de contacto, donde se observó que no había diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con HBT 1 y 10mM. En éste último caso, se observó un cambio completo en las bandas en la zona comprendida entre  $1400 - 700\text{ cm}^{-1}$  (FTIR azul de la figura 5.3), cuya identidad fue desconocida pero que pudieran ser atribuidas a la formación de aductos con el mediador o interacciones débiles entre el mediador y el sustrato.

El siguiente mediador empleado fue el fenol, cuyos resultados se muestran en la figura 5.4. A diferencia del HBT, los nuevos modos vibracionales son más intensos e incrementaron sólo ligeramente su intensidad en proporción a la concentración de fenol utilizada. El alto potencial redox del fenol sugeriría una alta capacidad oxidativa y por consiguiente, concordaría con la gran intensidad de las bandas observadas en estos sistemas. La banda con mayor intensidad vuelve a ser aquella que aparece a una longitud de onda de  $1720\text{ cm}^{-1}$  pero también existe otra banda a una longitud de onda de  $1560\text{ cm}^{-1}$ , la cual corresponde a una banda del enlace C-O de un éter del tipo aromático<sup>78</sup>, cuyo origen pudiera ser la formación de un aducto covalente entre el radical fenólico y un carbono del polietileno. De hecho, esta hipótesis se vio reforzada por el aspecto de las membranas tratadas con fenol y lacasa, las cuales a pesar del lavado con etanol y agua destilada conservaron un ligero color café, producto quizá de la presencia de grupos fenólicos en la superficie del plástico (figura 5.5). La interacción polietileno/fenol se encontró presente tanto en los controles con fenol como en los tratamientos con lacasa y fenol, de esta forma se explicaría que por ángulo de contacto, controles y tratamientos tuvieron valores de  $\theta$  estadísticamente similares. Sin embargo, por FTIR-ATR se demostró que la lacasa y el mediador produjeran una oxidación importante en el polietileno.



**Figura 5.5.** Aspecto visual de las membranas de polietileno (PE) después del tratamiento con lacasa y fenol. (A) PE incubado en amortiguador de succinatos 60mM, pH=4.5. (B) PE incubado con lacasa y 1 mM de fenol en amortiguador de succinatos 60mM, pH=4.5.

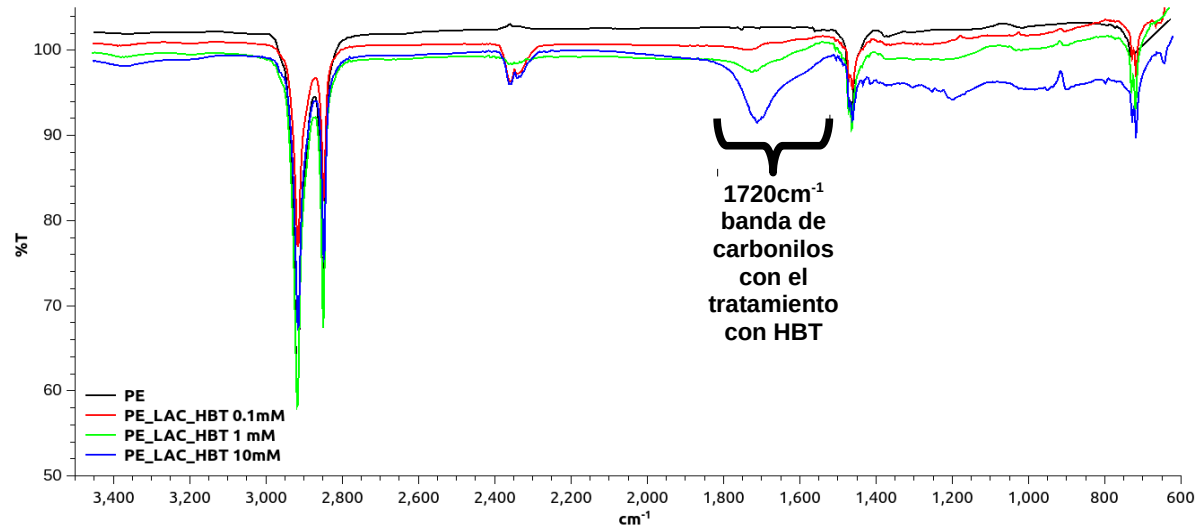


Figura 5.3 FTIR del polietileno tratado con el sistema lacasa y HBT. Polietileno original (negro), polietileno tratado con lacasa y HBT 0.1mM (rojo), lacasa y HBT 1mM (verde), lacasa y HBT 10mM (azul).

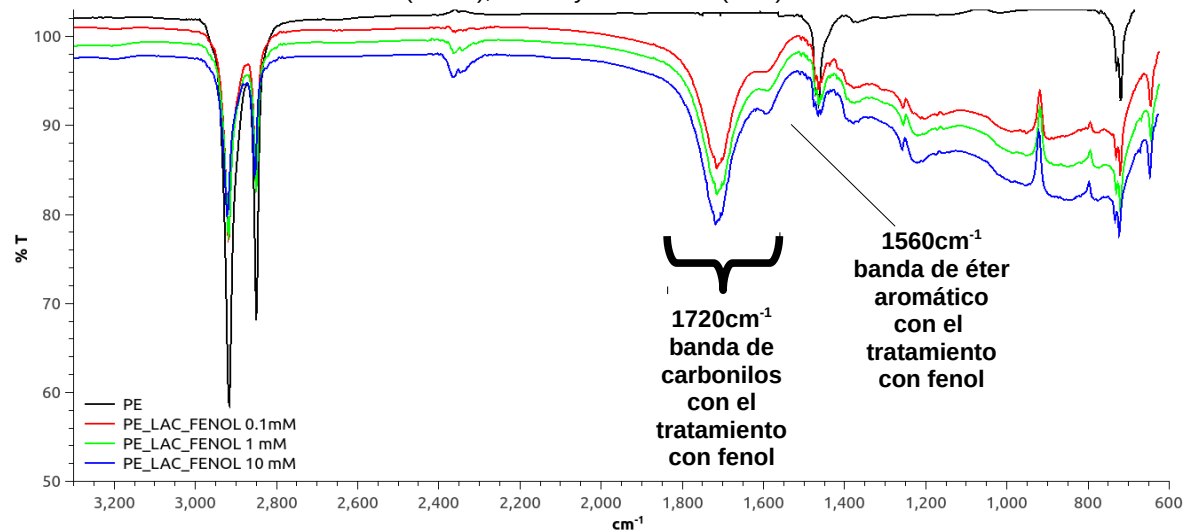


Figura 5.4. FTIR del polietileno tratado con el sistema lacasa y fenol. Polietileno original (negro), polietileno tratado con lacasa y fenol 0.1mM (rojo), lacasa y fenol 1mM (verde), lacasa y fenol 10mM (azul).

Cuando se evaluó el ABTS como mediador a través de FTIR, sí se encontró evidencia de que el sistema enzimático, en las tres concentraciones utilizadas, oxidó al polietileno (a diferencia de lo observado a través del ángulo de contacto). En la figura 5.6 se muestran los espectros de infrarrojo del polietileno original y los tratados con el mediador ABTS. La intensidad de las bandas de los nuevos modos vibracionales, sobretodo la señal de carbonilos que aparece en  $1720\text{cm}^{-1}$ , fue aumentando al incrementar la concentración del mediador, al igual que con el HBT. También fue posible observar una banda pequeña pero bastante clara a  $1642\text{cm}^{-1}$ , la cual puede corresponder a otro tipo de grupo funcional del tipo carbonilo, como lo puede ser un aldehído<sup>78</sup>, que pudiera originarse si el ABTS oxidara en un extremo de la cadena de polietileno.

En el sistema lacasa\_ABTS 10mM en la región de  $1200$  a  $900\text{cm}^{-1}$  se pueden observar bandas nuevas que no aparecen claramente en los otros sistemas con concentraciones de ABTS más bajas. Estas bandas, junto con la de  $1642\text{cm}^{-1}$  pueden ser indicadores de que los mediadores tienen diferentes mecanismos de acción al oxidar al polietileno y que se pueden obtener distintos productos dependiendo del mediador.

En la figura 5.7 se muestran los espectros de infrarrojo de sistemas control, en donde las películas de polietileno fueron incubadas con los tres mediadores utilizados en solución amortiguadora de succinatos pero en ausencia de la enzima. Se pudo observar que en algunos casos, como con fenol, existe la presencia de modos vibracionales ajenos a los del polietileno, los cuales aparecieron en los plásticos incubados con este mediador a pesar que no hubo una reacción de oxidación como la detectada a través de las bandas que aparecen en  $1645$  y  $1740\text{cm}^{-1}$ . Estas bandas nuevas pudieran corresponder a vibraciones de enlaces de carbonos aromáticos mono sustituidos<sup>78</sup> y la pequeña que aparece a los  $3400\text{cm}^{-1}$  podría corresponder a la vibración del enlace -O-H de alcoholes aromáticos. Estas evidencias, en conjunto con la disminución del ángulo de contacto en las muestras control con fenol, demuestran que el polietileno sí tiene cierta afinidad no covalente por este mediador aunque no exista una reacción entre estos dos compuestos.

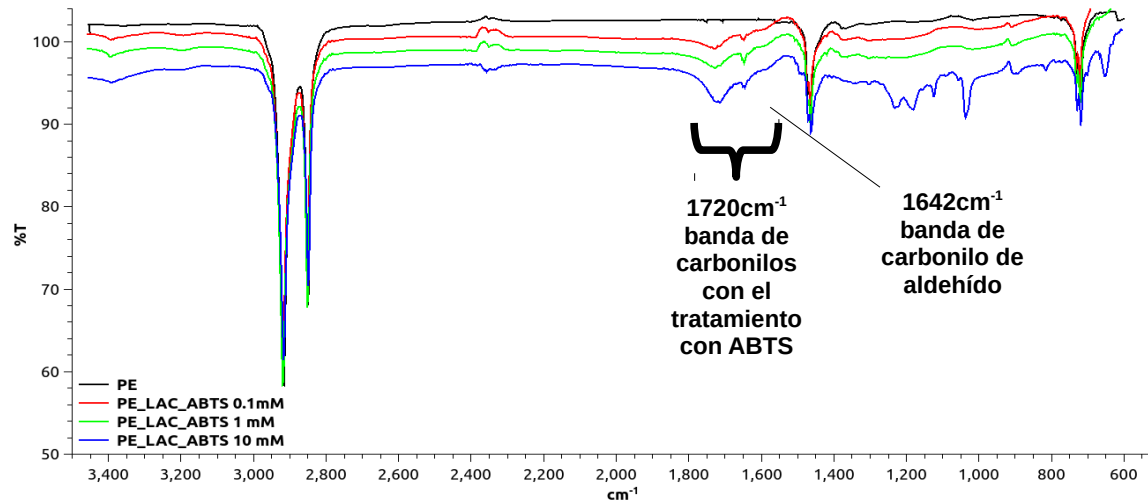


Figura 5.6. FTIR del polietileno tratado con el sistema lacasa y ABTS. Polietileno original (negro), lacasa y ABTS 0.1mM (rojo), lacasa y ABTS 1mM (verde), lacasa y ABTS 10mM (azul).

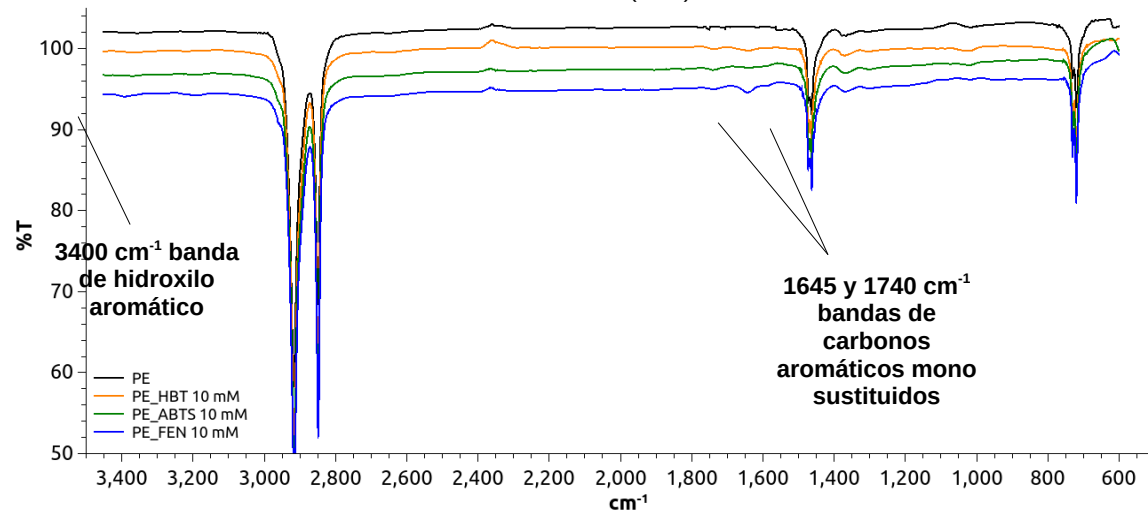


Figura 5.7. FTIR de los tratamientos control del polietileno con los mediadores en ausencia de lacasa. Polietileno original (negro) Polietileno y HBT 10mM (naranja), Polietileno y ABTS 10mM (verde) y Polietileno y fenol 10mM (azul).

En la tabla 5.5 se presentan los resultados de los índices de carbonilo ( $I_{CO}$ ) de cada uno de los sistemas evaluados a través de FTIR. El  $I_{CO}$ , como se mencionó previamente, es una medida semi cuantitativa del grado de oxidación de la película de polietileno ya que representa la relación que existe entre grupos carbonilos y grupos metilenos (ver sección 4.4.2).

Con ácido nítrico se obtuvo valor muy similar al reportado por Abrusci y colaboradores<sup>30</sup> en donde se obtuvo un  $I_{CO}$  en PE foto oxidado y catalizado con iones metálicos de alrededor de 0.44. A diferencia de este trabajo, en el tratamiento con  $HNO_3$  apareció un modo vibracional en una longitud de onda diferente ( $1650\text{cm}^{-1}$  vs.  $1720\text{cm}^{-1}$  respectivamente), sin embargo, de acuerdo a la literatura, en esta región de longitudes de onda es posible encontrar bandas correspondientes a modos vibraciones correspondientes a enlaces del tipo carbonilo ( $>C=O$ ). Aunque el grupo funcional al que pertenezcan si impactará en las longitudes de onda<sup>79</sup>, por ejemplo, una banda de carbonilo de cetona aparecerá predominantemente a  $\lambda = 1720\text{ cm}^{-1}$  mientras que una amida ( $N-C=O-$ ) aparecerá a longitudes de onda menores<sup>38,79</sup>, lo cual indica que los mecanismos de oxidación y el tipo de productos formados sí dependen del tipo de oxidante que se utilice.

**Tabla 5.5.** Valores del índice de carbonilo  $I_{CO}$  determinados por FTIR-ATR. Sistema lacasa-mediador.

PE	A ( $\lambda=1462\text{cm}^{-1}$ )	A ( $\lambda=1740-1650\text{ cm}^{-1}$ )	$I_{CO}$	Aumento
Original	0.04	0.00	0.04	-
$HNO_3$	0.05	0.02	0.42	9.63
HBT 0.1Mm	0.02	0.00	0.01	0.26
HBT 1mM	0.04	0.01	0.29	6.51
HBT 10mM	0.04	0.04	1.03	23.39
ABTS 0.1mM	0.03	0.01	0.17	3.77
ABTS 1mM	0.04	0.02	0.41	9.46
ABTS 10mM	0.05	0.03	0.70	16.08
Fenol 0.1mM	0.03	0.06	2.39	54.58
Fenol 1mM	0.03	0.07	2.21	50.39
Fenol 10mM	0.04	0.08	2.29	52.25

<sup>a</sup> con respecto al PE original.

Al comparar los valores obtenidos de  $I_{CO}$  con los descritos en la literatura, únicamente los trabajos en donde se utilizan catalizadores metálicos son aquellos que reportan valores para este parámetro, siendo los más representativos los trabajos de Abrusci et al. (2011)<sup>30</sup>, Abrusci et al. (2013)<sup>25</sup>, Corti et al. (2010)<sup>33</sup> y Husarova et al. (2010)<sup>34</sup>. En estos trabajos se utilizan como principales catalizadores iones manganeso<sup>30,34</sup>, hierro<sup>25,30,34</sup> y cobalto<sup>34</sup>; como factor abiótico se utilizaron radiación

solar, radiación artificial o temperaturas mayores a los 60°C (ver tabla 5.6). El índice de carbonilo más significativo que se alcanzó fue superior a 1.2 y se produjo empleando temperatura como factor abiótico (70°C, por 30 días) y como catalizadores iones Fe<sup>2+</sup> y Mn<sup>2+</sup> mientras que la radiación solar, el otro factor abiótico evaluado, produjo un valor de I<sub>CO</sub> entre 0.05 y 0.5<sup>25,30,33</sup>. Tales diferencias entre los resultados obtenidos mediante un factor abiótico y otro dependen del mecanismo de activación de los catalizadores y no por la diferencia entre la cantidad de energía que se puede suministrar mediante fotones y aquella mediante calor. El ión hierro (Fe<sup>2+</sup>) empleado en tratamientos de foto y termo oxidación es capaz únicamente de iniciar la catálisis en presencia de fotones y no así cuando se suministra calor, inclusive incrementando la temperatura hasta 70°C<sup>27</sup>.

**Tabla 5.6.** Índices de carbonilo de polietileno tratado con distintos catalizadores metálicos.

Referencia	Catalizador	Factor abiótico	ICO
30	Fe	Luz UV/Vis ( $\lambda=300-800\text{nm}$ )	0.47
33	NR	Radiación solar y temperatura (65°C)	3.6
34	Mn/Fe	Temperatura (70°C)	1.3
25	Fe, Co	Luz UV/Vis ( $\lambda=300-800\text{nm}$ )	0.4

NR: No reportado.

### 5.2.3. Determinación de las propiedades mecánicas del polietileno.

Las propiedades mecánicas de los plásticos pueden cambiar mucho cuando se incorporan ciertos aditivos a la fórmula. En nuestro caso, se esperaba que la oxidación producida por las enzimas y los mediadores generara materiales que presenten una menor resistencia a la deformación o cuya fragilidad incrementara de acuerdo a lo que se ha reportado en trabajos en los que el polietileno es oxidado<sup>28,36,37</sup>.

En un primer experimento se evaluó la diferencia entre las propiedades mecánicas de las películas de polietileno secas y aquellas que fueron sumergidas durante 24h en solución amortiguadora de succinatos (60mM, pH= 4.5). Para el caso del polietileno seco, la elongación máxima que se alcanzó antes del punto de quiebra fue de **819 ± 17mm** y para el polietileno sumergido fue de **825.6 ± 87.6mm**. A través de un análisis estadístico de t de Student ( $\alpha=0.05$ ) se determinó que sí hay diferencia significativa entre los resultados obtenidos. Lo cual indica que al sumergir el polietileno por 24h en buffer succinatos se modifica el arreglo molecular de las cadenas del polímero y se produce un incremento en la elongación de la película por 7mm aproximadamente, lo que corresponde a casi un 1% del valor de la longitud máxima de 819mm. Aparentemente este valor no representa mucho tomando en cuenta la longitud total de la película, sin embargo, “el



ablandamiento” que se produjo con la hidratación fue más importante que el efecto producido por la enzima y los mediadores ya que en los sistemas enzimáticos ensayados, no se lograron detectar diferencias importantes más allá de lo logrado por la hidratación de las películas. En la tabla 5.7 se presentan los resultados obtenidos para el tratamiento de polietileno con lacasa y HBT.

**Tabla 5.7.** Resultados de las pruebas mecánicas realizadas al polietileno tratado con lacasa y HBT.

Concentración HBT		Elongación relativa* (%)	Resistencia a la tensión (MPa)
0.1 mM	Control	-0.6 ± 0.1	33.1 ± 1.2
	Lacasa	8.3 ± 0.9	31.1 ± 3.6
1.0 mM	Control	7.6 ± 0.8	31.0 ± 3.1
	Lacasa	7.7 ± 0.8	32.4 ± 1.6
10.0 mM	Control	11.3 ± 1.2	31.5 ± 0.8
	Lacasa	15.9 ± 1.9	28.8 ± 4.4

\*Valores relativos a 825.6 mm (PE sumergido en amortiguador de succinatos).

A través de un análisis estadístico mediante una prueba t de Student ( $\alpha=0.05$ ) se pudo comprobar que para el tratamiento lac\_HBT no hubo diferencias significativas en cuanto a la elongación relativa entre controles y tratamientos oxidativos, salvo en el caso de lacasa\_HBT 0.1mM en donde se puede observar una diferencia de 8 unidades porcentuales.

A diferencia de lo observado a través del ángulo de contacto y FTIR, en donde se comprobó que la película de polietileno se oxidó (cambió su hidrofobia y aparecieron grupos carbonilos). Los resultados de la tabla 5.7 sí muestran que la película de polietileno se vuelve menos elástica que la película de referencia (la que fue incubada únicamente en amortiguador)<sup>10,40,80</sup>. Pero el hecho que en presencia y en ausencia de lacasa las películas hayan mostrado la misma pérdida de elasticidad ponen en cuestión los resultados obtenidos.

Las propiedades mecánicas de un plástico dependen en conjunto del seno del polímero y de su superficie<sup>40</sup>. Por lo que la oxidación que se hizo mediante una solución de enzima y mediador solo incidió en la superficie de la película y no logró impactar en el seno del polímero. Lo más probable, es que al mantener a la película sumergida en solución amortiguadora durante 24h, ésta se hidratara y se modificara el arreglo molecular haciéndolo más susceptible a la deformación mecánica.

**Tabla 5.8.** Resultados de las pruebas mecánicas realizadas al polietileno tratado con lacasa y fenol.

Concentración fenol		Elongación relativa* (%)	Resistencia a la tensión (MPa)
0.1 mM	Control	-0.5 ± 0.1	32.9 ± 1.7
	Enzima	-5.4 ± 0.7	31.8 ± 2.4
1.0 mM	Control	-9.1 ± 1.2	31.4 ± 2.1
	Enzima	-12.1 ± 1.5	31.3 ± 2.9

10.0 mM	Control	-6.6 ± 0.7	30.1 ± 3.2
	Enzima	-2.4 ± 0.4	30.9 ± 1.6

\*Valores relativos a 825.6 mm (PE en amortiguador de succinatos).

En la tabla 5.8 se muestran los datos de las pruebas físicas realizadas a las muestras tratadas con lacasa y fenol. La primera observación que se hizo es que los tratamientos mostraron una mayor elongación que los 825.6mm correspondientes a la longitud máxima lograda por las membranas controles (ver la sección 4.4.3). Lo cuál representó un efecto completamente contradictorio con lo esperado (la oxidación disminuye la elasticidad).

Se debe recordar que los valores de elongación relativa representan que tan diferente es la película original (PE sumergido en solución amortiguadora) de los tratamientos. En este caso los datos de la tabla 5.8 indican que la película original es 5.4% menos elástica que el tratamiento con lacasa\_fenol 0.1mM (ver ecuación 8 como ejemplo).

$$E_R = \frac{825.6 \text{ mm} - 870.1 \text{ mm}}{825.6 \text{ mm}} \times 100 = -5.4 \% \quad (8)$$

El dato que más sobresalió fue el del tratamiento con 1mM el cual tuvo un incremento en la elongación relativa de 12.1% comparado con el polietileno original, sin embargo por una prueba estadística de t de student se comprobó que esta diferencia no es estadísticamente significativa con su respectivo control (-9.1%). Para el caso del fenol, al igual que el HBT no hubo diferencias significativas entre los tratamientos con lacasa y sus respectivos controles, al igual que la resistencia a la tensión de esta manera nuevamente, los datos obtenidos fueron puestos en cuestión y aún más tomando en cuenta que la tendencia a ser “más elásticos” fueron en contra de los resultados vistos por las pruebas de ángulo de contacto y FTIR, en donde claramente se demostró que el fenol fue el mediador más oxidante.

Finalmente, el ABTS fue similar y en ningún tratamiento fue posible detectar un cambio significativo en la elongación relativa y en la resistencia a la tensión (entre tratamientos vs controles). Los resultados para este tratamiento se muestran en la tabla 5.9. Como ya se mencionó anteriormente en esta sección, los resultados de las pruebas mecánicas no coorelacionaron con la oxidación que se demostró a través de otras pruebas, lo que significa que los tratamientos enzimáticos no están siendo lo suficientemente oxidativos para disminuir la capacidad de elongación de las películas de polietileno así como tampoco “ablandaron” a la película. La oxidación parece ser únicamente superficial.

**Tabla 5.9.** Resultados de las pruebas mecánicas realizadas al polietileno tratado con lacasa y ABTS.

Concentración ABTS		Elongación relativa* (%)	Resistencia a la tensión (MPa)
0.1 mM	Control	2.8 ± 0.3	32.9 ± 1.7
	Enzima	6.3 ± 0.7	32.6 ± 2.4
1.0 mM	Control	1.0 ± 0.1	29.5 ± 2.2
	Enzima	1.4 ± 0.1	32.7 ± 2.5
10.0 mM	Control	-0.4 ± 0.1	30.5 ± 3.1
	Enzima	-0.6 ± 0.1	31.4 ± 3.9

\*Valores relativos a 825.6 mm (PE en amortiguador de succinatos).

### 5.1.4. Cambio en entalpía y arreglo molecular.

A través de la calorimetría diferencial de barrido (DSC) se midió el flujo de calor que se le aplica a un material cuando este es expuesto a un perfil de temperatura controlado. La calorimetría provee información cualitativa y cuantitativa acerca de las transiciones por las que pasa el material cuando es calentado (por ejemplo: punto de transición vítrea, punto de fusión, cristalización y descomposición)<sup>3</sup>. Además de indicar las temperaturas a las que estos procesos ocurren, el DSC es capaz de proporcionar información de la cinética a la que ocurren los procesos<sup>81</sup>.

En el caso de tratamientos de catálisis oxidativa de polietileno se han medido parámetros como la temperatura de fusión ( $T_m$ ), la entalpía de fusión ( $\Delta H_m$ ) y el grado de cristalinidad de la muestra<sup>33</sup>. A través de estos parámetros se puede saber si la oxidación afectó el arreglo molecular del plástico o y si hay productos de menor peso molecular a causa de la oxidación<sup>23,82</sup>.

En este experimento se seleccionaron únicamente tres condiciones a evaluar basándonos en algunas de las pruebas anteriormente realizadas. Las condiciones seleccionadas fueron: lacasa-HBT 10mM, lacasa-fenol 1mM, lacasa-ABTS 0.1mM y se compararon contra el polietileno original (sin sumergirlo en solución amortiguadora). Los resultados de la calorimetría se muestran en la tabla 5.10.

**Tabla 5.10.** Caracterización calorimétrica del polietileno oxidadas con el sistema lacasa-mediador.

PE	$T_m$ (°C)	$\Delta H_m$ (J/g)	Cristalinidad (%)
Original	123.53	97.38	33
HBT 10mM	122.38	77.73	27
ABTS 0.1mM	122.17	78.58	27
Fenol 1mM	122.87	74.95	26

<sup>a</sup> con respecto al  $\Delta H_m$  del PE original.

La temperatura de fusión ( $T_m$ ) entre el polietileno original y los tratamientos enzimáticos fue muy similar (al rededor de los 122-123 °C), lo cual indicó que el tratamiento enzimático no produjo el efecto esperado. Si la enzima y el mediador hubieran oxidado al polietileno, se esperaría que el polietileno se fragmentara en cadenas de menor peso molecular y por consiguiente de menor punto de fusión<sup>82</sup>.

Sin embargo, la entalpía de fusión ( $\Delta H_m$ ), otro parámetro que se determinó mediante calorimetría, reveló que sí hay un cambio entre el polietileno original y las muestras, ya que como se ve en la tabla 5.10, en los tres sistemas de lacasa con mediador, la entalpía de fusión se redujo aproximadamente un 20% (en los tres casos). Esto significa que la estructura molecular del polietileno requirió menor cantidad de energía para pasar del estado sólido al estado líquido, o sea que disminuyeron las fuerzas intermoleculares entre las cadenas del polietileno, pero sin haber ruptura de las mismas (ya que el  $T_m$  no cambió). Estos resultados coorelacionaron con lo observado en las pruebas mecánicas, en donde las películas de polietileno sumergidas en solución amortiguadora sufrieron un ligero “ablandamiento” a causa de estar sumergidas en solución durante 24h y su elongación fue menor que el polietileno original. De la misma manera la hidratación del polietileno en el caso de la calorimetría, pudiera ser la explicación de la pérdida de fuerzas intermoleculares entre cadenas de polietileno. Se sabe que la hidratación de los polímeros depende de la hidrofilia de éste y resulta en la perturbación de la estructura intermolecular estabilizada por las fuerzas de van der Waals y enlaces de hidrógeno<sup>40</sup>. Entonces, después de la hidratación, las cadenas de polímero pudieron adquirir un grado de solvatación que diera lugar a la pérdida de fuerza en polímero<sup>9,40</sup>, como se vio en las pruebas mecánicas realizadas al polietileno sumergido. En calorimetría este mismo efecto daría lugar a un decremento de la entalpía de fusión, ya que al disminuir las fuerzas intermoleculares debido a la solvatación, la energía necesaria para fundir al plástico sería menor<sup>83</sup>. Sin embargo, al producirse el mismo efecto en los tres sistemas evaluados, sin importar la concentración ni el tipo de mediador, la hidratación del polietileno pudiera ser la única razón del efecto observado ya que adicionalmente se analizaron las diferencias entre los tres tratamientos a través de una prueba de ANOVA y no se encontró alguna diferencia significativa.

El  $\Delta H_m$  también se encuentra relacionado con la abundancia de regiones cristalinas en plásticos semicristalinos como es el caso del polietileno. El cambio producido por la hidratación redujo la entalpía de fusión, como ya se mencionó, y por consiguiente en términos del arreglo molecular, hubo una disminución de la cristalinidad de alrededor del 20% en los tres casos, como se observa en la tabla 5.10.

En la figura 5.8 se muestran los termogramas del polietileno original (gráfica negra) y los tres tratamientos con los tres mediadores: HBT (azul), Fenol (rojo) y ABTS (verde). En la gráfica se señaló

la temperatura de fusión ( $T_m$ ) y las temperaturas en las que se realizó la integración para determinar el área (45.5 a 133.5 °C). Al hacer la integración de la gráfica a través del programa QtiPlot entre los puntos previamente señalados fue que se pudo determinar las entalpías de fusión. En la gráfica 5.8 se pueden observar también algunos máximos locales, los cuales representan fragmentos de menor peso molecular que funden a menor temperatura que el resto del polímero. Para cada sistema hay distintos intermediarios, lo que pudiera indicar que el sustrato con el que se trabajó no es totalmente homogéneo y se tienen fragmentos de distinto peso molecular<sup>7</sup>.

**Figura 5.8.** Curvas calorimétricas de las películas de polietileno tratadas con el sistema lacasa-mediador. Polietileno original (negro), HBT 10mM (azul), Fenol (rojo), ABTS 0.1 mM (verde).

### 5.1.5. Interacción de un microorganismo con el polietileno oxidado enzimáticamente.

Una vez que se demostró la oxidación superficial de las membranas de polietileno a causa de los mediadores y la lacasa, éstas se sometieron a un tratamiento biológico, el cual es un indicador directo de que el plástico se convirtió en un material menos recalcitrante a causa de las modificaciones químicas sufridas en el tratamiento oxidativo. A través de un tratamiento biológico el plástico se puede fragmentar, continuar con el proceso oxidativo, formación de biopelículas sobre él (colonización), pero sobre todo, que haya registro de actividad metabólica del microorganismo con el que se haya puesto en contacto<sup>1,2,17,24,28,32,38,61,84-90</sup>.

Las películas de polietileno fueron retiradas de solución, se enjuagaron con agua estéril y metanol al 30% para remover la mayor cantidad de sales (provenientes de la solución amortiguadora) y cantidades de mediador que pudieran permanecer en la superficie. Posteriormente, como se

mencionó en la parte de métodos, se empleó un hongo basidiomiceto como microorganismo modelo y se incubó junto con las películas de polietileno tratadas enzima y los mediadores. El medio de cultivo que se utilizó fue un medio completamente mineral para no introducir una fuente de carbono adicional a la presente en el agar del hongo. Las muestras se incubaron durante seis semanas con trozos de agar papa-dextrosa de aproximadamente 2 cm<sup>2</sup> recubiertos con el hongo *T. sanguineus*. El cual es un hongo que puede ser encontrado en hábitats y condiciones climatológicas poco comunes, en especial esta cepa (CEIBMD01) fue aislada en una zona del estado de Veracruz, México, con un alto porcentaje de humedad, temperatura elevada y además contaminada con petróleo<sup>62</sup>, lo cual resultó atractivo para este estudio ya que el polietileno es un sustrato hidrófobo y recalcitrante.

**Figura 5.9.** Crecimiento de *Trichoderma sanguineus* en polietileno como única fuente de carbono, las imágenes corresponden al polietileno control (sin tratamiento enzimático) a distintos tiempos de la incubación. El plástico se colocó sobre los trozos de agar PDS con el microorganismo.  
**A)** PE\_control, tiempo 0. **B)** PE\_control, tiempo 2 días de incubación; **C)** PE\_control, tiempo: 14 días de incubación.

En la figura 5.9, se pueden observar algunas imágenes que fueron tomadas durante el tiempo de incubación. Los tratamientos seleccionados para este experimento fueron: una membrana control (sin tratamiento), PE\_LAC\_HBT 10mM, PE\_LAC\_Fenol 1mM y PE\_LAC\_ABTS 0.1mM (los cuales no se muestran en la figura). Durante el periodo de incubación no se determinó incremento de biomasa, únicamente se visualizó que el micelio invadió completamente las cajas Petri. Tampoco hubo evidencia visual de contaminaciones microbianas. Al finalizar el periodo de 6 semanas de incubación, las cajas Petri fueron llevadas al Parque Científico y Tecnológico de Morelos (PCyTM) y al Instituto de Fisiología Celular (IFC UNAM) en donde se prepararon las muestras para su análisis a través de microscopía electrónica de barrido (SEM. por sus siglas en inglés). Con esta técnica se pretendió analizar la superficie del plástico para buscar evidencias que nos indicaran que realmente había una interacción entre el polietileno y el microorganismo. A través de la DSC se demostró que los plásticos tratados enzimáticamente sí cambian en cuanto a cristalinidad y de acuerdo a la literatura, estas zonas amorfas en poliolefinas como el polietileno, pueden ayudar a proporcionar zonas de mayor accesibilidad a los microorganismos y que a partir de ahí éstos empiecen la colonización del

material<sup>30,32,33,37,77</sup>. Un cambio morfológico puede ser visible en el plástico, por ejemplo, la oxidación por radiación puede ser monitoreada por SEM<sup>77</sup> al igual que los cambios que se producen en polietilenos mezclados con catalizadores metálicos<sup>25</sup>.

En la figura 5.10 se muestran una serie de imágenes tomadas con el microscopio electrónico de barrido en el que se puede evidenciar la presencia del microorganismo en la superficie del material. Se observó una proliferación del micelio en las muestras que fueron tratadas con el sistema lacasa + mediador.

**Figura 5.10.** Micrografías de SEM de la interacción del hongo *T. sanguineus* con polietileno de baja densidad (PE) después de 6 semanas de incubación en medio mineral.  
**A)** PE, 150X; **B)** HBT 10 mM, 150X; **C)** FENOL 1 mM, 150 X; **D)** ABTS 0.1 mM, 150X; **E)** PE, 750X; **F)** HBT 10 mM; 750X; **G)** FENOL 1 mM 750X; **H)** ABTS 0.1 mM; 750X.

En el control se realizó una búsqueda sobre la superficie de toda la muestra y se encontró poca evidencia de la presencia del hongo, como se observa en la figura 5.11E. La superficie del polietileno control se vio homogénea en su totalidad y fue fácil poder detectar la presencia de algo ajeno como el caso de una hifa de hongo. Los tres tratamientos con mediador presentaron colonización en la superficie la cual no se cuantificó por peso seco, por lo que no se determinó en qué tratamiento hubo mayor colonización.

Se debe mencionar que la colonización de las membranas empezó a partir de las orillas y comenzó a avanzar hacia el centro ya que aquí fue donde hubo ausencia o poca presencia del microorganismo. Se ha visto en otros trabajos que una vez oxidado el polietileno, existen microorganismos capaces de crecer en su superficie como el caso de algunas especies de *Pseudomonas*<sup>89</sup>; *A. flavus*, *M. cicinelloides*<sup>61</sup>, *R. rubber*<sup>32</sup>, *R. rhodochrous*<sup>24</sup>, *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*<sup>91</sup> y algunos consorcios microbianos<sup>87,92</sup>. En estos trabajos se ha demostrado que mediante la oxidación de los sustratos usando catalizadores metálicos como estearatos de hierro y manganeso, es posible de generar un polietileno capaz de ser colonizado por microorganismos de orígenes filogenéticos distintos. En el caso de nuestro trabajo quedó demostrado que es posible oxidar el

polietileno a través de la utilización de catalizadores del tipo biológico como el caso de las enzimas y que además de eso, el polietileno resultante de la oxidación también puede ser susceptible a permitir la colonización de un microorganismo como lo fue *T. sanguineus*.

### 5.1.6. Comparación con otros trabajos en los que se empleó el sistema lacasa-mediador.

Fujisawa et al. (2002)<sup>37</sup> realizaron un trabajo con lacasa del hongo *T. versicolor* pero no reportaron datos de FTIR en su sistema lacasa\_HBT, así que no se pudo realizar una comparación con dicho trabajo. Por otro lado, en el trabajo de Zhao et al. (2002)<sup>38</sup> a pesar que no utilizaron una lacasa sí emplearon un mediador con una enzima, en este caso fue un sistema de peroxidasa de soya (SBP) y el 2,4-benzenodiol como mediador. Estos autores reportan la aparición de nuevos modos vibracionales a 1650, 1625 y 3400  $\text{cm}^{-1}$  quedando evidenciado el efecto de la oxidación del sustrato a causa del tratamiento; sin embargo, le atribuyen el aumento de la absorbancia a causa del peróxido de hidrógeno. La concentración que se reporta en este trabajo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en solución es de 0.3% (98mM aprox.), se sabe que las peroxidasas en cuestión de minutos se inactivan en presencia de 1mM de este reactivo<sup>53,79,93</sup>. Entonces probablemente los resultados reportados por Fujisawa<sup>37</sup> y su grupo de trabajo se deban al efecto únicamente del peróxido de hidrógeno. Aunque en la literatura se han visto reportes en los cuales se ha visto la presencia de aductos entre el polietileno y el mediador<sup>38</sup>, no fue posible determinar si lo observado en la zona de 1650 $\text{cm}^{-1}$  y 1670 $\text{cm}^{-1}$  pudiera ser o no debido a la presencia de algún aducto; sin embargo, la posibilidad no puede ser descartada ya que no se demostró lo contrario en este trabajo.

En la literatura no existen reportes de la utilización de ABTS como mediador para oxidar algún sustrato sobre el cual se hagan pruebas de análisis de hidrofobia a través del ángulo de contacto, infrarrojo o calorimetrías; sin embargo, se sabe que para el caso del ABTS, el mecanismo por el cual actúa como mediador es diferente al del HBT<sup>39</sup>. Esto implica que el HBT sea capaz de oxidar compuestos que el ABTS no puede, a pesar que ambos mediadores tengan un potencial redox muy similar de aproximadamente 0.88mV<sup>49</sup>. De manera general, se han propuesto dos tipos de mecanismo para el sistema lacasa-mediador: el mecanismo de transferencia de electrón (ET) y el mecanismo de transferencia de protón (HAT, por sus siglas en inglés)<sup>39,47,48</sup>.

El mecanismo ET depende de las características del sustrato, de su potencial redox y de si posee un grupo funcional que sea lo suficientemente ácido para desprotonarse y dar lugar al producto final. Por ejemplo, el alcohol veratrilo y el metil veratrilo éter difieren únicamente en que el oxidrilo bencílico del primero tiene un -H y el otro tiene un grupo metilo (-Me). El potencial redox de ambos sustratos está alrededor de los 1.4V, sin embargo, con el alcohol veratrilo sí hay reacción cuando se



adiciona lacasa y ABTS, mientras que con el metil éter de veratrilo no ocurre reacción<sup>48</sup>. En este caso los sustratos se encuentran en un valor de potencial adecuado para que el ABTS pueda sustraerles un electrón, sin embargo, cuando ocurre el rearrreglo electrónico en los sustratos, en el metil éter no puede ocurrir la desprotonación que ocurre en el -O-H del primer sustrato ya que este paso se encuentra impedido por la presencia del metilo.

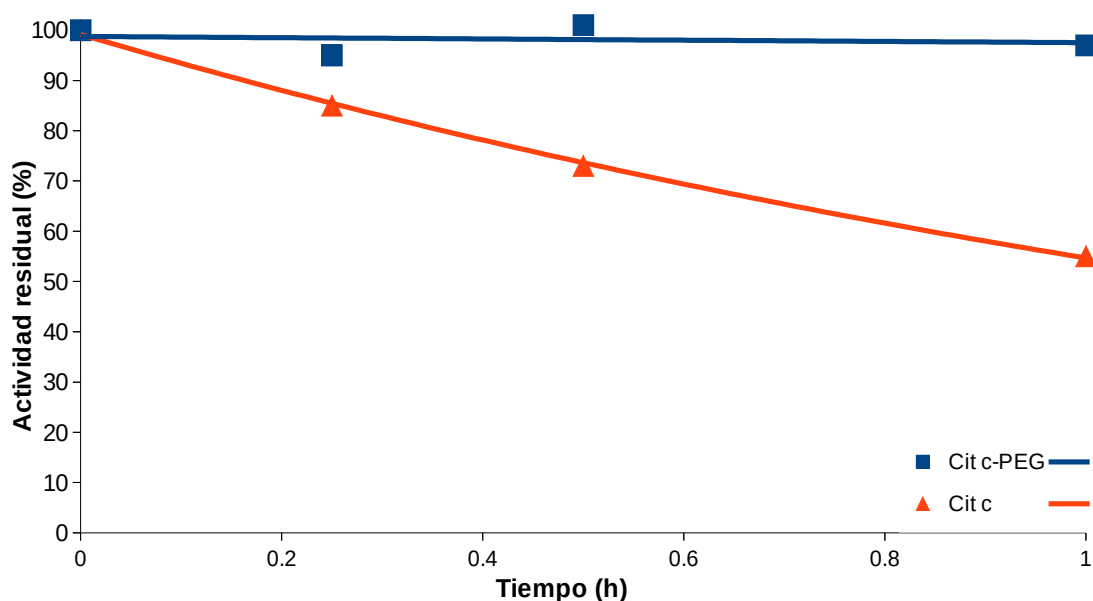
Por otro lado, el mecanismo HAT (por el cual actúa el HBT) no depende del potencial redox del sustrato, sino de la energía de disociación de los enlaces C - H que éste tenga, la cual varía de sustrato a sustrato ya que el ambiente químico determinará si es de baja o alta energía. Para el caso de los alcanos alifáticos lineales, la energía del enlace C - H se encuentra alrededor de los 400 KJ/mol<sup>94</sup>, no importando mucho la longitud de la cadena. El radical HBT<sup>•+</sup> es un radical N-oxilo que se encuentra entre dos elementos muy electronegativos (N y O), también el anillo de triazol le aporta dos átomos de nitrógeno electroattractores, que en suma, generan un ambiente químico bastante favorable para que el radical pueda actuar como una base de Brønsted-Lowry capaz de tomar un protón del polietileno<sup>47</sup>. El polietileno, al no poseer ningún átomo electronegativo como nitrógeno u oxígeno, tendrá un ambiente rico en electrones que podrá complementar la electroafinidad del radical HBT<sup>•+</sup>. Como resultado final, el polímero reaccionará con el radical HBT<sup>•+</sup> y se formaría un radical carbaniónico (R- C<sup>•</sup>-R) que será capaz de propagar la reacción por un mecanismo de radicales libres independiente de la lacasa o el mediador<sup>18</sup>. Estas implicaciones, sin embargo, aún no han sido comprobadas en un sistema de oxidación de polímeros alifáticos con lacasa por lo que mayores estudios son necesarios para elucidar completamente la forma de actuar de las enzimas sobre el polietileno.

## **5.2. Tratamiento con citocromo c modificado químicamente.**

Como se comentó en la introducción, la modificación química en la superficie de citocromo c de corazón de caballo con polietilenglicol de 5000 Da le confiere estabilidad a altas temperaturas (>80°C)<sup>51-53</sup>, lo cual nos pareció interesante a explorar ya que cuando hay un tratamiento que involucra temperatura y especies oxidantes el polietileno se vuelve un sustrato más susceptible a la oxidación<sup>33,95,96</sup>. Debido a esto, en este trabajo realizamos la modificación química del citocromo c de corazón de caballo de acuerdo con lo reportado en trabajos anteriores. El citocromo c (Sigma-Aldrich Cat. C2506), de acuerdo a las especificaciones del distribuidor, tenía una pureza mayor al 95% por lo

que se decidió emplearlo directamente del envase sin pasos de purificación previos a su modificación con PEG.

En la figura 5.11 se muestra la actividad del citocromo c nativo y el modificado químicamente, a 80 °C. Los resultados observados concuerdan con lo obtenido anteriormente<sup>52,53</sup> ya que se encontró que el citocromo sin modificar retuvo casi un 60% de su capacidad catalítica al transcurso de una hora, a diferencia del Cit c-PEG que en el transcurso de este tiempo sigue siendo 100% activo. La estabilidad del citocromo modificado con PEG se explica debido a que el polímero unido a las lisinas superficiales embebe a la proteína en una especie de esfera de solvatación, al estar rodeado por el polietilenglicol el Cit c es incapaz de desplegarse al subir la temperatura ya que el movimiento de los residuos de aminoácidos son restringidos por la cadenas de PEG y mantienen las interacciones entre ellos durante más tiempo a temperaturas altas<sup>53</sup>.



**Figura 5.11.** Curso temporal de la actividad residual del Cit c-PEG de 5KDa y su contraparte no modificada (Cit c) durante su incubación a 80°C. La actividad fue determinada tomando una alícuota de 20µL de la solución de citocromo c, guaiacol 5mM en 1mL de amortiguador fosfatos 60mM, pH=6 y adicionando 5µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200mM para iniciar la reacción a 25°C.

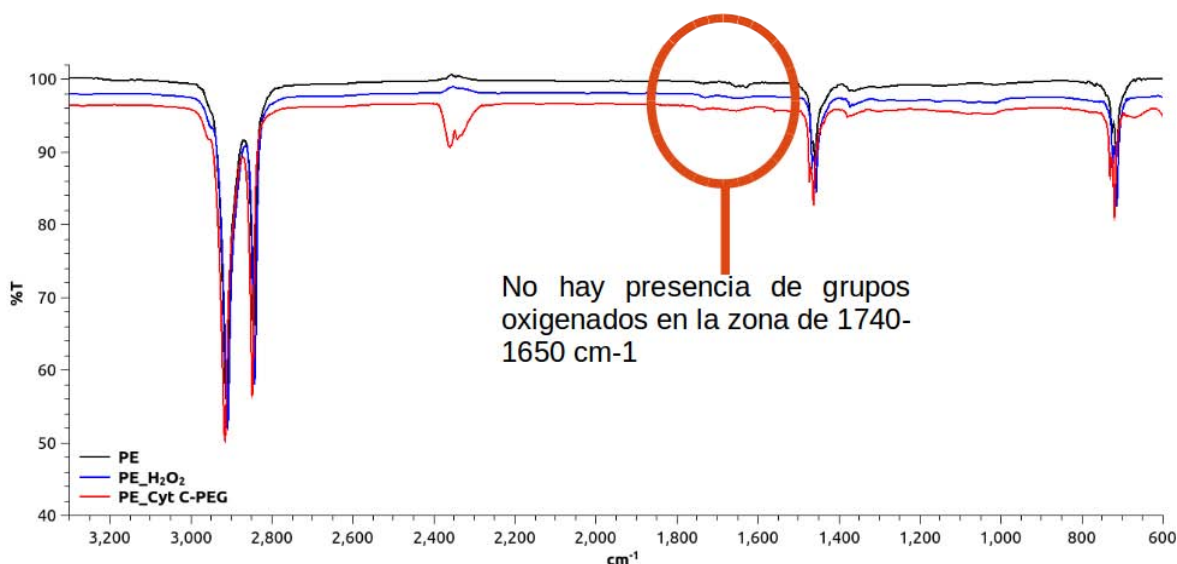
Posteriormente, cuando se realizaron las reacciones de oxidación con polietileno en presencia de 0.05mg/mL de proteína (0.001 U/mL) y haciendo adiciones de 50µL de 0.9mg/mL (0.22 U/mL) y 5µL de peróxido de hidrógeno 200mM (1 mM de concentración final), cada 30 min (hasta cumplir 8h), no se observaron cambios en la hidrofobia de la superficie de la membrana de polietileno (tabla 5.11). Específicamente hablando de la tensión superficial, no pudo ser calculada ya que los valores de superaron los 90° y de acuerdo a la ecuación (7), valores superiores a 90° ya no significantes ya que describirían una completa repulsión hacia el agua. Dentro de la composición química (figura 5.12) del polietileno, ni en las propiedades mecánicas de las películas de polietileno se encontraron evidencias que demostraran la oxidación a causa del tratamiento con cit c-PEG.

**Tabla 5.11.** Resultados del análisis de hidrofobia y pruebas mecánicas sobre las muestras de polietileno tratadas con cit c-PEG.

Tratamiento	Ángulo de contacto (°) $\theta$	Elongación relativa* (%)	Resistencia a la tensión** (MPa)
Control	92.42 ± 9.33	6.0 ± 0.6	31.4 ± 1.3
Control con peróxido	96.01 ± 5.75	5.3 ± 0.2	28.6 ± 2.2
Citocromo c	92.22 ± 4.16	-0.3 ± 0.02	27.7 ± 0.5

\*Valores relativos a 825.6 mm (PE sumergido en amortiguador de succinatos).

\*\*Valores relativos a 31.4 MPa (PE sumergido en amortiguador de succinatos).



**Figura 5.12.** Espectros de infrarrojo de las películas de polietileno después del tratamiento con citocromo c. (negro) control de polietileno sumergido en amortiguador de fosfatos 60mM, pH=6 a 80 °C durante 24h. (azul) control de polietileno sumergido en amortiguador de fosfatos 60mM, pH=6 a 80 °C durante 24h y peróxido de hidrógeno 1mM (concentración final). (rojo) tratamiento de polietileno con 3.52 U/mL de cit c-PEG, en amortiguador de fosfatos 60mM, pH=6 a 80 °C durante 24h y peróxido de hidrógeno 1mM (concentración final).

El citocromo c modificado con PEG ha mostrado en trabajos anteriores el incremento de actividad (aproximadamente nueve veces) hacia sustratos hidrófobos como lo son hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH's)<sup>52</sup> debido a que el polietilenglicol (PEG) cambia la polaridad de la región cercana al sitio activo, haciendo a esta proteína más afín hacia sustratos como los PAH's. Sin embargo, cuando comparamos PAH's como antraceno o pireno contra un sustrato como el polietileno, hay diferencias importantes, por ejemplo, el antraceno (PM: 178 g/mol) y el pireno (PM: 202 g/mol) son moléculas que consisten en tres y cuatro anillos bencénicos respectivamente, mientras que el polietileno (PM: 20 KDa) es una cadena de diez mil o más carbonos que no son solubles en el medio de reacción, así que pudiera existir un gran impedimento estérico para que este sustrato pueda acercarse al sitio activo y oxidarse como lo harían moléculas más pequeñas<sup>53</sup>.

Al no tener un sustrato donador de electrones lo más usual en el ciclo catalítico de las

peroxidasas, como el cit c-PEG, es un proceso de autooxidación que conduce hacia la inactivación de la proteína o a la destrucción del hemo a causa de intermediarios con alto potencial redox que se generan en el grupo prostético hemo de estas proteínas<sup>53,93</sup>. Al comenzar el ciclo catalítico, el peróxido de hidrógeno actúa como aceptor de electrones, generando un intermediario oxoferrilporfirínico, el cual es denominado como “compuesto I”<sup>93</sup> y cuyo potencial redox ( $E > 0.8V$ ) es lo suficientemente oxidante e inestable para oxidar residuos de aminoácidos de bajo potencial redox (Tyr, Cys, Asn). Estos cambios oxidativos pueden romper enlaces S-S, convertir residuos hidroxilados (-OH) a sus respectivos ácidos carboxílicos o inclusive generar radicales libres que pueden llevar a un entrecruzamiento entre proteínas<sup>79,97</sup>.

## 6. CONCLUSIONES.

El polietileno es un plástico recalcitrante el cual representa en volumen más del 50% de la demanda de plásticos a nivel mundial. Para poder incidir en el “debilitamiento” del material fue necesario modificar su composición química como ya se había reportado en la literatura.

La oxidación enzimática ha demostrado ser una alternativa verde para el tratamiento de distintos contaminantes de naturaleza hidrófoba, sin embargo, el polietileno al ser un sustrato más complejo no pudo ser oxidado únicamente por las enzimas en solución. A pesar que se intentó aprovechar las capacidades catalíticas del citocromo c modificado con PEG a altas temperaturas, probablemente el tamaño del sustrato fuera el principal impedimento por el cual a pesar de utilizar un total de 1.2 mg de enzima suministrada en pequeñas dosis en el transcurso de 8 horas no ocurrieron cambios en las propiedades químicas del sustrato. La lacasa por sí sola tampoco fue capaz de cambiar químicamente al polietileno, sin embargo, se observó que en el medio de reacción se desprendió un precipitado blanco de naturaleza aun desconocida pero que al menos por espectroscopía infrarroja pudimos descartar que no fuera polietileno (información no mostrada). Posiblemente se trató de algún aditivo presente en el polietileno comercial.

Por otro lado, cuando se emplea un sistema en el cual la enzima no tiene que interactuar directamente con el polietileno se encontraron resultados bastante prometedores. Por un lado, se demostró que el polietileno perdió hidrofobia en presencia de 1mM de HBT y fenol; el ángulo de contacto, el cual es una técnica que nos ayudó para medir este parámetro, disminuyó de 90° a 65° aproximadamente, esta reducción de 30° resulta en una superficie en el polietileno que se asemeja a la de polímeros biodegradables como el ácido poliláctico (71°) y PLA/PGA 50:50 (53°), en términos de hidrofobia. De estos resultados se dedujo que la oxidación del polietileno y la introducción de nuevos grupos funcionales pudo ser la causa de esta ganancia de hidrofilia.

La oxidación del polietileno se comprobó mediante FTIR-ATR; el parámetro de índice de carbonilo nos ayudó a comparar nuestros resultados con los reportados en la literatura en los que se emplearon catalizadores de iones metálicos. El HBT 10mM ( $I_{CO}=1.03$ ) y el fenol en las tres concentraciones empleadas ( $I_{CO}= 2.2$ ) fueron nuestros mejores resultados y son comparables a los alcanzados con un tratamiento con el ion manganeso y utilizando temperatura como factor abiótico ( $I_{CO}=1.3$ ).

Se investigó que el laser del equipo ATR de espectroscopia infrarroja tiene una penetración de 2 a 5µm en las muestras que se pueden analizar en él, lo que quiere decir que la matriz de las

membranas de polietileno no fue explorada. Una oxidación únicamente en la superficie del sustrato podría explicar la ausencia de cambios en las propiedades mecánicas medidas en este trabajo, ya que quizá el tratamiento enzimático difundió poco al interior del polietileno y los cambios en las propiedades mecánicas (que son globales) pudieron no ser perceptibles mediante el tensiómetro.

A pesar de esto se demostró que la oxidación enzimática del polietileno sí incidió en su propiedades moleculares, ya que el porcentaje de cristalinidad disminuyó en 20% en los tres casos estudiados (ABTS 0.1mM, HBT 10mM y Fenol 1mM).

Finalmente se concluyó que la disminución en la hidrofobia de la superficie, la oxidación parcial del polietileno y el cambio en el arreglo molecular son cambios que fueron suficientes para que un microorganismo modelo como lo fue el *T. sanguineus* pudiera tener cierta afinidad hacia el polietileno, como se observó a través de la microscopía de la superficie del polietileno.

## 7. BIBLIOGRAFÍA.

1. Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A. & Ahmed, S. Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnology Advances* **26**, 246–265 (2008).
2. Sangale, M. K., Shahnawaz, M. & Ade, A. B. A Review on Biodegradation of Polythene: The Microbial Approach. *Journal of Bioremediation & Biodegradation* **3**, 1–9 (2012).
3. Harper, C. A. & Petrie, E. M. *Plastics materials and processes a concise encyclopedia*. (John Wiley & Sons, Inc., 2003).
4. Seymour, R. B. *Plastics Chemistry and Engineering. Industrial and Engineering Chemistry* **61**, (1969).
5. Holzapfel, B. M., Reichert, J. C., Schantz, J.-T., Gbureck, U., Rackwitz, L., Nöth, U., Jakob, F., Rudert, M., Groll, J. & Hutmacher, D. W. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. *Advanced drug delivery reviews* **65**, 581–603 (2013).
6. Kumar, S., Panda, A. K. & Singh, R. K. A review on tertiary recycling of high-density polyethylene to fuel. *Resources, Conservation and Recycling* **55**, 893–910 (2011).
7. Arutchelvi, J., Sudhakar, M., Arkatkar, A., Doble, M., Bhaduri, S. & Uppara, P. V. Biodegradation of polyethylene and polypropylene. *Indian Journal of Biotechnology* **7**, 9–22 (2008).
8. PlasticEurope. An analysis of European latest plastics production, demand and waste data. *Plastics – the Facts 2013* 1–40 (2013).
9. Thomson, T. *Polyurethanes as Specialty Chemicals. Principles and Applications*. (CRC Press, 2005). doi:10.1201/9781420039665
10. Zheng, Y., Yanful, E. K. & Bassi, A. S. A review of plastic waste biodegradation. *Critical reviews in biotechnology* **25**, 243–50 (2005).
11. Sivan, A. New perspectives in plastic biodegradation. *Current opinion in biotechnology* **22**, 422–426 (2011).
12. Panda, A. K., Singh, R. K. & Mishra, D. K. Thermolysis of waste plastics to liquid fuel A suitable method for plastic waste management and manufacture of value added products—A world prospective. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **14**, 233–248 (2010).
13. Ding, F., Xiong, L., Luo, C., Zhang, H. & Chen, X. Kinetic study of low-temperature conversion of plastic mixtures to value added products. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **94**, 83–90 (2012).
14. Kyrikou, I., Briassoulis, D., Hiskakis, M. & Babou, E. Analysis of photo-chemical degradation behaviour of polyethylene mulching film with pro-oxidants. *Polymer Degradation and Stability* **96**, 2237–2252 (2011).

15. Kpere-Daibo, T. S. Plastic catalytic degradation study of the role of external catalytic surface, catalytic reusability and temperature effects. (University of London, 2009).
16. Horvat, N. & Ng, F. T. T. Tertiary polymer recycling: study of polyethylene thermolysis as a first step to synthetic diesel fuel. *Fuel* **78**, 459–470 (1999).
17. Shibryaeva, L. in *Polypropylene* (ed. Dogan, F.) (2012).
18. Ammala, A., Bateman, S., Dean, K., Petinakis, E., Sangwana, P., Wonga, S., Yuan, Q., Yu, L., Patrick, C. & Leong, K. H. An overview of degradable and biodegradable polyolefins. *Progress in Polymer Science* **36**, 1015–1049 (2011).
19. Arkatkar, A., Arutchelvi, J., Sudhakar, M., Bhaduri, S., Uppara, P. V. & Doble, M. Approaches to Enhance the Biodegradation of Polyolefins. *The Open Environmental Engineering Journal* **2**, 68–80 (2009).
20. Lucas, N., Bienaime, C., Belloy, C., Queneudec, M., Silvestre, F. & Nava-Saucedo, J.-E. Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques. *Chemosphere* **73**, 429–442 (2008).
21. Bonhomme, S., Cuer, a, Delort, a-M., Lemaire, J., Sancelme, M. & Scott, G. Environmental biodegradation of polyethylene. *Polymer Degradation and Stability* **81**, 441–452 (2003).
22. Rodrigues-da Luz, J. M., Albino-Paes, S., Dias-Nunes, M., Soares-da Silva, M. D. C. & Megumi-Kasuya, M. C. Degradation of oxo-biodegradable plastic by *Pleurotus ostreatus*. *Plos One* **8**, 1–8 (2013).
23. Weiland, M., Daro, A. & David, C. Biodegradation of thermally oxidized polyethylene. *Polymer Degradation and Stability* **48**, 275–289 (1995).
24. Fontanella, S., Bonhomme, S., Koutny, M., Husarova, L., Brusson, J.-M., Courdavault, J.-P., Pitteri, S., Samuel, G., Pichon, G., Lemaire, J. & Delort, A.-M. Comparison of the biodegradability of various polyethylene films containing pro-oxidant additives. *Polymer Degradation and Stability* **95**, 1011–1021 (2010).
25. Abrusci, C., Pablos, J. L., Marín, I., Espí, E., Corrales, T. & Catalina, F. Comparative effect of metal stearates as pro-oxidant additives on bacterial biodegradation of thermal- and photo-degraded low density polyethylene mulching films. *International Biodeterioration & Biodegradation* **83**, 25–32 (2013).
26. Lee, B., Pometto III, A. L., Fratzke, A. & Bailey Jr., T. B. Biodegradation of degradable plastic polyethylene by phanerochaete and streptomyces species. *Applied and environmental microbiology* **57**, 678–685 (1991).
27. Wasserbauer, R., Beranová, M., Vancurová, D. & Dolezel, B. Biodegradation of polyethylene foils by bacterial and liver homogenates. *Biomaterials* **11**, 36–40 (1990).
28. Nowak, B., Pająk, J., Drozd-Bratkowicz, M. & Rymarz, G. Microorganisms participating in the biodegradation of modified polyethylene films in different soils under laboratory conditions.



*International Biodeterioration & Biodegradation* **65**, 757–767 (2011).

29. Kapri, A., Zaidi, M. G. H., Satlewal, A. & Goel, R. SPION-accelerated biodegradation of low-density polyethylene by indigenous microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation* **64**, 238–244 (2010).
30. Abrusci, C., Pablos, J. L., Corrales, T., López-Marín, J., Marín, I. & Catalina, F. Biodegradation of photo-degraded mulching films based on polyethylenes and stearates of calcium and iron as pro-oxidant additives. *International Biodeterioration & Biodegradation* **65**, 451–459 (2011).
31. Rajandas, H., Parimannan, S., Sathasivam, K., Ravichandran, M. & Su Yin, L. A novel FTIR-ATR spectroscopy based technique for the estimation of low-density polyethylene biodegradation. *Polymer Testing* **31**, 1094–1099 (2012).
32. Santo, M., Weitsman, R. & Sivan, A. The role of the copper-binding enzyme – laccase – in the biodegradation of polyethylene by the actinomycete *Rhodococcus ruber*. *International Biodeterioration & Biodegradation* **84**, 204–210 (2013).
33. Corti, A., Muniyasamy, S., Vitali, M., Imam, S. H. & Chiellini, E. Oxidation and biodegradation of polyethylene films containing pro-oxidant additives: Synergistic effects of sunlight exposure, thermal aging and fungal biodegradation. *Polymer Degradation and Stability* **95**, 1106–1114 (2010).
34. Husarova, L., Machovsky, M., Gerych, P., Houser, J. & Koutny, M. Aerobic biodegradation of calcium carbonate filled polyethylene film containing pro-oxidant additives. *Polymer Degradation and Stability* **95**, 1794–1799 (2010).
35. Quiroz-Castañeda, R. E., Martínez-Anaya, C., Cuervo-Soto, L. I., Segovia, L. & Folch-Mallol, J. L. Loosenin, a novel protein with cellulosedisrupting activity from *Bjerkandera adusta*. *Microbial Cell Factories* **10**, 1–9 (2011).
36. Iiyoshi, Y., Tsutsumi, Y. & Nishida, T. Polyethylene degradation by lignin-degrading fungi and manganese peroxidase. *Journal of Wood Science* **44**, 222–229 (1998).
37. Fujisawa, M., Hirai, H. & Nishida, T. Degradation of Polyethylene and Nylon-66 by the Laccase-Mediator System. *Journal of Polymers and the Environment* **9**, 103–108 (2001).
38. Zhao, J., Guo, Z., Liang, G. & Wang, J. Novel Surface Modification of High-Density Polyethylene Films by Using Enzymatic Catalysis. *Journal of Applied Polymer Science* **91**, 3673–3678 (2004).
39. Torres-Duarte, C., Roman, R., Tinoco, R. & Vazquez-Duhalt, R. Halogenated pesticide transformation by a laccase-mediator system. *Chemosphere* **77**, 687–692 (2009).
40. Singh, B. & Sharma, N. Mechanistic implications of plastic degradation. *Polymer Degradation and Stability* **93**, 561–584 (2008).
41. Park, J.-W., Dec, J., Kim, J.-E. & Bollag, J.-M. Effect of Humic Constituents on the Transformation

of Chlorinated Phenols and Anilines in the Presence of Oxidoreductive Enzymes or Birnessite. *Environmental Science & Technology* **33**, 2028–2034 (1999).

42. Zille, A., Munteanu, F.-D., Gübitz, G. M. & Cavaco-Paulo, A. Laccase kinetics of degradation and coupling reactions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **33**, 23–28 (2005).
43. Pickard, M. A., Roman, R., Tinoco, R. & Vazquez-Duhalt, R. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 laccase. *Applied and environmental microbiology* **65**, 3805–3809 (1999).
44. Tinoco, R., Pickard, M. A. & Vazquez-Duhalt, R. Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Letters in Applied Microbiology* **32**, 331–335 (2001).
45. De la Mora, E., Lovett, J. E., Blanford, C. F., Garman, E. F., Valderrama, B. & Rudino-Pinera, E. Structural changes caused by radiation-induced reduction and radiolysis: the effect of X-ray absorbed dose in a fungal multicopper oxidase. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **68**, 564–77 (2012).
46. Medina, F., Aguila, S., Baratto, M. A., Martorana, A., Basosi, R., Alderete, J. B. & Vazquez-Duhalt, R. Prediction model based on decision tree analysis for laccase mediators. *Enzyme and Microbial Technology* **52**, 68–76 (2013).
47. Baiocco, P., Barreca, A. M., Fabbrini, M., Galli, C. & Gentili, P. Promoting laccase activity towards non-phenolic substrates: a mechanistic investigation with some laccase-mediator systems. *Organic & Biomolecular Chemistry* **1**, 191–197 (2003).
48. Fabbrini, M., Galli, C. & Gentili, P. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **16**, 231–240 (2002).
49. Bourbonnais, R., Donal, L. & Paice, M. G. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. *Biochimica et Biophysica Acta* **1379**, 381–390 (1998).
50. Solís-Oba, M., Ugalde-Saldívar, V. M., González, I. & Viniegra-González, G. An electrochemical-spectrophotometrical study of the oxidized forms of the mediator 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) produced by immobilized laccase. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **579**, 59–66 (2005).
51. Vazquez-Duhalt, R. Cytochrome c as a biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **7**, 241–249 (1999).
52. Tinoco, R. & Vazquez-Duhalt, R. Chemical modification of cytochrome C improves their catalytic properties in oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Enzyme and Microbial Technology* **22**, 8–12 (1998).
53. Garcia-Arellano, H., Valderrama, B., Saab-Rincon, G. & Vazquez-Duhalt, R. High temperature biocatalysis by chemically modified cytochrome C. *Bioconjugate Chemistry* **13**, 1336–1344 (2002).

54. Rodríguez, E., Pickard, M. A. & Vazquez-Duhalt, R. Industrial Dye Decolorization by Laccases from Ligninolytic Fungi. *Current Microbiology* **38**, 27–32 (1999).
55. Boada, J., Gallardo, M. & Estelrich, J. Determination of polyethylene glycol activated with cyanuric chloride in liposomes. *Analytical biochemistry* **253**, 33–36 (1997).
56. Abuchowski, A., Es, T. Van, Palczuk, N. C. & Davis, F. F. Alteration Albumin of Immunological Properties of Bovine Serum by Covalent Attachment of Polyethylene Glycol. *The Journal of Biological Chemistry* **252**, 3578–3581 (1977).
57. Waters, B. W. & Hung, Y.-C. Evaluation of different methods for determination of properties of chlorine-based sanitizers. *Food Control* **30**, 41–47 (2013).
58. Kwok, D. Y. & Neumann, A. W. *Contact angle measurement and contact angle interpretation. Advances in Colloid and Interface Science* **81**, (1999).
59. Neumann, A. W., David, R. & Zuo, Y. *Applied Surface Thermodynamics*. (CRC Press, 2011).
60. Stalder, A. F., Melchior, T., Müller, M., Sage, D., Blu, T. & Unser, M. Low-bond axisymmetric drop shape analysis for surface tension and contact angle measurements of sessile drops. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **364**, 72–81 (2010).
61. Pramila, R. & Ramesh, K. V. Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by fungi isolated from municipal landfill area. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* **1**, 131–136 (2011).
62. Dantán-González, E., Vite-Vallejo, O., Martínez-Anaya, C., Méndez-Sánchez, M., González, M. C., Palomares, L. a. & Folch-Mallol, J. Production of two novel laccase isoforms by a thermotolerant strain of *Pycnoporus sanguineus* isolated from an oil-polluted tropical habitat. *International Microbiology* **11**, 163–169 (2008).
63. Li, K., Xu, F. & Eriksson, K. E. Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. *Applied and environmental microbiology* **65**, 2654–60 (1999).
64. Vandertol-Vanier, H. a, Vazquez-Duhalt, R., Tinoco, R. & Pickard, M. a. Enhanced activity by poly(ethylene glycol) modification of *Coriolopsis gallica* laccase. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **29**, 214–20 (2002).
65. Johannes, C. & Majcherczyk, A. Natural Mediators in the Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laccase Mediator Systems. **66**, (2000).
66. Neira-Arenas, G. & Cañas, L. A. Procedimiento para medir ángulos de contacto en sólidos particulados finos. *Scientia et Technica XIII* 833–838 (2007).
67. Kabza, K., Gestwicki, J. E. & McGrath, J. L. Contact angle goniometry as a tool for surface tension measurements of solids, using zisman plot method. A physical chemistry experiment. *Journal of Chemical Education* **77**, 63–65 (2000).

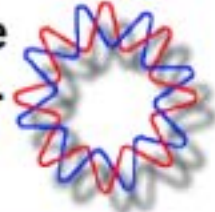
68. Zdziennicka, A. The wettability of polytetrafluoroethylene and polymethylmethacrylate with regard to interface behaviour of Triton X-165 and short chain alcohol mixtures: I. Critical surface tension of wetting and adhesion work. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **367**, 108–114 (2010).
69. Adamson, A. W. & Gast, A. P. *Physical chemistry of surfaces*. (John Wiley & Sons, Inc., 1997).
70. Simmons, G. F. *Cálculo con geometría analítica*. (McGraw-Hill, 2002).
71. Guedes, C. A., Amaro, H. M., Gião, M. S. & Malcata, X. F. Optimization of ABTS radical cation assay specifically for determination of antioxidant capacity of intracellular extracts of microalgae and cyanobacteria. *Food chemistry* **138**, 638–643 (2013).
72. Floch, C., Alarcon-Gutiérrez, E. & Criquet, S. ABTS assay of phenol oxidase activity in soil. *Journal of microbiological methods* **71**, 319–324 (2007).
73. WS Hampshire INC. TYPICAL PROPERTIES of POLYETHYLENE. 1 (2010). at <[http://www.wshampshire.com/pdf/psg\\_uhmw\\_polyethylene.pdf](http://www.wshampshire.com/pdf/psg_uhmw_polyethylene.pdf)>
74. Fabbrini M., C., G. & P., G. Wettability of biodegradable surfaces. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **16**, 1160–1168 (2002).
75. Taylor, M., Urquhart, A. J., Zelzer, M., Davies, M. C. & Alexander, M. R. Picoliter water contact angle measurement on polymers. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **23**, 6875–8 (2007).
76. Singh, S., Wu, C. & Williams, P. T. Pyrolysis of waste materials using TGA-MS and TGA-FTIR as complementary characterisation techniques. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **94**, 99–107 (2012).
77. Alariqi, S. A. S., Kumar, A. P., Rao, B. S. M. & Singh, R. P. Biodegradation of  $\gamma$ -sterilised biomedical polyolefins under composting and fungal culture environments. *Polymer Degradation and Stability* **91**, 1105–1116 (2006).
78. Wade, L. G. *Química orgánica*. (Prentice Hall, 2004).
79. Villegas, J. A., Mauk, G. A. & Vazquez-Duhalt, R. A cytochrome c variant resistant to heme degradation by hydrogen peroxide. *Chemistry & Biology* **7**, 237–244 (2000).
80. Singh, G., Bhunia, H., Rajor, A. & Choudhary, V. Thermal properties and degradation characteristics of polylactide, linear low density polyethylene, and their blends. *Polym. Bull.* **66**, 939–953 (2011).
81. Leskovics, K., Kollár, M. & Bárczy, P. A study of structure and mechanical properties of welded joints in polyethylene pipes. *Materials Science and Engineering: A* **419**, 138–143 (2006).
82. Dobkowski, Z. Thermal analysis techniques for characterization of polymer materials. *Polymer Degradation and Stability* **91**, 488–493 (2006).

83. Coelho, a., Fonseca, I. M., Matos, I., Marques, M. M., Botelho do Rego, A. M., Lemos, M. a. N. D. a. & Lemos, F. Catalytic degradation of low and high density polyethylenes using ethylene polymerization catalysts: Kinetic studies using simultaneous TG/DSC analysis. *Applied Catalysis A: General* **374**, 170–179 (2010).
84. Shinozaki, Y., Kikkawa, Y., Sato, S., Fukuoka, T., Watanabe, T., Yoshida, S., Nakajima-Kambe, T. & Kitamoto, H. K. Enzymatic degradation of polyester films by a cutinase-like enzyme from *Pseudozyma antarctica*: surface plasmon resonance and atomic force microscopy study. *Applied microbiology and biotechnology* **97**, 8591–8 (2013).
85. Ohtake, Y., Kobayashi, T., Asabe, H., Murakami, N. & Ono, K. Oxidative Degradation and Molecular Weight Change of LDPE Buried under Bioactive Soil for 32-37 Years. *Journal of Applied Polymer Science* **70**, 1643–1659 (1998).
86. Araujo, a. ., Fernandes, V. . & Fernandes, G. J. . Thermogravimetric kinetics of polyethelyne degredation over silicoaluminophosphate. *Thermochimica Acta* **392-393**, 55–61 (2002).
87. Chiellini, E., Corti, A. & Swift, G. Biodegradation of thermally-oxidized, fragmented low-density polyethylenes. *Polymer Degradation and Stability* **81**, 341–351 (2003).
88. Singh, G., Bhunia, H., Rajor, A. & Choudhary, V. Thermal properties and degradation characteristics of polylactide, linear low density polyethylene, and their blends. *Polymer Bulletin* **66**, 939–953 (2010).
89. Kyaw, B. M., Champakalakshmi, R., Sakharkar, M. K., Lim, C. S. & Sakharkar, K. R. Biodegradation of Low Density Polythene (LDPE) by *Pseudomonas* Species. *Indian Journal of Microbioly* **52**, 411–419 (2012).
90. Xiang, Q., Lee, Y. Y., Pettersson, P. O. & Torge, R. W. Applied Biochemistry and Biotechnology. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **107**, 505–514 (2003).
91. Das, M. P. & Kumar, S. Microbial deterioration of low density polyethylene by *Aspergillus* and *Fusarium* sp. *International Journal of ChemTech Research* **6**, 299–305 (2014).
92. Roy, P. K., Titus, S., Surekha, P., Tulsi, E., Deshmukh, C. & Rajagopal, C. Degradation of abiotically aged LDPE films containing pro-oxidant by bacterial consortium. *Polymer Degradation and Stability* **93**, 1917–1922 (2008).
93. Vidal-Limón, A., Águila, S., Ayala, M., Batista, C. V & Vazquez-Duhalt, R. Peroxidase activity stabilization of cytochrome P450(BM3) by rational analysis of intramolecular electron transfer. *Journal of inorganic biochemistry* **122**, 18–26 (2013).
94. Lide, D. R. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. (CRC Press/Taylor and Francis, 2010).
95. Corrales, T., Catalina, F., Peinado, C., Allen, N. S. & Fontan, E. Photooxidative and thermal degradation of polyethylenes: interrelationship by chemiluminescence, thermal gravimetric analysis and FTIR data. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **147**, 213–224 (2002).

96. Sugimoto, M., Shimada, A., Kudoh, H., Tamura, K. & Seguchi, T. Product analysis for polyethylene degradation by radiation and thermal ageing. *Radiation Physics and Chemistry* **82**, 69–73 (2013).
97. Stadtman, E. R. Oxidation of free amino acids and amino acid metal-catalyzed. *Annual Review of Biochemistry* **62**, 797–821 (1993).



# Oxidation of low density polyethylene by a laccase-mediator system (LMS).



\*Guillermo Huerta, Marcela Ayala  
\* e-mail: memohm@ibt.unam.mx

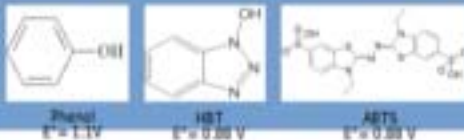
Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

## Introduction.

Low density polyethylene (LDPE) is a highly abundant, recalcitrant material, thus it accumulates in the environment [1]. LDPE oxidation seems to favor biodegradation, for example, in *in-situ* materials [2]. Oxidation of LDPE diminishes the molecular weight, introduces new functional groups, reduces mechanical resistance, among other effects. These changes in chemical and physical properties are thought to improve LDPE biodegradation by microorganisms present in soil [3]. Enzymatic oxidation of plastics is a little explored topic, in this work we demonstrate the use of a laccase to oxidize LDPE and we explore the interaction of microorganisms with the enzymatically treated plastic.

## Materials and methods.

A laccase from the basidiomycete *Coriolinus gallica* [Lac] was produced in the laboratory and the reactions were performed in succinate buffer (pH=4.5, 50mM). The mediators selected for this work were phenol (Phe), 1-hydroxybenzotriazole (HBT) and ABTS. LDPE was purchased from a commercial distributor located in Morelos, Cuernavaca, Mexico. Contact angle, infrared spectroscopy (FTIR), tensile strength, relative elongation and differential scanning calorimetry (DSC) were the techniques used to evaluate the oxidation of LDPE films. Scanning electron microscopy (SEM) was used to evaluate the colonization of enzyme-treated LDPE by a soil fungi (*Trichoderma sanguineus*).



## Results.

Three concentrations of mediator (0.1, 1 and 10 mM) were utilized. The highest effect was observed for Phe 1 mM and HBT 10 mM. No effect on the mechanical and surface properties of LDPE was observed with ABTS, only an increase in the carbonyl index ( $I_{C=O}$ ).

- For HBT and Phe, contact angle, which reflects surface hydrophobicity was reduced (17% and 16 %, respectively) after a 24h-enzymatic treatment (Figure 1).
- Accordingly, the presence of oxidized groups detected by FTIR (measured as carbonyl index  $I_{C=O}$ ) was significantly increased after enzymatic treatment. A chemical oxidation with  $HNO_3$  is shown for comparison (Figure 2).
- Mechanical properties such as elongation and tensile strength were reduced only for HBT treatment. For Phe, a similar tensile strength was observed however an unexpected, slight increase in elongation was recorded (Table 1 and Figure 3).

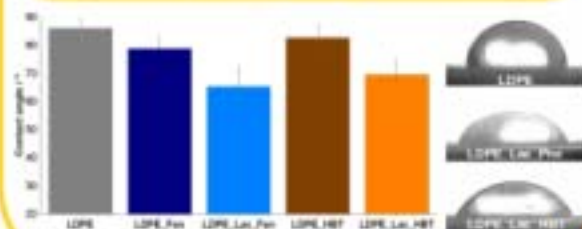


Figure 1: Contact angle measurements determined by sessile drop on LDPE films.

**Acknowledgments:** Authors wish to thank Khadija Mehal and Marcela Bermudez (UN-UNAM) and Claudio Cadena (ICeCM) for assistance with measurements, as well as Guadalupe Zavala (IBT-UNAM) and Fernando García (IC-UNAM) for SEM. This work was supported by Conacyt 179241.

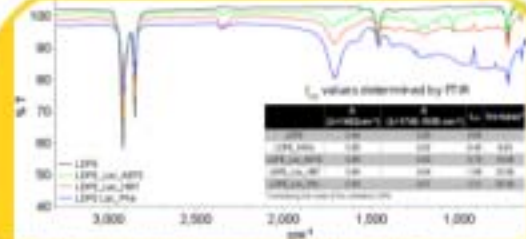


Figure 2: IRIR and  $I_{C=O}$  of untreated (black) and Lac-treated LDPE in the presence of ABTS (green), HBT (orange) and Phe (blue).

**Table 1:** changes in physical properties of LDPE treated with LMS.

Sample	Elongation (mm)	Relative elongation (%)	Tensile strength (MPa)
LDPE	412.6±45.8	-	31.4 ± 0.1
LDPE_Lac_Phe	402.4±49.2	-8.9	31.3 ± 2.9
LDPE_Lac_HBT	301.9±32.8	-26.9	26.7 ± 4.4



Figure 3: LDPE after 24h enzymatic treatment.

- DSC characterization showed an approx -10% decrease in crystallinity, suggesting disruption of ordered chains in LDPE due to oxidation (Table 2).
- Clearly, a favored interaction of soil fungi with treated LDPE was observed, probably increasing the chance of biodegradation in natural conditions (Figure 4).

**Table 2:** DSC characterization of LDPE films

Sample	T <sub>onset</sub> (°C)	ΔH <sub>fusion</sub> (J/g)	Crystallinity (%)
LDPE	123.58	86.49	80.03
LDPE_Lac_HBT	122.38	76.58	76.61
LDPE_Lac_Phe	123.67	74.80	76.58

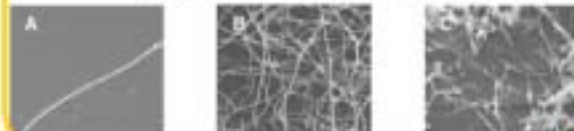


Figure 4: SEM (1000X) of the *T. sanguineus* mycelia attached on LDPE's surface after enzymatic treatment. (A) untreated, (B) Lac-HBT, (C) Lac-Phe (1-2 month incubation in the absence of carbon source).

## Conclusions.

LDPE oxidation by Lac-mediator system is feasible; this oxidative treatment accomplished some of the desired properties for biodegradable synthetic polymers [4,5]. The extent of the oxidation seems to be sufficient to improve interaction with a soil fungus.

## References.

1. Ferrás A. V., Sogit, R. A. & Morais, D. S. Thermolysis of waste plastics to liquid hydrocarbon method for plastic waste management and manufacture of value added products—A world perspective. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 233-248 (2020).
2. Ponomareva, S., Sotomayor, S., Kuchin, M., Husarek, L., Sidorov, J. M., Cherdronov, J. P., Dubov, A. M. Comparison of the biodegradability of various polyethylene films containing prooxidant additives. *Polymer Degradation and Stability* 16, 1031-1035 (2020).
3. Sotomayor, S. et al. Biodegradable biodegradation of polyethylene. *Polym. Degrad. Stab.* 15, 441-452 (2020).
4. A. Arakawa, J. Arakawa, M. Sudoaka, C. Shirota, T. V. Uggara, D. M. Apperentia to Enhance the Biodegradation of Polyesters. *J. Polym. Sci.* 2011(2011).
5. Arakawa, C. et al. Biodegradation of photo-degraded melting films based on polypropylene and polyethylene and their pro-oxidant additives. *Int. Biodegrad. Biobioresour.* 15, 451-459 (2012).



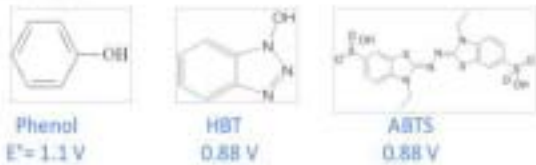
# Transformation of polyethylene films catalyzed by a fungal laccase



Marcela Ayala, Guillermo Huerta

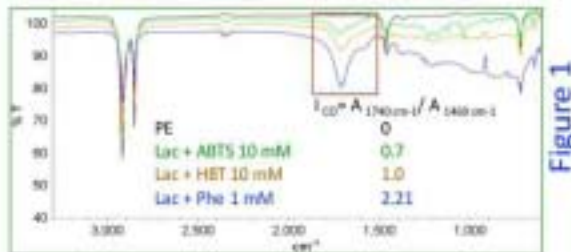
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. E-mail:maa@ibt.unam.mx

**Objective:** to quantify the transformation of recalcitrant polyethylene films (PE) using a laccase-mediator system, and to explore the potential biodegradability of the enzymatically-treated material.



**Experimental strategy:** A high redox potential laccase from *Coriolopsis gallica* was produced and purified in our laboratory. Commercial, low density PE films were treated in aqueous solution (pH 4.5 succinate buffer) in the presence of laccase and 0.1, 1 and 10 mM mediator for 24 h.

**Results:** All of the laccase-treated PE films, with all mediators and at all concentrations of mediators, showed signs of oxidation, according to the carbonyl index ( $I_{CO}$ ) measured by FTIR (Fig. 1). As reference, a PE film treated with  $\text{HNO}_3$  showed an  $I_{CO}$  of 0.42.



•Contact angle, reflecting surface hydrophobicity, showed a 16 and 17% decrease for the best treatments (Lac + Phe 1 mM and HBT 10 mM, respectively), as exemplified in Fig. 2.



Lac + Phe 1 mM  
Lac + HBT 10 mM  
PE without treatment  
PE before elongation



Figure 3

•Regarding mechanical properties, a maximum decrease in tensile strength of around -10% was observed for the treatment with Lac + HBT 10 mM, accompanied by a significantly lower relative elongation (-27%), suggesting a decrease in resistance and elasticity of treated PE.

•An unexpected increase (+16%) in relative elongation was observed for the treatment with Lac + Phe 1 mM (Fig. 3).

•Calorimetric characterization showed a slight decrease in PE crystallinity (-10%) after treatment with Lac + HBT and Phe.

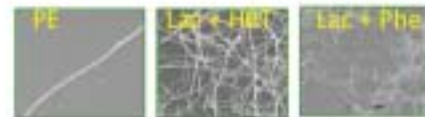


Figure 4

•Potential biodegradability of treated PE was evaluated through interaction with *Trichoderma sanguineum*. Hyphae are readily observed on the surface of PE treated with Lac + HBT and Lac + Phe but not on the control sample (Fig. 4)

**Conclusions:** Laccase-treated PE in the presence of mediators showed signs of oxidation, that seems to favor interaction with a soil fungi. Other properties (mechanical, surface and calorimetric) do not appear so determinant. HBT gave the best results.

**Acknowledgements.** Authors wish to thank Alfredo Maciel and Maricela Bermudez from IIM-UNAM and Claudio Cadena for assistance with measurements, as well as Guadalupe Zavala (IBT-UNAM) and Fernando Garcia (IFC-UNAM) for SEM. This work was supported by Conacyt 179241.

Figure 2



## [Súmate]

¿Te ha pasado que intentas jugarlo a la búsqueda del tesoro y cuando estás cavando en tu jardín o en el parque, encuentras muchas cosas nuevas, lo que buscas? ¡Huecos escondidos por perros, pajarracos extraños, hojas de plástico... y en muy buenas condiciones!

Esto es una mala noticia, pues si un material tarda mucho en degradarse nos acompañará por años incluso si es basura!

En el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) los científicos investigan cómo hacer que las bolsas de plástico se degraden más rápido y dependa de ser bioceros. Está, en menos tiempo que lo que normalmente lleva (hasta 500 años).

### Un collar de carbono e hidrógeno

Las bolsas de plástico están hechas de un material llamado polietileno; si pudiéramos poderlo imaginar como un collar que está hecho de dos tipos de átomos: el carbono y el hidrógeno.

# El collar que era muy resistente

Los enlaces entre estas cuentas son muy fuertes. Es como si el collar estuviera hecho de hilo muy resistente; además, en ocasiones, varios collares están pegados entre sí... ¡Por eso es tan difícil que pueda deshacerse!

Marcía Ayala Aceves y su alumno Guillermo Huerta Miranda, lograron agregarle una cuenta de oxígeno al collar, con ayuda de enzimas (proteínas) que obtienen de hongos. Y como con cualquier átomo, este elemento debilita la estructura.

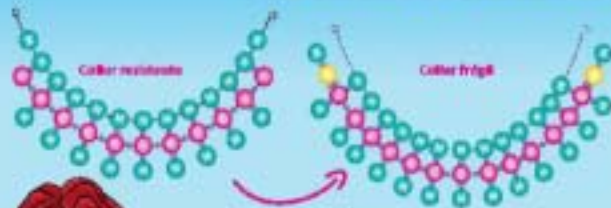
Con el oxígeno, el hilo se rompe y los cuentas se separan; por lo tanto, la bolsa de plástico se puede deshacer más fácilmente.

Si se quiere ir un poco más allá, una forma de hacerlo es... ¡Atención! En la siguiente página se te muestra la explicación.

### En el laboratorio

Aproximadamente en diez días los investigadores hacen su experimento. ¡Dicen que se divierten mucho!, pero también registran todo con precisión.

1. Consigue hongos que crecen en los árboles, repórtalos en un recipiente.
2. Ponlos en un recipiente y déjalos en un cultivo rico en oxígeno (lo cual ayudará a agregar la cuenta de oxígeno al collar).
3. Compra bolsas de plástico y las cortas en pedacitos.
4. Coloca los trozos de bolsa con la enzima que extraíste del hongo. Los dejas reposando unas horas o un par de días.
5. Toca los pedacitos de plástico y hacen pruebas con las infrarrojas para ver si ya contienen la cantidad de oxígeno.
6. Analiza que tan duro y flexible está la bolsa.
7. El resultado es que los trozos de plástico ahora tienen oxígeno y por lo tanto, ¡son más fáciles de romper y degradar! (Mejor que el plástico).



Actualmente, estos investigadores quieren aplicar su descubrimiento en los grandes vertederos de basura donde se encuentran miles de bolsas de plástico que tardarán cientos de años en degradarse. Esta historia continuará...

