



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE DEGRADACIÓN  
DE PET POR CUTINASAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
Maestro en ciencias

**PRESENTA**

JIMÉNEZ SEGURA VALERIA HAIDE

**TUTOR PRINCIPAL**

DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ SARABIA  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

DR. ARTURO NAVARRO OCAÑA  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

DR. AGUSTÍN LÓPEZ MUNGUÍA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO, 2023



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.

## **Reconocimientos**

### **Jurado Asignado**

Presidente: Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

Vocal: Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco

Vocal: Dra. Selena Gutiérrez Flores

Vocal: Dr. Edmundo Castillo Rosales

Secretario: Dr. Ismael Bustos Jaimes

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 312 del Departamento de Alimento y Biotecnología del Edificio E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría de la Dra. Amelia Farrés González Sarabia.

### **Apoyo económico**

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo financiero de CONACyT (No. CVU: 1002934) y de los proyectos PAPIIT (IT201921) y PAIP (5000-9095).



## Índice

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>11</b>
2.1	Economía circular .....	11
2.2	Definición de plástico .....	11
2.3	Características del poli(etilen tereftalato) (PET).....	12
2.4	Tratamientos de degradación de PET .....	13
2.4.1	Química .....	13
2.4.2	Nanoarcillas.....	14
2.4.3	Salas metálicas .....	14
2.4.4	Líquidos iónicos y disolventes eutécticos .....	14
2.5	Degradación enzimática de PET.....	18
2.5.1	Cutinasas .....	18
2.5.2	Mecanismo de reacción.....	19
2.5.3	Aplicaciones de las cutinasas.....	21
2.5.4	Microorganismos productores de cutinasas .....	21
2.5.5	Cutinasas y su acción sobre PET .....	23
2.5.6	Cutinasas de <i>Aspergillus nidulans</i> .....	23
2.6	Líquidos iónicos y eutécticos en reacciones con enzimas .....	29
<b>3</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>30</b>
<b>5</b>	<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>31</b>
5.1	Objetivos particulares.....	31
<b>6</b>	<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>32</b>
6.1	Diagrama de flujo experimental.....	32
6.2	Reactivos utilizados .....	33
6.3	Banco de trabajo .....	35
6.4	Producción de cutinasas .....	35

6.5	Inducción de enzimas .....	35
6.6	Caracterización de las enzimas .....	35
6.6.1	Medición de actividad enzimática .....	35
6.6.2	Medición de proteína por método de Bradford .....	36
6.6.3	Preparación de gel SDS-PAGE .....	36
6.6.4	Determinación de perfil de proteínas .....	36
6.6.5	Determinación de actividad por medio de Zimograma .....	36
6.7	Estabilidad térmica.....	36
6.8	Preparación de mezclas eutécticas.....	37
6.9	Mezclas con cloruro de colina.....	37
6.10	Determinación de la actividad de las cutinasas en diversas concentraciones de DES a diferentes temperaturas.....	37
6.11	Evaluación de degradación de PET .....	38
6.11.1	Cromatografía en capa fina .....	38
6.11.2	Cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) .....	38
6.11.3	Rayos X.....	39
6.11.4	Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	39
<b>7</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>39</b>
7.1	Caracterización de las enzimas .....	40
7.2	Actividad residual relativa térmica de AN CUT1, AN CUT2 y AN CUT3 tras incubación a diferentes temperaturas.....	43
7.3	Medición cualitativa de actividad enzimática de las cutinasas con zimograma.....	48
7.3.1	Medición cualitativa de actividad enzimática en la cutinasa AN CUT1, AN CUT2 y AN CUT3 por zimografía.....	49
7.3.2	Reacción enzimática de degradación de PET con etilenglicol: (n(urea)/n(ZnCl <sub>2</sub> )) 4:1 51	
7.4	Evaluación de la degradación de PET .....	51
7.4.1	Detección de oligómeros por cromatografía en capa fina .....	51
7.4.2	Detección de monómeros y oligómeros por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC).....	53
7.4.3	Reacción enzimática de degradación de PET con mezclas eutécticas como disolvente de reacción .....	54
7.5	Escalamiento de reacción de degradación de PET utilizando mezclas eutécticas como disolvente de reacción .....	56
7.5.1	Detección de productos de degradación de PET con HPLC .....	57

7.5.2	Evaluación de degradación de PET difracción de Rayos X.....	59
8	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>70</b>
9	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>72</b>

## Índice de tablas

Tabla 1 Lista de abreviaturas .....	8
Tabla 2. Tipos de líquidos eutécticos .....	17
Tabla 3. Ejemplos de líquidos iónicos y mezclas eutécticas .....	17
Tabla 4. Microorganismos productores de cutinasas .....	22
Tabla 5. Caracterización de ANCUT1 .....	24
Tabla 6. Caracterización de ANCUT2 .....	24
Tabla 7. Características de degradación ANCUT1, ANCUT2 y ANCUT3.....	25
Tabla 8. Reacción de cutinasa ANCUT1 y ANCUT2 usando como sustrato PET .....	25
Tabla 9. Reacción de cutinasa ANCUT3 favorecida usando como sustrato PET .....	26
Tabla 10. Reacción de degradación de PET de 4 semanas .....	26
Tabla 11. Reacciones para la obtención de micrografías por microscopía electrónica de barrido .....	27
Tabla 12. Actividad de las enzimática ANCUT1, ANCUT2 y ANCUT3 con uso de <i>p</i> -nitro fenilbutirato.....	40
Tabla 13. TPA, BHET y DMT obtenidos durante la reacción a 75 °C utilizando como medio de reacción 30% etilenglicol ( $n(\text{urea})/n(\text{Zn Cl}_2)$ )4:1 por 96 h. ....	53
Tabla 14. Condiciones de reacción para la obtención de micrografías logradas con microscopía electrónica de barrido con PET molido a 50 °C utilizando diferentes disolventes (figura 21). ....	65
Tabla 15. Condiciones de reacción para la obtención de micrografías logradas con microscopía electrónica de barrido con PET molido a temperatura ambiente utilizando diferentes disolventes (figura 22).....	66



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de polimerización.....	12
Figura 2. Obtención de poli(etilen tereftalato) a partir de ácido tereftálico .....	13
Figura 3 Estructuras de algunas sales de haluro y donadores de hidrógeno utilizados en mezclas eutéctica. ....	16
Figura 4. Plegamiento de la cutinasa de <i>Fusarium solani pisi</i> .....	19
Figura 5. Mecanismo de reacción de serina esterasas.....	20
Figura 6. Micrografías obtenidas de microscopía electrónica de barrido.....	28
Figura 7. Actividad de las cutinasas en zimograma .....	41
Figura 8. Actividad residual relativa de ANCUT1, ANCUT2 y ANCUT3 a 50, 55, 60 y 65°C respecto al tiempo de incubación a diferentes temperaturas en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9. ....	43
Figura 9. Actividad residual relativa de ANCUT1, ANCUT2 y ANCUT3 en presencia de diferentes porcentajes de DES (ChCl:G:H <sub>2</sub> O) a 50 °C (A) y 55 °C (B). ....	45
Figura 10. Actividad residual relativa de ANCUT1, ANCUT2 y ANCUT3 con diferentes porcentajes de DES (ChCl:E:H <sub>2</sub> O) a 55 °C (A) y (ChCl:U:H <sub>2</sub> O) a 55 °C (B). ....	46
Figura 11. Actividad de las cutinasas ANCUT1 y ANCUT3 con diferentes mezclas eutécticas evaluada en zimogramas. Las diferentes preparaciones se incubaron en estático por 96 h a 50°C.....	49
Figura 12. Medición cualitativa de actividad enzimática en la cutinasa ANCUT1, ANCUT2 y ACUT3 por zimografía. Las muestras se incubaron en estático por 96 horas a 55°C, ....	49
Figura 13. Actividad de las cutinasas ANCUT1 y ANCUT3 con diferentes mezclas eutécticas determinada por zimograma.....	50
Figura 14. Cromatoplasmas de reacción donde el producto está disuelto .....	52
Figura 15. Productos de reacción detectados en cromatoplasmas donde el producto esta disuelto en DMSO.....	52
Figura 16. Separación cromatográfica obtenida por fase reversa utilizando una columna de sílica 18 Chromolith RP-18 e. ....	53
Figura 17. Productos obtenidos de la reacción de degradación de PET con única adición de enzima inicial tras tres semanas de incubación con enzima y mezclas eutécticas. ....	54

Figura 18. Productos obtenidos de la reacción de degradación de PET con adición de enzima cada semana, durante de 3 semanas de reacción con mezclas eutécticas .....	55
Figura 19. Cromatograma de reacción de degradación de PET con la enzima ANCUT1 a temperatura ambiente y DES a base de urea como medio de reacción.....	58
Figura 20. Cromatograma de reacción de degradación de PET con la enzima ANCUT3 a temperatura ambiente y DES a base de urea como medio de reacción.....	59
Figura 21. Difractogramas de PET a 50 °C.....	61
Figura 22. Difractogramas de PET a temperatura ambiente.....	64
Figura 23. Micrografías logradas a partir de Microscopía Electrónica de Barrido con PET molido a 50 °C. ....	67
Figura 24. Micrografías logradas a partir de Microscopía Electrónica de Barrido con PET molido a temperatura ambiente. ....	68

Tabla 1 de abreviaturas

Abreviatura	Significado
ANCUT1	Cutinasa 1 de <i>Aspergillus nidulans</i>
ANCUT2	Cutinasa 2 de <i>Aspergillus nidulans</i>
ANCUT3	Cutinasa 3 de <i>Aspergillus nidulans</i>
AOX1	Alcohol oxidasa
BHET	Bis hidroxil tereftalato
°C	Grados Celsius
ChCl	Cloruro de colina
DAD	Detector de diodos
DES	Disolventes eutécticos profundos
E	Etilenglicol
g	Gramos
G	Glicol
kDa	Kilo Dalton
KOH	Hidróxido de Potasio
mL	Mililitros
mM	Milimoles
MPa	Megapascal
NaOH	Hidróxido de sodio
nm	Nanómetro
pH	Potencial de hidrógeno
ppb	Parte por billón
ppm	Parte por millón
Rf	Factor de retardo
rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
TPA	Ácido tereftálico
Tris HCl	Tris (hidroximetil) aminometano
μM	Micromol
UV	Ultravioleta
U	Urea
V	Volts
YPD	(Yeast extract peptone dextrose) Extracto de levadura peptona

## Resumen

Las cutinasas de *Aspergillus nidulans* han mostrado potencial de degradación de diversos polímeros, entre ellos el poli(etilen tereftalato) (PET). En el equipo de trabajo fueron expresadas en *Pichia pastoris* con el fin de mejorar su producción y por lo tanto su rendimiento. En este trabajo se utilizaron las enzimas ANCUT1, ANCUT2 y ANCUT3, con el propósito de aumentar la eficiencia en la hidrólisis del PET a partir de los resultados obtenidos en diversos estudios previos.

La estrategia empleada partió del hecho de que se ha demostrado que las enzimas siguen siendo activas en mezclas eutécticas, a pesar de su viscosidad. Además, pueden aumentar los rendimientos en la catálisis y proteger a la enzima a temperaturas elevadas. En este trabajo se evaluó si las cutinasas podían ser activas en disolventes eutécticos, para lo que se utilizaron diversas mezclas a base de cloruro de colina y etilenglicol. Se demostró su actividad catalítica, mediante zimogramas y técnicas espectrofotométricas y se detectó el aumento de esta usando las mezclas eutécticas como disolvente. Se demostró que en presencia de estos disolventes existía la posibilidad de emplear temperaturas de reacción más altas, acercándose a la temperatura de transición vítrea del polímero. Cada una de las enzimas en estudio ante la temperatura y la mezcla eutéctica usada dio como resultado una hidrólisis favorecida, probablemente por las interacciones superficiales entre la proteína y el disolvente. Esto contribuyó a lograr una mayor degradación del PET en comparación a los casos en que no se usaron. Por medio de espectrofotómetro, para ANCUT1, ANCUT2 y ANCUT3 se midió la actividad relativa observando que al aumentar el porcentaje de mezcla eutéctica en el sistema de reacción aumenta la actividad relativa para las tres enzimas en los diferentes disolventes eutécticos.

Los resultados obtenidos indican que el uso de este tipo de disolventes, amigables con el medio ambiente, favorece tanto la degradación de PET como la actividad enzimática y su termoestabilidad, ofreciendo una vía de optimización de la degradación biocatalítica de este polímero.

## 1 Introducción

México es uno de los países con mayor consumo de bebidas embotelladas, por lo que el consumo de poli(etileno tereftalato) (PET) se estima en 722 millones de toneladas al año. La Comisión de Medio Ambiente y Recursos Naturales de México menciona que, en el 2014, se generaron 21 millones de botellas de PET al día, del cual solo se recicló el 20. La mala disposición de los residuos provoca su acumulación en diferentes ecosistemas y se estimó que en el 2020 habría 500 millones de toneladas de PET en los océanos. En consecuencia, la producción y el reciclaje del poliéster se han convertido en un tema de interés en los últimos años (CONAMA, 2017).

El reciclado pretende transformar el polímero plástico en nuevos productos y, cuando se regresa a sus materias primas iniciales, para su posterior uso, se habla de un proceso circular. El reciclaje puede ser térmico, químico o de tipo biológico, el cual involucra el uso de seres vivos, particularmente microorganismos, o sus enzimas. Este último, al ser más amigable con el medio ambiente, ha generado numerosas investigaciones al respecto. (Wei y Zimmerman, 2017; Kawai *et al.*, 2019).

Entre las enzimas empleadas para los procesos de reciclado destacan las cutinasas, debido a que son las únicas consideradas PET hidrolasas, debido a su potencial para degradar la parte externa e interna del block de PET (Kawai *et al.*, 2019). Son enzimas extracelulares con propiedades catalíticas similares a las de esterases y a las lipasas que hidrolizan ésteres de cadena corta, media, larga, poliésteres, triacilgliceroles y ceras. El grupo de trabajo logró identificar cuatro cutinasas en el genoma de *Aspergillus nidulans*, de las 60 enzimas tipo esterasa presentes en el mismo (Bermúdez-García *et al.*, 2019). Se aislaron sus genes y se expresaron en *Pichia pastoris* con el fin de mejorar los rendimientos de la expresión extracelular de las cutinasas (Farres *et al.*, 2017; Castro, 2017). En este trabajo se buscará condiciones experimentales para mejorar la degradación de PET conjuntando el uso de enzimas con disolventes eutécticos o líquidos iónicos.

## 2 Marco teórico

### 2.1 Economía circular

La economía circular pretende cerrar el ciclo de vida de los productos, los servicios, los residuos, materiales, agua y energía, además de ofrecer una eficiencia ecológica, económica y rentabilidad socioeconómica. En contraste, el modelo lineal, consiste en fabricar, consumir y desechar, lo cual provoca un gran desgaste ambiental y económico (Jiménez *et al.*, 2019). La biodegradación del PET es una nueva alternativa de modelo circular donde se busca reciclar el producto de una manera amigable al medio ambiente, en un proceso rentable económicamente, además de reducir la huella de carbono. La obtención de productos de degradación del PET como ácido tereftálico (TPA) y oligómeros permite cerrar el ciclo, ya que de estos puede obtenerse nuevamente PET o productos de interés en la industria termoplástica.

### 2.2 Definición de plástico

La reiteración de unidades simples, equivalentes, llamadas “monómeros”, forman una gran molécula llamada “polímero”, el cual puede formar una estructura de cadena lineal o ramificada (Figura 1). El grado de polimerización está dado por el número de unidades presentes en la cadena, es decir su longitud (Billmeyer, 2020).

Los plásticos son polímeros sintéticos de largas cadenas de monómeros por polimerización de sus elementos constituyentes de largas cadenas. Muchos de ellos son obtenidos de derivados del petróleo como el PET, sin embargo, algunos se pueden obtener de sustancias naturales (Segura *et al.*, 2007). Se clasifican en dos grupos, termoplásticos y termoestables.

Los termoplásticos suelen ser lineales, pueden calentarse y cambiar de estado sólido a líquido y solidificar al enfriarse en repetidas ocasiones; se pueden encontrar como ABS (acrilonitrilo, butadieno y estireno), acetales, acrílicos, celulíticos, fluorocarbonados, poliamidas, policarbonados, polietileno, polipropileno, poliestirenos y vinílicos. Entre los más conocidos se encuentran el poli(etileno) (PE), poli(propileno) (PP), poli (cloruro de vinilo) (PVC), poli(etileno) de baja densidad (LLDPE), poli(etileno) de alta densidad (HDPE), poli(estireno) (PS), poli (etilen tereftalato) (PET) y otras resinas (Seymour *et al.*, 1995).

En los plásticos termoestables la transición de líquido a sólido es irreversible, y el calentamiento después de su solidificación modifica su estructura química. Se clasifican en alquidos, alílicos, aminados, epóxidos, fenólicos, poliésteres, siliconas y uretanos; un ejemplo de plásticos termorresistentes es el poliuretano (PUR) (Seymour *et al.*, 1995; Alauddin *et al.*, 1994).

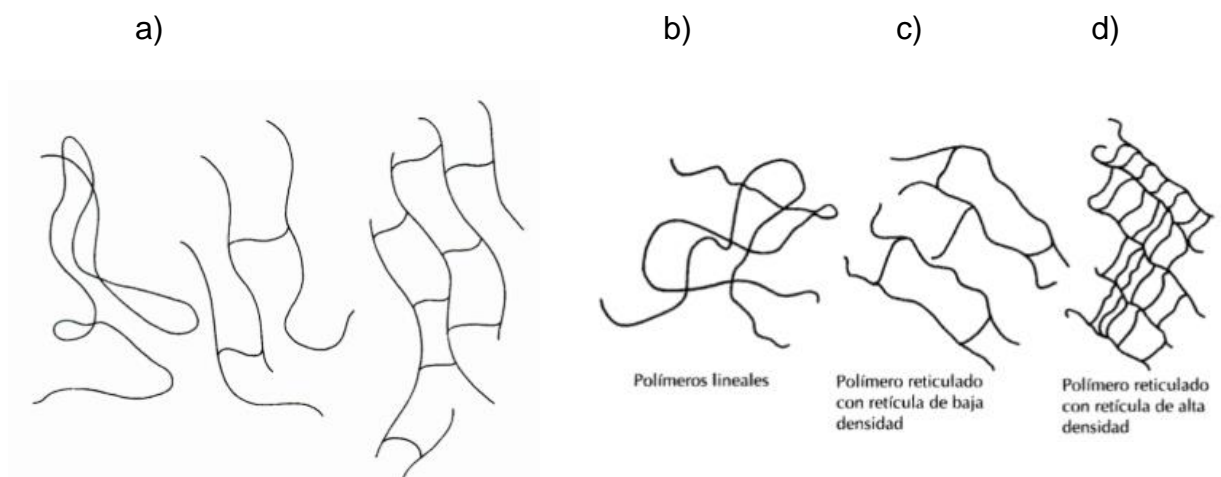


Figura 1. Estructura de polimerización. a) esqueleto estructural polímero lineal b) polímero reticular con baja densidad de enlaces cruzados c) polímero reticular con alta densidad de enlaces cruzados d) polímero amorfo (Seymour *et al.*, 1995).

### 2.3 Características del poli(etilen tereftalato) (PET)

El poli(etilen tereftalato) (PET) es un poliéster termoplástico de origen sintético. Es obtenido por reacción de esterificación entre un ácido y un alcohol, en presencia de un metal como catalizador. Los monómeros que lo constituyen empleados son el ácido tereftálico y etilenglicol. La reacción se da en dos pasos: i) esterificación y ii) polimerización. En el primero se obtiene una mezcla de bis-hidroxietil tereftalato (BHET) con oligómeros de tereftalato, que al eliminar el exceso de etilenglicol forma PET. Para la obtención de PET de alto peso molecular se requiere una segunda polimerización para lograr rigidez, tenacidad y resistencia, como se aprecia en la figura 2.

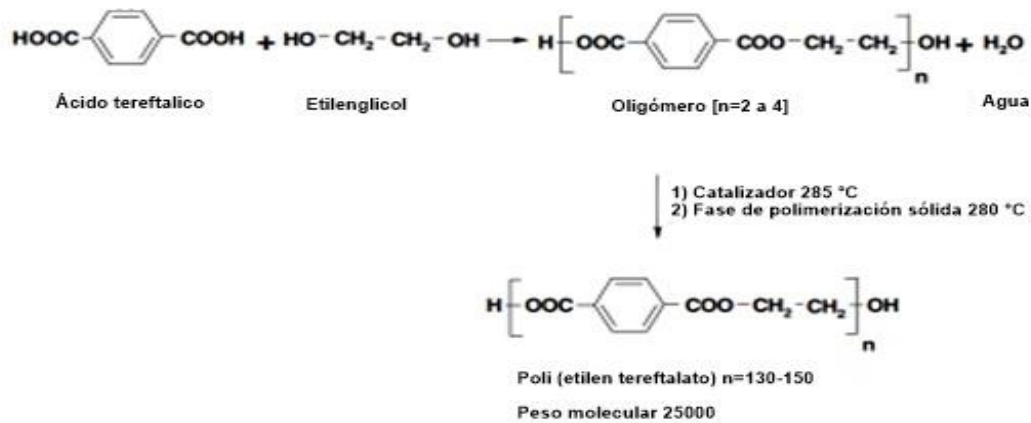


Figura 2. Obtención de poli (etilen tereftalato) a partir de ácido tereftálico (Sinha *et al.*, 2010).

El PET es un material semicristalino. Al ser calentado por encima de 72 °C, su temperatura de transición vítrea (Tg), su rigidez cambia y las cadenas poliméricas pueden ser estiradas y alineadas en una dirección para formar fibras, o en dos direcciones para formar películas y botellas.

Su uso es muy variado, se utiliza en la industria alimenticia para producir contenedores de bebidas y alimentos, películas de recubrimiento para alimentos, aplicaciones de termoformado, resinas combinadas con fibra de vidrio y en la formación de fibras sintéticas (Sinha *et al.*, 2010).

## 2.4 Tratamientos de degradación de PET

El uso del PET ha llevado a la acumulación de una gran cantidad de residuos sólidos, por lo que, se han buscado diversas estrategias para su degradación.

### 2.4.1 Química

La degradación química se divide en 1) hidrólisis, 2) glicólisis, 3) alcoholólisis, 4) amonólisis y 5) aminólisis. La hidrólisis puede ser alcalina, ácida o neutra. En la hidrólisis alcalina suele usarse NaOH o KOH a una concentración que va del 4-20%, obteniendo como productos etilenglicol y sal de dipotasio o disodio de tereftalato. El proceso se lleva a cabo a temperaturas de 210-250 °C y a una presión de 1.4-2 MPa. La hidrólisis ácida se realiza con



ácido sulfúrico concentrado u otros ácidos como nítrico o fosfórico a una temperatura de 70-100 °C. La neutra, se produce con un exceso de vapor de agua, a una presión de 1-4 MPa y temperaturas de 200-300 °C. La glicólisis se realiza por glicoles, en presencia de catalizadores trans-esterificadores, acetatos metálicos como acetato de zinc, NaCl, urea o BHET que rompen las uniones éster, a una temperatura de 110-270 °C. La alcoholisis consiste en el uso de exceso de alcohol a altas temperaturas y presiones altas para lograr condiciones supercríticas. La amonólisis y la aminólisis son conducidas a temperaturas entre 25-190 °C; la primera se realiza en disolución acuosa de etilenglicol y la segunda en solución acuosa de aminas primarias (Geyer *et al.*, 2016; Ghaderian *et al.*, 2015; Khoonkari *et al.*, 2015).

#### 2.4.2 Nanoarcillas

Los nanomateriales como herramientas para degradación de PET son de uso reciente. Los más utilizados pertenecen a la familia de los silicatos, y constan de capas formadas por silicio coordinados con hidróxido de magnesio o aluminio, con un grosor de 1nm (Bordes *et al.*, 2009).

Las nanoarcillas se emplean en la glicólisis de PET, catalizando la síntesis de TPA. Sharma *et al.* (2013) encontraron que la hidrotalcita, en presencia de dimetil sulfóxido degrada el PET en aproximadamente 10 minutos y a temperaturas por encima de 190 °C, y se puede obtener dimetil tereftalato (DMT) y etilenglicol (Khoonkari *et al.*, 2015).

#### 2.4.3 Sales metálicas

Las sales metálicas son compuestos formados por un metal y un no metal, poseen carga neutra y suelen ser excelentes conductores de electricidad. Se han utilizado como catalizadores en la degradación de PET por glicólisis. En 2013, Imran, *et al.* probaron diferentes sales metálicas como catalizadores para la degradación de PET, obteniendo los óxidos mixtos más eficientes que el óxido de un solo metal, a temperaturas que oscilan entre 180-195 °C.

#### 2.4.4 Líquidos iónicos y disolventes eutécticos

Las mezclas eutécticas han sido consideradas para la catálisis verde debido a su baja biotoxicidad y a que tienen bajas presiones de vapor, por lo que disminuyen las emisiones a la

atmósfera, además de que sus componentes no son dañinos para el medio ambiente y son rápidamente biodegradables (Smith *et al.*, 2014).

En 2002, Swatloski *et al.* presentaron por primera vez el uso de líquidos iónicos para disolución de celulosa. En 2021, Vele *et al.* presentaron el uso de líquidos iónicos como pretratamiento para material lignocelulósico con el fin de obtener azúcares y aumentar los rendimientos para la hidrólisis ácida. En 2009, Wang *et al.* reportaron su uso para degradación de PET a temperaturas de reacción de 120-200 °C y con presión atmosférica para la obtención de bis (hidroxietil) tereftalato (BHET).

Los líquidos iónicos (LI) son sales iónicas en estado líquido a temperatura ambiente con puntos de fusión por debajo de los 100 °C y presión de vapor baja. Usualmente se conforman por cationes orgánicos unidos con un anión inorgánico que poseen carga deslocalizadas.

Los líquidos o mezclas eutécticas poseen características físicas y propiedades de los LI, sin embargo, difieren de los últimos en un menor costo, una preparación fácil, biodegradabilidad y baja toxicidad. Están compuestos por dos o más componentes, uno con capacidad de donar un electrón (HBD, por sus siglas en inglés Hydrogen Bond Donor) y uno capaz de aceptar electrones (HBA, por sus siglas en inglés Hydrogen Bond Acceptor). Son sistemas formados de ácidos o bases de Lewis o Brønsted de diversas variedades catiónicas y aniónicas (Smith *et al.*, 2014). Las mezclas eutécticas se dividen en cuatro tipos por su composición en la figura 3 se observa las estructuras de algunas sales de haluro y donadores de hidrógeno. En la tabla 2 se presentan los cuatro tipos de mezclas eutécticas. Las mezclas eutécticas tipo 1, interacción entre diferentes haluros de metal y el anión haluro de una sal cuaternaria de amonio para producir especies halo metálicas con entalpías similares de formación; los tipo 2, son haluros de metal hidratados, tienen menores puntos de fusión que las sales anhidras, disminuyendo la energía reticular teniendo menores interacciones con el cloruro de la sal cuaternaria; los tipo III, dependen de la formación del anión haluro de la sal del donador de hidrogeno; los tipo IV, son sales que normalmente no están ionizadas en medios no acuosos para la formación de mezclas eutécticas. Los tipos I, II y IV debido a la presencia de una sal metálica proporciona un carácter de ácido de Lewis, en cambio los de tipo III actúan como ácido de Brønsted (Ezgi *et al.*, 2019). En la tabla 3 podemos observar ejemplos de mezclas eutécticas.

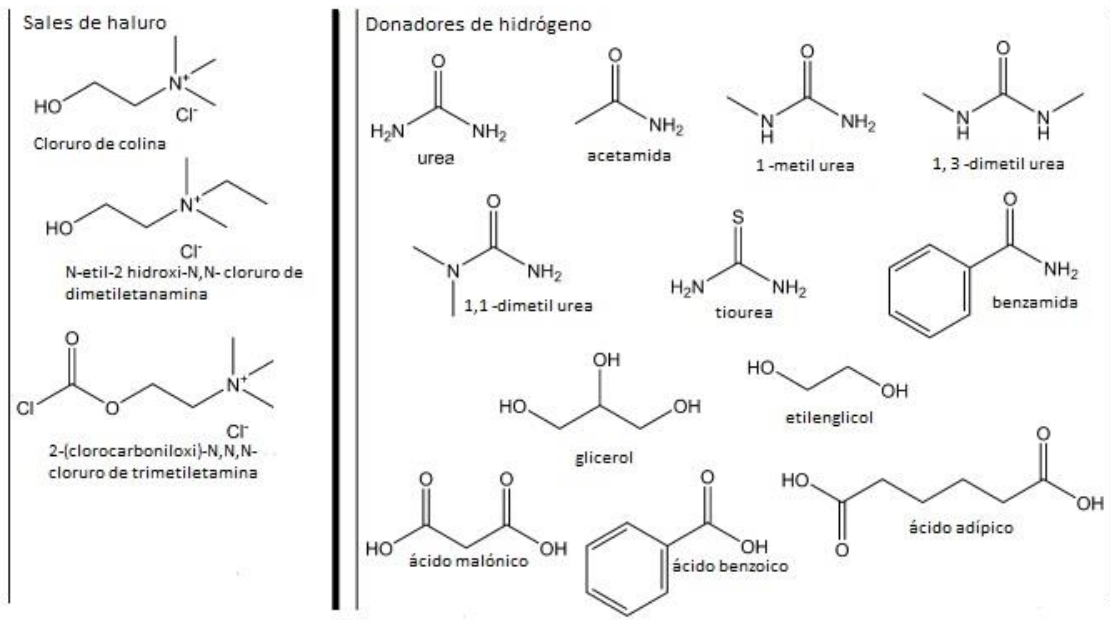


Figura 3 Estructuras de algunas sales de haluro y donadores de hidrógeno utilizados en mezclas eutéctica (modificada de Smith *et al.*, 2014).

Tabla 2. Tipos de líquidos eutécticos

Tipo	Composición	Ejemplo
I	Sal orgánica + sal metálica	Sales cuaternarias de amonio (ChCl) + haluro de metal (SnCl <sub>2</sub> , ZnCl <sub>2</sub> , FeCl <sub>3</sub> )
II	Sal orgánica + hidrato de sal metálica	Sales cuaternarias de amonio (ChCl) + hidrato de sal metálica (CrCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O)
III	Sal orgánica + HBD	Sales cuaternarias de amonio (ChCl) + compuestos orgánicos (poliamidas: urea, polialcoholes: glicerol, ácidos poli carboxílicos: ácidos malónicos)
IV	Sal metálica + HBD	Haluro de metal (ZnCl <sub>2</sub> ) + compuesto orgánico (urea, glicerol, etilenglicol)

(Ezgi *et al.*, 2019; Smith *et al.*, 2014)

Tabla 3. Ejemplos de líquidos iónicos y mezclas eutécticas

Líquidos iónicos	Mezclas eutécticas
Triacetato de zincato de 1,3-dietilimidazolio ([deim][Zn(OAc) <sub>3</sub> ])	Ácido cítrico: cloruro de colina (1:2)
Acetato de 1,3-dietilimidazolio ([deim]OAc)	Glucosa: cloruro de colina: agua (1:1:1)
1-butil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato (BP6).	Ácido cítrico: glucosa (1:1)

Líquidos iónicos de imidazolio (izquierda). Mezclas eutécticas del tipo III (derecha) (Dai *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2012)

## 2.5 Degradación enzimática de PET

En virtud de que las diferentes formas de degradación de PET descritas anteriormente requieren utilización de disolventes y/o altas temperaturas, se han buscado alternativas para el tratamiento del poliéster. La biotecnología ha permitido la degradación de PET por cutinasas, lipasas y estererasas. El PET no es un sustrato natural para las enzimas, sin embargo, éstas pueden incrementar su afinidad por el polímero (Khoonkari *et al.*, 2015). La diferencia entre estererasas y cutinasas está dada por su capacidad de hidrolizar poliésteres de alto peso molecular (Chen *et al.*, 2013).

Proteasas, como la papaína, han sido estudiadas para incrementar la hidrofiliidad de poliésteres para su degradación. En 2010, Kim y Song extrajeron papaína del fruto *Carica papaya* para tratar fibras de tela hecha de poliéster, demostrando que la papaína puede actuar como estererasa, en ciertas condiciones, hidrolizando enlaces éster.

Vertommen *et al.*, (2005) compararon la degradación por una lipasa de *Candida antarctica* y una cutinasa de *Fusarium solani pisi*, concluyendo que la cutinasa tuvo actividad hidrolítica sobre las regiones de PET amorfo; en cambio la lipasa no presentó degradación del PET en la región cristalina ni amorfa.

Müller *et al.*, (2005) investigaron la degradación por dos lipasas, una proveniente de *Pseudomonas sp.* y la otra de *Candida antarctica*, comparándolas con una cutinasa de *Thermobifida fusca*, en láminas de PET, obteniendo resultados de degradación con la cutinasa de *Thermobifida fusca*, y sin hidrólisis por parte de las lipasas.

A pesar de las similitudes que comparten las lipasas, las estererasas y las cutinasas, las cutinasas son consideradas como PET hidrolasas debido a su capacidad de degradar tanto la parte interna como la parte externa del bloque de PET, en cambio las modificadoras de superficie de PET degradan la parte externa del bloque de PET (Kawai *et al.*, 2019).

### 2.5.1 Cutinasas

Las cutinasas (EC 3.1.1.74) son enzimas hidrolasas de serina pertenecientes a la familia de las  $\alpha/\beta$  hidrolasas, al igual que las lipasas y proteasas de serina. Pueden degradar la cutina, que es un componente estructural para la formación de la cutícula en plantas usualmente formado por ácidos grasos de  $C_{16}$ - $nC_{18}$ . Estas son capaces de hidrolizar ésteres solubles de

bajo peso molecular, triacilgliceroles de cadena corta y larga, pueden realizar esterificación y transesterificación. Han sido encontradas y caracterizadas en diferentes fuentes como polen, hongos y bacterias (Carvalho *et al.*, 1998)

Las cutinasas tienen un número aproximado de 200 residuos y una masa molecular alrededor de 22 kDa, con tramos conservados, que forman un puente disulfuro entre cisteínas. El sitio activo de las  $\alpha/\beta$  hidrolasas corresponde a una triada catalítica, constituida por residuos de Ser, His y Asp/Glu; es accesible al disolvente y localizada en un extremo elipsoide. Para *Fusarium solani pisi* el sitio catalítico se encuentra rodeado por un asa 80-87 y una asa más hidrofóbica 180-188 con la presencia de dos puentes disulfuro que permiten el contacto del sustrato con el sitio activo (Carvalho *et al.*, 1998; Egmond *et al.*, 2000). Figura 4.

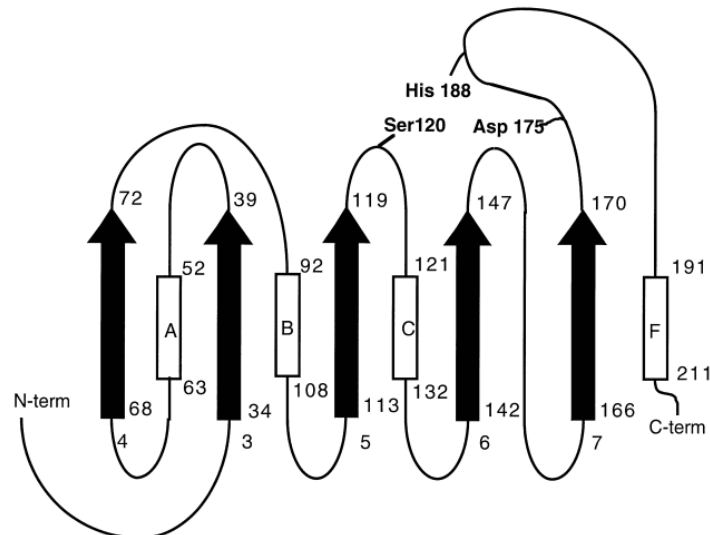


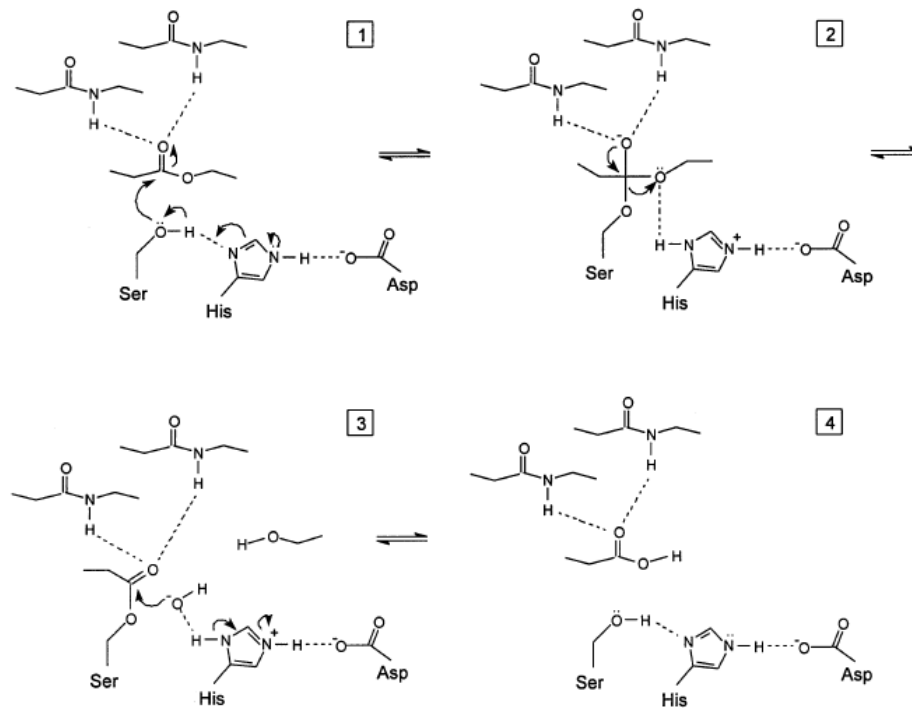
Figura 4. Plegamiento de la cutinasa de *Fusarium solani pisi*. Tomada de (Egmond *et al.*, 2000).

### 2.5.2 Mecanismo de reacción

La hidrólisis del sustrato se da en cuatro pasos, como se muestra en el figura 5. (1) El primero consiste en el ataque nucleofílico del átomo de oxígeno del grupo hidroxilo del residuo de serina al carbonilo del éster del sustrato, (2) se forma un intermediario tetraédrico estabilizado por dos puentes de H entre el oxianión y dos átomos de N de enlaces peptídicos, la histidina dona un protón, liberando una molécula de alcohol. (3) En el intermediario, acil-enzima, el

resido de histidina activa una molécula de agua que realiza un ataque nucleofílico al carbonilo. (4) El residuo de histidina dona un protón al átomo de oxígeno del residuo serina, desestabilizando, provocando la ruptura del enlace éster entre la serina y el intermediario acil-enzima (Jaeger *et al.*, 1999).

Figura 5. Mecanismo de reacción de serina esterasas (Jaeger *et al.*, 1999).



Una de las diferencias de las cutinasas con lipasas es la presencia de una tapa hidrofóbica en la mayoría de las lipasas, la apertura de la tapa al interactuar con una interfase hidrofóbica, es decir, lípido/agua hace el sitio catalítico accesible al sustrato. En algunas otras se forma una cavidad oxianónica; en las cutinasas el residuo catalítico no se encuentra cubierto por la tapa, por lo cual presenta accesibilidad al disolvente por presentar una cavidad formada por lo que no presentan activación interfacial (Castro-Ochoa *et al.*, 2010).

### 2.5.3 Aplicaciones de las cutinasas

Las aplicaciones de las cutinasas son muy diversas, ya que se utilizan en alimentos para la transesterificación de grasas y aceites, en la obtención de aromas por la producción de ésteres de ácidos grasos, así como en detergentes, a los que se han añadido mezclas de enzimas como lipasas, proteasas, amilasas y celulasas para la eliminación de diversas sustancias. También se han empleado en la producción de biodiesel, combustible que ha tomado relevancia en los últimos años como fuente alternativa de energía biodegradable y no tóxico, y que se obtienen al formar alquil ésteres de ácido graso de la reacción de triacilgliceroles en presencia de alcohol. La producción de biodiesel ha sido reportada en enzimas lipolíticas, y se ha reportado la transesterificación con estererasas y cutinasas. Pese a las diversas aplicaciones de éstas solo se han la comercialización es en pequeña escala (De Castro *et al.*, 2017).

### 2.5.4 Microorganismos productores de cutinasas

La producción de cutinasas se descubrió en hongos microscópicos fitopatógenos. Las primeras fueron aisladas de *Fusarium solani pisi*, que han sido las más estudiadas hasta el momento. Posteriormente en polen y en bacterias como *Pseudomonas putida* y *Corynebacterium* sp. (Carvalho *et al.*, 1998). En la tabla 4 se presentan diversos microorganismos que han sido detectados como productores de cutinasas.



Tabla 4. Microorganismos productores de cutinasas

Hongos	Bacteria	Levaduras
<i>Fusarium solani pisi</i>	<i>Streptomyces scabies</i>	<i>Cryptococcus sp.</i>
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Streptomyces acidiscabies</i>	<i>Pseudozyma jejuensis</i>
<i>Fusarium roseum sambucinum</i>	<i>Streptomyces badius</i>	
<i>Ulocladium consortiale</i>	<i>Thermobifida fusca</i>	
<i>Helminthosporium sativum</i>	<i>Thermobifida alba</i>	
<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Thermobifida cellulosilytica</i>	
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	
<i>Monillinia fructiola</i>	<i>Thermonospora fusca</i>	
<i>Alternaria brassiciola</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	
<i>Alternaria alternata</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Pyrenopeziza brassicae</i>	<i>Pseudomonas mendocina</i>	
<i>Botrytis cinerea</i>		
<i>Magnaporthe grisea</i>		
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		
<i>Colletotrichum lagenarium</i>		
<i>Colletotrichum lindemuthlanum</i>		
<i>Cochliobolus heterostrophus</i>		
<i>Rhizoctonia solani</i>		
<i>Penicillium sp.</i>		
<i>Penicillium citrinum</i>		
<i>Venturia inaequalis</i>		
<i>Aspergillus oryzae</i>		
<i>Pseudozyma antarctica</i>		
<i>Thielavia terrestris</i>		
<i>Trichoderma harzianum</i>		
<i>Coprinopsis cinerea</i>		
<i>Humicola insolens</i>		

Modificada de Chen *et al.* 2013 y Castro-Ochoa *et al.*, 2013.

### 2.5.5 Cutinasas y su acción sobre PET

La investigación de las carboxil ester hidrolasas fue cuestionada por la fitopatogenicidad de los organismos productores. En la década de los 70 se aisló la primera cutinasa, proveniente de *Fusarium solani pisi*, la cual ha sido la mejor caracterizada. Los genes de las cutinasas fueron estudiados para determinar si eran necesarios para ocasionar patogenicidad en hongos, sin embargo, al ser eliminados se observó que los hongos aún conservaban virulencia. Si bien las primeras cutinasas han sido aisladas de hongos, también han sido estudiadas de bacterias. Müller *et al.*, en 2005 reportaron la primera hidrolasa que actúa en poliésteres aromáticos, producida por *Thermobifida fusca*. A partir de esta fecha se han reportado diversas enzimas para la hidrólisis de PET (Castro-Ochoa *et al.*, 2013; Castro, 2017; Morales, 2018; Bermúdez-García *et al.*, 2019; Lovera y Torres, 2019).

### 2.5.6 Cutinasas de *Aspergillus nidulans*

El género *Aspergillus* contiene organismos fitopatógenos y saprofitos. El grupo de trabajo ha enfocado sus esfuerzos en *Aspergillus nidulans*, hongo saprofito y ampliamente utilizado en estudios de genética y fisiología fungal. Tiene 8 cromosomas con 10,560 genes, de los cuales 60 codifican para esterasas y de estos se han identificado 4 con actividad de cutinasa. Se describió el papel fisiológico de cada cutinasa en el trabajo de Bermúdez-García (2019). Las cutinasas nativas fueron caracterizadas bioquímicamente, los resultados se muestran en las tablas 5 y 6. Los cuatro genes obtenidos de la cepa *A. nidulans* PW1 (donada por el Instituto de Fisiología Celular, UNAM) se clonaron en su forma madura en *Pichia pastoris* X-33 (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*) utilizando el vector pPICZαB para la expresión. Para la obtención de la cutinasa se incubó la cepa y se utilizó como promotor para la expresión la alcohol oxidasa 1 (AOX1) y como inductor el metanol (Castro-Ochoa *et al.*, 2013).

Tabla 5. Caracterización de ANCUT1 (Solís, 2015)

pH	9					
Temperatura óptima	60 °C					
Iones favorables	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Fe <sup>3+</sup>	Cu <sup>2+</sup>
	Actividad de 130-140%			Actividad de 110-120%		
Peso	29 kDa					
Disolventes al 30 %	DMSO	Metanol	Etanol	Acetona	Isopropanol	Hexano
	Actividad menor al 100%				Actividad de 110%	

Tabla 6. Caracterización de ANCUT2 (Morales, 2015)

pH	7-9					
Temperatura óptima	40 °C					
Iones favorables	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Fe <sup>3+</sup>	Cu <sup>2+</sup>
	Actividad mayor al 100%		Actividad menor al 100%			
Peso	33 kDa					
Disolventes al 30 %	DMSO	Metanol	Etanol	Acetona	Isopropanol	Hexano
	Actividad menor al 100%				Actividad mayor al 100%	

Se analizó su posible acción sobre PET. Inicialmente se determinaron los parámetros a controlar en la reacción de degradación de PET (tabla 7 y 8), los resultados se presentan en la tabla 9 y 10. En la tabla 11 se muestran las reacciones realizadas para la obtención de las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (figura 6), donde se señalan en rojo los cambios obtenidos tras 2, 3 y 4 semanas de degradación.

Tabla 7. Características de degradación ANCUT1, ANCUT2 y ANCUT3

	ANCUT1	ANCUT2	ANCUT3
Degradación de PET	Fracción cristalina	Fracción amorfa	-
Degradación de poliésteres	Poliésteres de cadena corta y media	Poliésteres de cadena corta y larga	Poliésteres de cadena corta
Corte en cutina	<i>Endo</i>	<i>Exo</i>	<i>Exo</i>

(Bermúdez-García *et al.*, 2019, Llanos, 2018).

Tabla 8. Reacción de cutinasa ANCUT1 y ANCUT2 usando como sustrato PET

Pretratamiento mecánico	Molienda Tamiz no. 50 Apertura 297 $\mu\text{m}$ (Morales, 2018)
pH	9
Agitación	Sin agitación /50 rpm (Monter, tesis en proceso)
Temperatura	40 °C (Morales, 2018)

Tabla 9. Reacción de cutinasa ANCUT3 favorecida usando como sustrato PET (Lovera y Torres, 2019)

pH	9
Amortiguador	Tris-HCl 50 mM
Temperatura (°C)	35
Pre tratamiento mecánico	Molienda Tamiz no. 50 Apertura 297 µm
Concentración de proteína (U/mL)	1000
Solución de iones (2:1)	MgSO <sub>4</sub> 1 mM

Tabla 10. Reacción de degradación de PET de 4 semanas (Lovera y Torres, 2019)

Enzima utilizada	Concentración de TPA (ppm)	% de rendimiento de conversión de TPA reportado	Concentración de BHET (ppm)	% de rendimiento de conversión de BHET reportado
ANCUT1	3.5	0.035	ND	ND
ANCUT3	ND	ND	ND	ND
ANCUT1 optimizada	133	1.33	ND	ND
ANCUT3 optimizada	4.5	0.45	ND	ND
Mezcla ANCUT1+ANCUT3	8.5	0.085	11.75	0.117

Se incubó durante 4 semanas a 35 °C con amortiguador Tris-HCl 50 mM, 1000 U/mL de ANCUT3 y ANCUT1. ANCUT1 y ANCUT3 optimizadas se refieren a la obtención de las enzimas en un nuevo medio, condiciones de máxima actividad.

Tabla 11. Reacciones para la obtención de micrografías por microscopía electrónica de barrido

Reacción	Pre-tratamiento de BioPET	Condiciones	Tiempo de reacción
a)	Sin moler	Sin tratamiento	-
b)	Molido		t0
c)	Molido	ANCUT1 40 °C	1 semana
d)	Molido	ANCUT1 40 °C	2 semanas
e)	Molido	ANCUT1 40 °C	3 semanas
f)	Molido	ANCUT1 40 °C	4 semanas
g)	Molido	ANCUT2 40 °C	2 semanas
h)	Molido	ANCUT2 40 °C	4 semanas
i)	Molido	Amortiguador fosfatos pH 7.0 40 °C	4 semanas

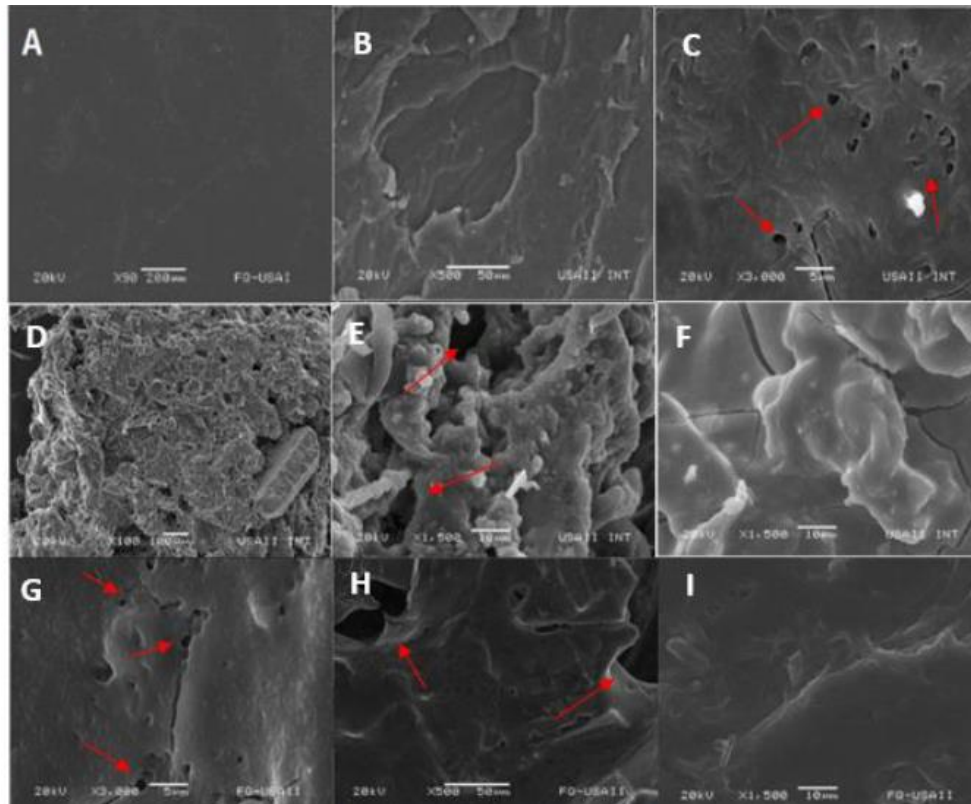


Figura 6. **Micrografías obtenidas de microscopía electrónica de barrido.** Las flechas rojas señalan algunos orificios presuntamente generados por la degradación del polímero. Tomada de Morales, 2018.

Morales (2018), menciona como BioPET al PET donde la materia prima para su realización es obtenida de otras fuentes diferentes al petróleo; reporta la disminución de cristalinidad, evaluado por calorimetría diferencial de barrido, de 63.24 a 50.04% después del tratamiento mecánico y 3.98% después 4 semanas de reacción a 40 °C con ANCUT1; y del 13% después de 4 semanas a 40 °C con ANCUT2.

Las cutinasas de *Aspergillus nidulans* obtenidas mostraron diferentes patrones de degradación de sustrato por lo que en algunos casos se probaron el uso de estas consecutivamente (Lovera y Torres, 2019) y se habla de un posible sinergismo debido a sus características (Morales, 2018; Llanos, 2019).

## 2.6 Líquidos iónicos y eutécticos en reacciones con enzimas

El uso de disolventes orgánicos ha sido un problema para el medio ambiente, ya que sus vapores y sus desechos en distintas reacciones son contaminantes, por lo que en las últimas décadas se han buscado alternativas de disolventes que reduzcan las emisiones y la carga contaminante ambiental. Los líquidos iónicos proveen de una alternativa de uso para diferentes reacciones, entre ellas, algunas en las que se implican enzimas, además de usarse como catalizadores.

Se ha propuesto en diversos trabajos el uso de DES como cosolvente (por encima del 25%) con agua, ayudando a los sustratos no polares a disolverse o reduciendo la actividad de agua; como disolvente, reemplazando disolventes orgánicos, teniendo ventajas sobre estos al no desnaturalizar las enzimas al usar disolventes con polaridad similar (de María *et al.*, 2011; Gorke *et al.*, 2010).

En Miranda-Molina *et al.* (2019) mencionan 12 disolventes eutécticos a base de cloruro de colina, donde se prueba la actividad de una  $\alpha$ -amilasa proveniente de *Thermotoga marítima* utilizando diferentes concentraciones de disolventes eutécticos y agua que va del 0 al 100% (v/v), esto debido a la alta viscosidad del disolvente y así aumentar su disponibilidad para las enzimas, mostrando que solventes como ChCl:U (1:2), ChCl:E (1:2) y ChCl:G (1:3) tienen actividad residual después de 4 horas con hasta un 75 % de disolvente eutéctico.

Erbeldinger *et al.* (2000) presentaron la primera catálisis para la obtención de Z-aspartame catalizada por una termolisina, en presencia de 1-butil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato (BP6).

En 2015, Cvjetko *et al.* con una lipasa proveniente de *Candida antarctica* observaron la síntesis de butil acetato con diferentes líquidos iónicos y eutécticos provenientes de las mezclas de colina, sugiriendo que los líquidos eutécticos son fuertes candidatos para la biocatálisis verde.

En 2019, Al Achkar, Fourmentin y Greige-Gerges señalan un listado de mezclas eutécticas a base de cloruro de colina donde se demuestra la actividad enzimática; en otros, se indica una mejoría en la interacción entre enzima y sustrato, comparado con disolventes orgánicos y



amortiguadores. El efecto de las mezclas eutécticas es atribuido a las sales de componentes iniciales de las mismas y, en menor proporción, al donador de hidrógeno.

### **3 Justificación**

Las cutinasas obtenidas por el equipo de trabajo han mostrado una capacidad de degradación de PET. Se ha observado que la modificación del medio de reacción, como la adición de NaCl, así como de las condiciones de esta mejora los tiempos de degradación de PET obteniendo los mismos resultados en menor tiempo.

Se espera que la adición de mezclas eutécticas, como alternativa al uso de medio acuoso, permita la mejora de la actividad de las cutinasas en la catálisis de la degradación de PET ya que se afectarán las interacciones enzima-PET mejorando su contacto y por lo tanto el rendimiento de monómeros u oligómeros. Además de que se ha demostrado la degradación de PET en estas mezclas. Este proceso es amigable ambientalmente. La posible sinergia de las enzimas producidas por *Aspergillus nidulans*, que han mostrado diferentes propiedades, puede generar un mejor rendimiento en la obtención de ácido tereftálico, el monómero de mayor valor económico.

### **4 Hipótesis**

La sinergia de líquidos eutécticos con cutinasas mejorará la degradación de PET, logrando mejores rendimientos en la degradación del polímero y la obtención de ácido tereftálico.

## 5 Objetivo general

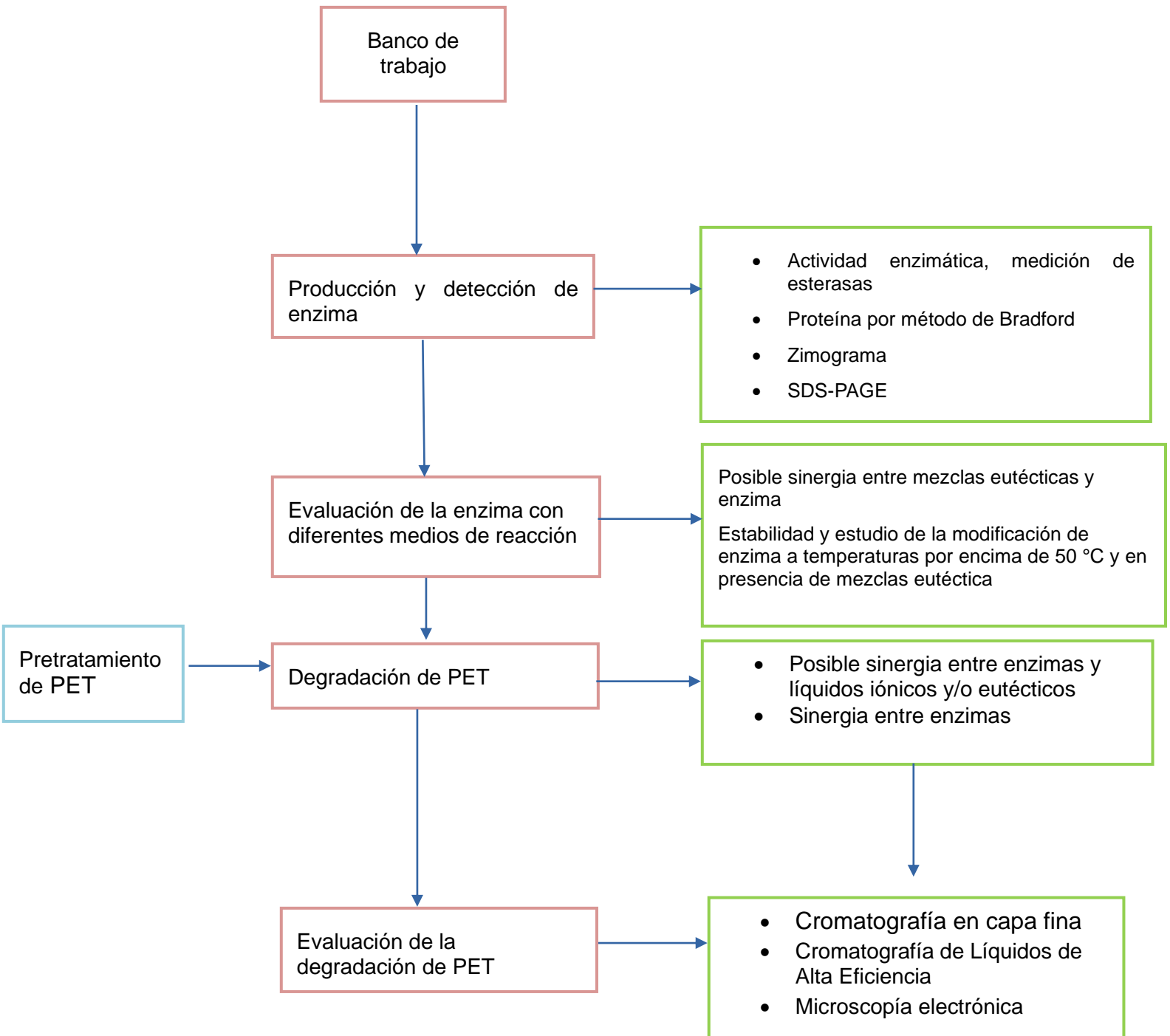
Determinar si el empleo de mezclas eutécticas actúa en forma sinérgica con el uso de las cutinasas ANCUT1, 2 y 3, y contribuye a incrementar el rendimiento de el o los productos de hidrólisis de PET.

### 5.1 Objetivos particulares

- Determinar si existen diferencias entre la estabilidad de las enzimas ANCUT1, ANCUT2 y ANCUT3 a temperaturas superiores a los 50 °C en presencia de amortiguador o de mezclas eutécticas.
- Analizar la posible sinergia entre mezclas eutécticas a base de cloruro de colina y/o etilenglicol con cutinasas en la degradación de PET, específicamente en el rendimiento de TPA.
- Examinar la sinergia entre las enzimas ANCUT1/ANCUT2, ANCUT2/ANCUT3, y ANCUT1/ANCUT3 para la degradación de PET.

## 6 Metodología

### 6.1 Diagrama de flujo experimental



## 6.2 Reactivos utilizados

- Alcohol etílico, Baker
- Acetona, Baker, 99.5 %
- Acetonitrilo, Baker, 99.9 %
- Ácido tereftálico, Sigma-Aldrich, 95%
- Acrilamida, BioRad
- Azul comasie g-250, BioRad
- Bis acrilamida, BioRad
- Bis-hidroxi etilen tereftalato, Sigma-Aldrich, 95 %
- Cloroformo, Baker, 99.8%
- Dextrosa, Baker
- Dimetil tereftalato, Sigma-Aldrich, 95 %
- Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich, 99.9 %
- Éter etílico, Sigma-Aldrich, 99.0 %
- Etilenglicol, Baker
- Extracto de levadura, Difco
- Fast red TR, Sigma-Aldrich
- Fosfato de sodio dibásico, Baker, 99.3 %
- Fosfato de sodio monobásico, Baker, 99.3%
- Glicerol, Baker, 99.8%
- Glucosa, Sigma-Aldrich
- Metanol, Baker, 99.9 %
- Peptona, Oxoid
- *p*-nitrofenilbutirato, Sigma-Aldrich, 98%
- Reactivo Bradford, BioRad
- SDS, BioRad
- Tetracloruro de carbono, Sigma-Aldrich, 99.5 %

- Tris base, BioRad
- Triton X100, Sigma-Aldrich
- Urea, Sigma-Aldrich
- YNB, Difco
- $\alpha$ -naftil acetato, Sigma-Aldrich, 98%
- $\beta$ -mercaptoetanol, BioRad

### 6.3 Banco de trabajo

Se inocularon en medio YPD (dextrosa 2%, peptona 2%, extracto de levadura 1%) 100  $\mu$ L de *Pichia pastoris* recombinante preservada a -70 °C. Con el fin de reactivarla cepa se incubó 24 h a 29 °C, 300 rpm. Al final del cultivo, se centrifugó a 7500 rpm por 10 min, el *pellet* se resuspendió en 5 mL de medio YPD-glicerol al 15%, se repartieron 100  $\mu$ L en tubos de 0.6 mL y se ultracongelaron a -70 °C.

### 6.4 Producción de cutinasas

Se diluyó para poder obtener  $DO_{600nm} = 1$  y posteriormente se inculó en medio BMGY (extracto de levadura 1%, peptona 2%, amortiguador de fosfatos 100 mM pH=6 1%, solución YNB 10X 10%, solución de biotina 500X) a 29 °C por 24 h a 300 rpm. Se centrifugó a 7500 rpm por 10 minutos, se desechó el sobrenadante, el *pellet* se resuspendió en medio YP para medir densidad óptica.

### 6.5 Inducción de enzimas

Se inoculó  $DO_{600nm} = 1$  en medio BMMY (Medio YP 70%, amortiguador de fosfatos 100mM pH=6 10%, solución YNB 10X 10%, solución biotina 500X 50 $\mu$ L) con el correspondiente porcentaje de metanol (ANCUT1: 3%, ANCUT2: 2% y ANCUT3: 0.5%) como inductor, cada 24 horas se agregó el porcentaje correspondiente de metanol. Después 48 horas se centrifugó 10 minutos a 7500 rpm y se desechó el *pellet*.

### 6.6 Caracterización de las enzimas

#### 6.6.1 Medición de actividad enzimática

Se midió actividad esterasa por 10 min a 420 nm utilizando un espectrofotómetro Biotek Epoch utilizando 170  $\mu$ L de amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9, 10  $\mu$ L de muestra y 20  $\mu$ L de *p*-nitrofenil butirato 1mmol como sustrato; utilizando un blanco de reacción para observar la autohidrólisis del sustrato. Se utilizó como coeficiente de extinción molar 0.00409  $Lmol^{-1}cm^{-1}$

Una unidad de actividad es definida como la cantidad de enzima requerida para convertir una unidad de  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitrofenil butirato (*p*-NFB) a *p*-nitrofenol por minuto.

#### 6.6.2 Medición de proteína por método de Bradford

Se midió la concentración de proteína a 595 nm utilizando el espectrómetro Biotek Epoch utilizando 160  $\mu\text{L}$  de muestra y 40  $\mu\text{L}$  de reactivo Bradford, realizando la medición con un blanco de amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9.

#### 6.6.3 Preparación de gel SDS-PAGE

Se preparó un gel de concentrador de acrilamida al 4% y separador al 12%, las muestras se cargaron en el pozo y el gel se corrió a 120V hasta el corrimiento del frente. Se utilizó como marcador molecular Low Range BioRad TM 6X (3  $\mu\text{L}$ ) en el gel.

#### 6.6.4 Determinación de perfil de proteínas

Una vez terminada la electroforesis se limpió el gel con amortiguador fosfatos 50 mM pH 7 y se dejó tiñendo toda la noche en solución azul de Coomasie en agitación. Se destiñó con solución desteñidora, y se escaneó con el programa Image Lab 6.0.1

#### 6.6.5 Determinación de actividad por medio de Zimograma

Una vez terminada la electroforesis, el gel de acrilamida se enjuagó con amortiguador fosfatos 50 mM pH 7, se renaturalizó con TritonX100 al 0.5 % por 45 min, se enjuagó con amortiguador fosfatos 50 mM pH 7, se prepararon 25 mL de solución de amortiguador fosfatos pH 7 con 4 mg de  $\alpha$ -naftil acetato (Sigma™) por 30 min, se enjuaga con amortiguador fosfato pH 7, se prepararon 25 mL de solución amortiguador fosfatos pH 7 con 50  $\mu\text{L}$  de TritonX100 más 10 mg de Fast Red hasta la aparición de bandas. Se escaneó con el programa Image Lab 6.0.1.

#### 6.7 Estabilidad térmica.

Se evaluó la actividad volumétrica tras incubar la enzima a diferentes temperaturas, en un rango de 50–65 °C, utilizando amortiguador Tris-HCl 50 mM a pH 9. Se colocó en un microtubo 1 mL con concentración 1:20 de enzima y se incubó en termoblock, para asegurar la temperatura dentro del microtubo. Se realizaron mediciones de actividad enzimática, tomando una alícuota del tubo incubado, que se atemperó a 25°C, y se usó como sustrato el

*p*-NFB. La reacción se realizó por triplicado y se monitoreó durante 10 minutos, tomando lectura cada minuto en el espectrofotómetro Epoch (Biotek) a 420 nm. Se realizó un blanco sin enzima.

#### 6.8. Preparación de mezclas eutécticas

##### Etilenglicol (n(urea)/n(ZnCl<sub>2</sub>))

Se mezcla n(urea)/n(ZnCl<sub>2</sub>) en proporción molar 4:1, 0.25 g para 20 g de etilenglicol con agitación constante a temperatura 70-100 °C de 2 a 6 horas hasta obtener un líquido translúcido y homogéneo (Wang *et al.*, 2015).

#### 6.9 Mezclas con cloruro de colina

Las siguientes mezclas tienen un procedimiento de preparación similar por lo que se describe en uno solo: cloruro de colina: urea: agua (1:2:10), cloruro de colina: etilenglicol: agua (1:2:10), cloruro de colina: glicerol: agua (1:3:10).

Se mezclan los componentes al vacío con agitación constante a una temperatura de 70-100 °C. Hasta obtener un líquido translúcido y homogéneo (Miranda-Molina *et al.*, 2019).

#### 6.10 Determinación de la actividad de las cutinasas en diversas concentraciones de DES a diferentes temperaturas.

Se incubaron ANCUT1, ANCUT2 y ANCUT3 a 50 y 55 °C en estático a diferentes porcentajes de DES, 20, 40, 60 y 100 %, los DES utilizados fueron cloruro colina: glicerol: agua (ChCl:G:H<sub>2</sub>O), cloruro de colina: etilenglicol: agua (ChCl:E:H<sub>2</sub>O) y cloruro de colina: urea: agua (ChCl:U:H<sub>2</sub>O). Los porcentajes de 20-60 (Huang *et al.*, 2013) se realizó medición por triplicado y se siguió durante 10 minutos, tomando lectura cada minuto en el espectrofotómetro Epoch (Biotek) a 420 nm, utilizando como sustrato *p*NFB; para 100 % de DES se realizó un zimograma (utilizando la metodología mencionada anteriormente).



## 6.11 Evaluación de degradación de PET

### 6.11.1 Cromatografía en capa fina

Las muestras obtenidas de las reacciones con PET se mezclaron 1:1 con cloroformo para la identificación de los estándares de BHET, y con dimetilsulfóxido 1:1 (en baño María) para el estudio de TPA. Se mezcló la muestra de reacción con los disolventes antes mencionados y se conserva la parte orgánica, que se coloca en una cromatoplaaca de silica gel en aluminio con ayuda de un capilar de vidrio.

Las muestras obtenidas de las reacciones se mezclaron con el 20% de ácido tricloroacético, se homogenizaron y se colocaron en una cromatoplaaca de silica gel en aluminio para lograr observar la degradación mediante una lampara de UV.

Se eluyeron con una fase móvil de cloroformo: éter etílico (9:1) para oligómeros cíclicos y diclorometano: cloroformo: tetracloruro de carbono: acetona (3:9:1:1) para oligómeros lineales (no ramificados) (Morales, 2018). Para la detección de manchas se utilizó una lámpara UV a 254 nm.

### 6.11.2 Cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC)

En la degradación de PET se produce la liberación de TPA, BHET y DMT, por lo que para identificarlos se preparó un estándar (Lovera y Torres, 2019). La detección se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplado con detector de arreglo de diodos (HPLC, Infiity 1260 de Agilent), con columna Chromolith RP-18e, 50-4.6 mm, de Phenomenex + precolumna; SecurityGuard, PN; KJ0-4282 de Penomenex fase móvil agua:acetonitrilo (4:6) flujo:0.1 mL/min DAD a 244nm.

Al término de la reacción, los sobrenadantes se trataron con una solución de acetato de amonio para precipitar la proteína. Se agitaron en el Vortex, hasta obtener una mezcla homogénea, se congelaron a -20 °C por una noche, se centrifugaron durante 10 min a 7500 rpm y se desechó el *pellet* formado. Se añadió DMSO:Agua a las mezclas de lavado para solubilizar los productos de degradación obtenidos.

La evaluación se llevó a cabo en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y de la industria (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM.

### 6.11.3 Rayos X

El cambio de cristalinidad de PET se observó mediante difracción de rayos X de polvos (XRD) usando un Difractómetro de Rayos X, Modelo D8 Advance Davinvm Configuración Theta-Theta -Theta Marca Bruker AXS. El PET sin tratamiento y molido a un tamaño de partícula de malla 30 se usó como control negativo. La evaluación de los blancos se realizó con PET sin tratamiento enzimático con amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9 y con las mezclas G:ChCl:H<sub>2</sub>O y U:ChCl:H<sub>2</sub>O.

La determinación se llevó a cabo en la USAII de la Facultad de Química de la UNAM.

### 6.11.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se utilizó 50 mg para el análisis morfológico de las muestras usando microscopía electrónica de barrido. A la parte sólida de la reacción se le realizaron lavados con etanol, que consistían en agregar 1 mL de etanol y agitar en Vortex (SI-0236) para posteriormente retirar el etanol y dejar secar la muestra sólida a 50 °C hasta por 1 semana.

La evaluación se llevó a cabo en la USAII de la Facultad de Química de la UNAM, utilizando microscopio JEOL JSM-59001LV. Las muestras se cubrieron con partículas de oro nanométricas con el fin de mejorar la imagen, a alto vacío y con un voltaje de aceleración de 10kV.

La evaluación se llevó a cabo en la USAII de la Facultad de Química de la UNAM.

## 7 Resultados y discusión

La primera parte del trabajo consistió en caracterizar las enzimas obtenidas de las tres clonas a estudiar (ANCUT1, ANCUT2 y ANCUT3), tanto para comprobar que conservaran las características previamente reportadas como para determinar la estabilidad térmica, en virtud que es un parámetro crítico en el diseño del proceso de degradación de PET, cuya temperatura de transición vítrea es de aproximadamente 80 °C, y de 60-65 °C en solución. El PET logra absorber entre el 0.1-1.0 % de agua lo que se ve reflejado en puentes de hidrógeno débiles y mayor flexibilidad, logrando que sea más accesible para las enzimas (Kawai *et al.*, 2014).

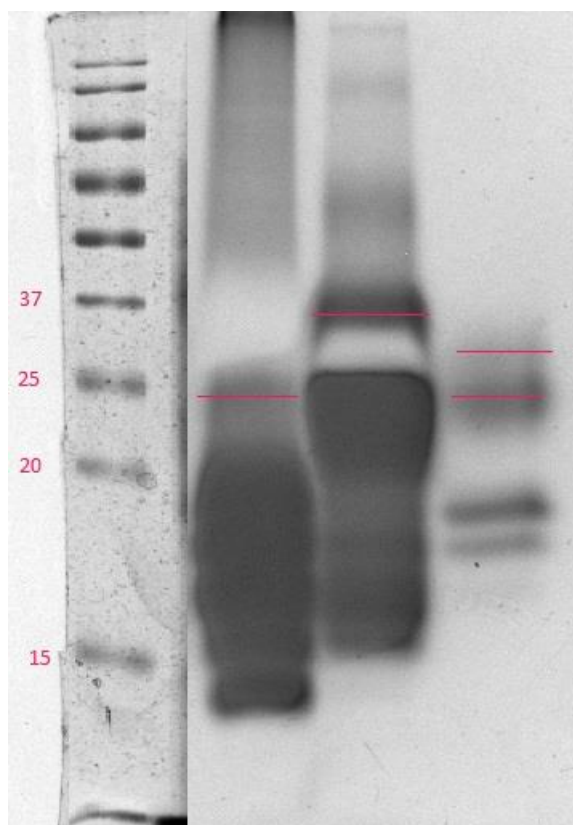
### 7.1 Caracterización de las enzimas

Se realizó la caracterización de las enzimas obtenidas por fermentación y los resultados se presentan en la tabla 12. Coinciden con los obtenidos anteriormente en el equipo de trabajo.

Tabla 12. Actividad de las enzimas AN CUT1, AN CUT2 y AN CUT3 con uso de *p*-nitro fenilbutirato.

	Actividad volumétrica (U/mL)	Concentración de proteína (mg/mL)	Actividad específica (U/mg)
ANCUT1	3399 ± 245	0.1971 ± 0.0003	15346 ± 40
ANCUT2	6775 ± 1814	0.0774 ± 0.0002	59000 ± 2116
ANCUT3	225 ± 58	0.0539 ± 0.0003	1891 ± 64

Posteriormente, se verificó el peso molecular de las mismas mediante zimograma (figura 7). Los pesos moleculares son coincidentes con trabajos anteriores (Morales, 2019; Llanos, 2018) y corresponden a los esperados según la secuencia genética y proteica reportadas. Las bandas por debajo de estos pesos pueden deberse a posible degradación de enzima.



Marcador ANCUT1 ANCUT2 ANCUT3

Figura 7. **Actividad de las cutinasas en zimograma.** Se utilizó  $\alpha$ -naftil acetato como sustrato, revelado con FastRed. Carril 1. Marcador de peso en SDS-PAGE (BioRad) teñido con azul de metileno. Carril 2: ANCUT1 con un peso de 24.8 kDa; carril 3; ANCUT2 con un peso de 33 kDa y carril 4: ANCUT3 con un peso de 29 kDa. El gel SDS-PAGE se tiñó con Fast Red para revelar las bandas proteicas con actividad esterase.

En virtud de la importancia de la temperatura en la degradación de PET, se llevó a cabo la determinación de la estabilidad térmica de las enzimas determinando la actividad residual tras incubación a diferentes temperaturas, cercanas a la temperatura de transición vítrea de PET (figura 8).

Las determinaciones fueron espectro fotométricas y se utilizó *p*-NFB como sustrato y se incubaron en amortiguador Tris HCl 50 mM pH9. El comportamiento ante la temperatura fue diferente para cada una de las cutinasas en estudio.

Cuando la enzima ANCUT1 se incubaba a 50 °C, la actividad relativa tiene un aumento entre 48 y 150 h, y tras lo cual disminuye. A temperaturas por encima de 50 °C la actividad se ve

disminuida en un porcentaje menor al 50 % después de 24 horas de incubación. El comportamiento difiere para la enzima ANCUT2, ya que, a 50 °C, después de 24 h, ha perdido el 35% de su actividad, y a temperaturas superiores (55, 60 y 65 °C), después de 48 h de incubación, pierde el 90%.

La ANCUT3, después de 48 h de incubación, a las 4 temperaturas probadas pierde el 82% de su actividad y se mantiene en promedio con este porcentaje durante las siguientes horas. Por lo tanto, si se utiliza como disolvente amortiguador Tris HCl 50 mM pH 9 se propone utilizar 50 °C y 24 h, para llevar a cabo la reacción, debido a la disminución de la actividad después de este tiempo y a temperaturas mayores.

Los resultados indican que la enzima ANCUT1 parece ser la que resiste mejor un tratamiento a temperaturas altas, pero ninguna retiene alta actividad en el rango de la temperatura de transición vítrea del PET.

## 7.2 Actividad residual relativa térmica de ANCUT1, ANCUT2 y ANCUT3 tras incubación a diferentes temperaturas.

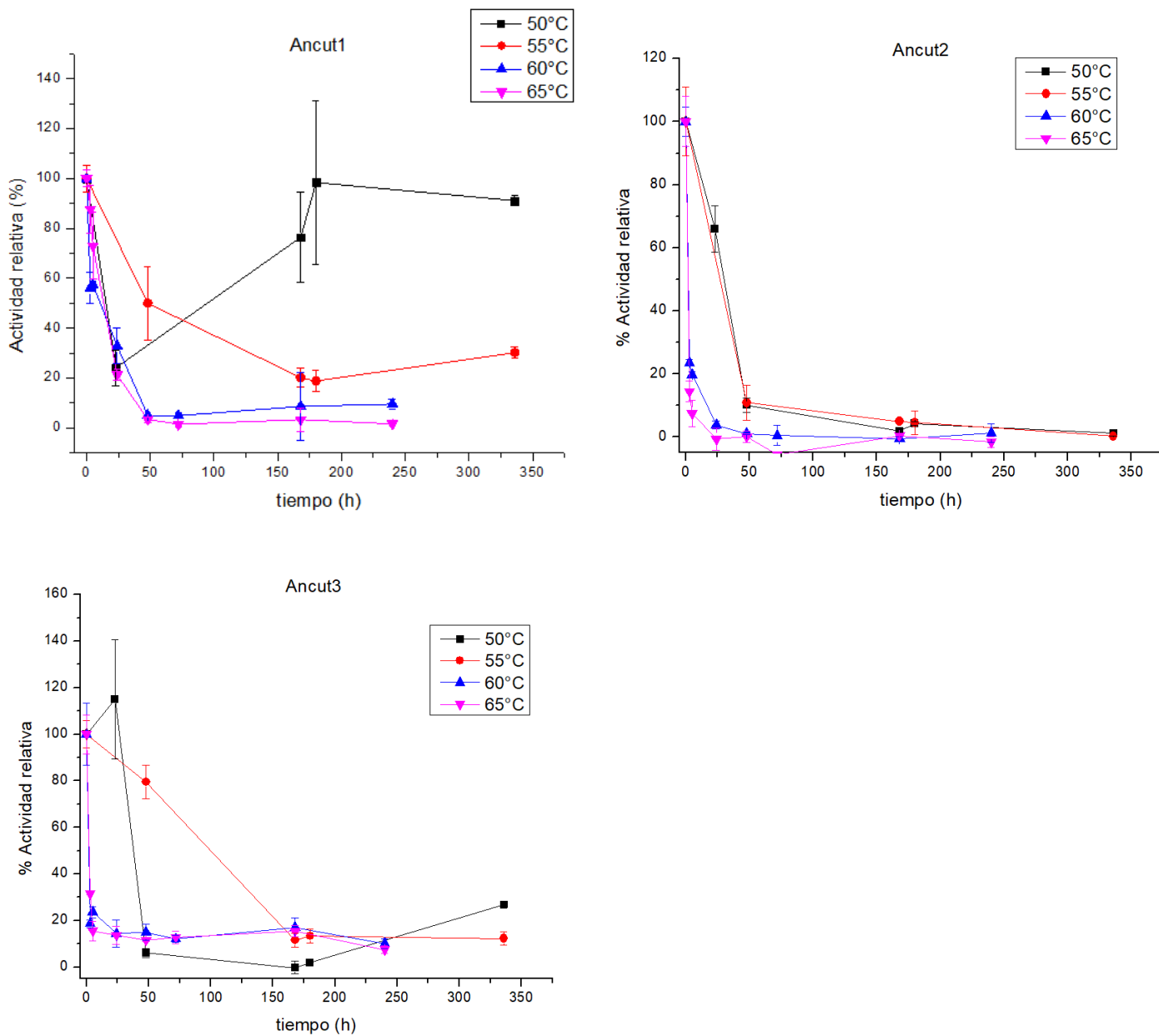
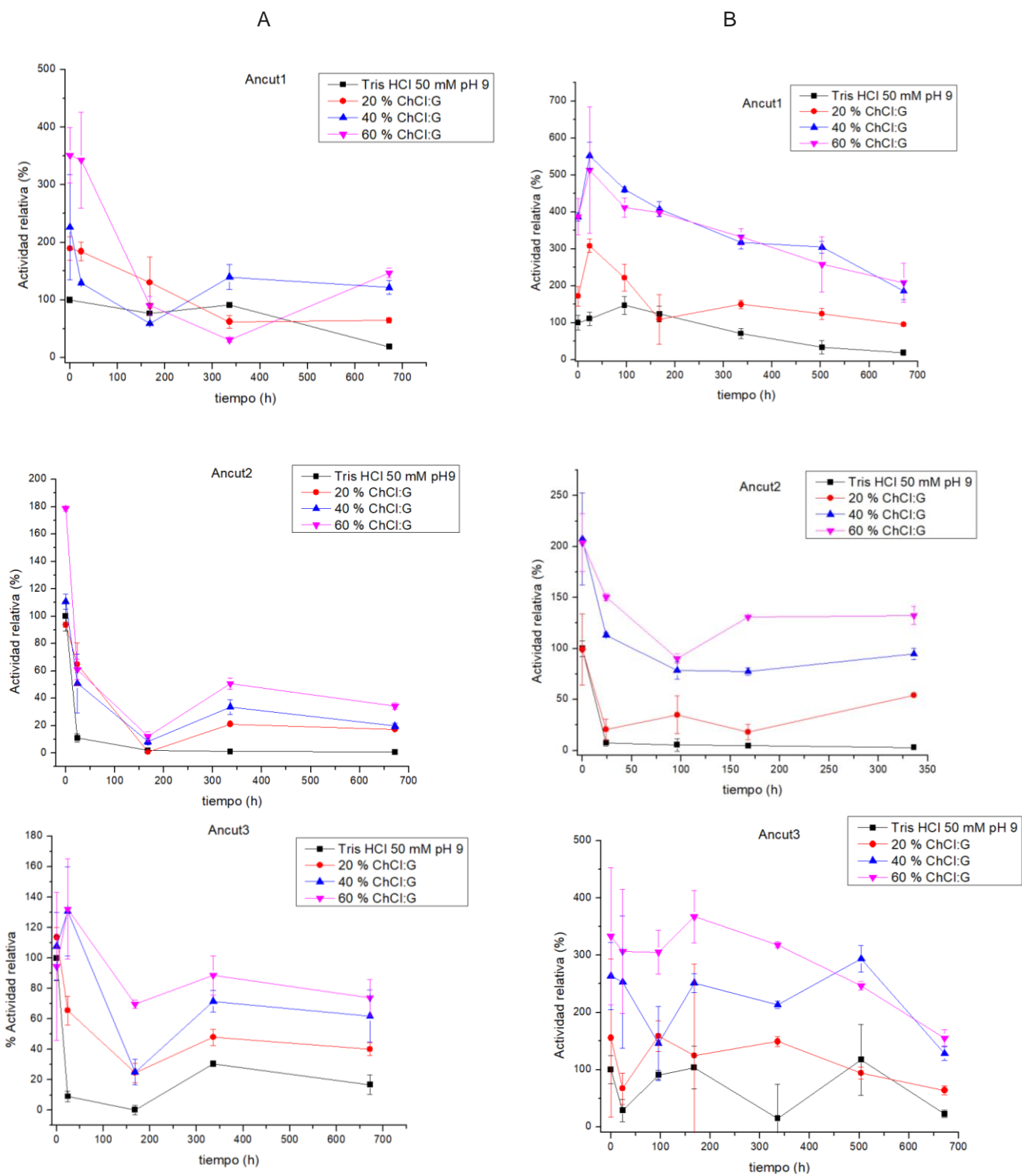


Figura 8. Actividad residual relativa de ANCUT1, ANCUT2 y ANCUT3 a 50, 55, 60 y 65°C respecto al tiempo (250-350 h) de incubación a 50, 55, 60 y 65 °C en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9 utilizando *p*-NFB como sustrato para la medición.

El uso de disolventes eutécticos se ha visto como una nueva posibilidad en la aplicación con enzimas debido a que permite interacciones moleculares del tipo electrostática, van der Waals, puentes de hidrógeno y uniones  $\pi$  (Sanchez-Fernandez y Jackson, 2021) ofreciendo a las enzimas posibilidad de termo estabilidad y crio-protección.

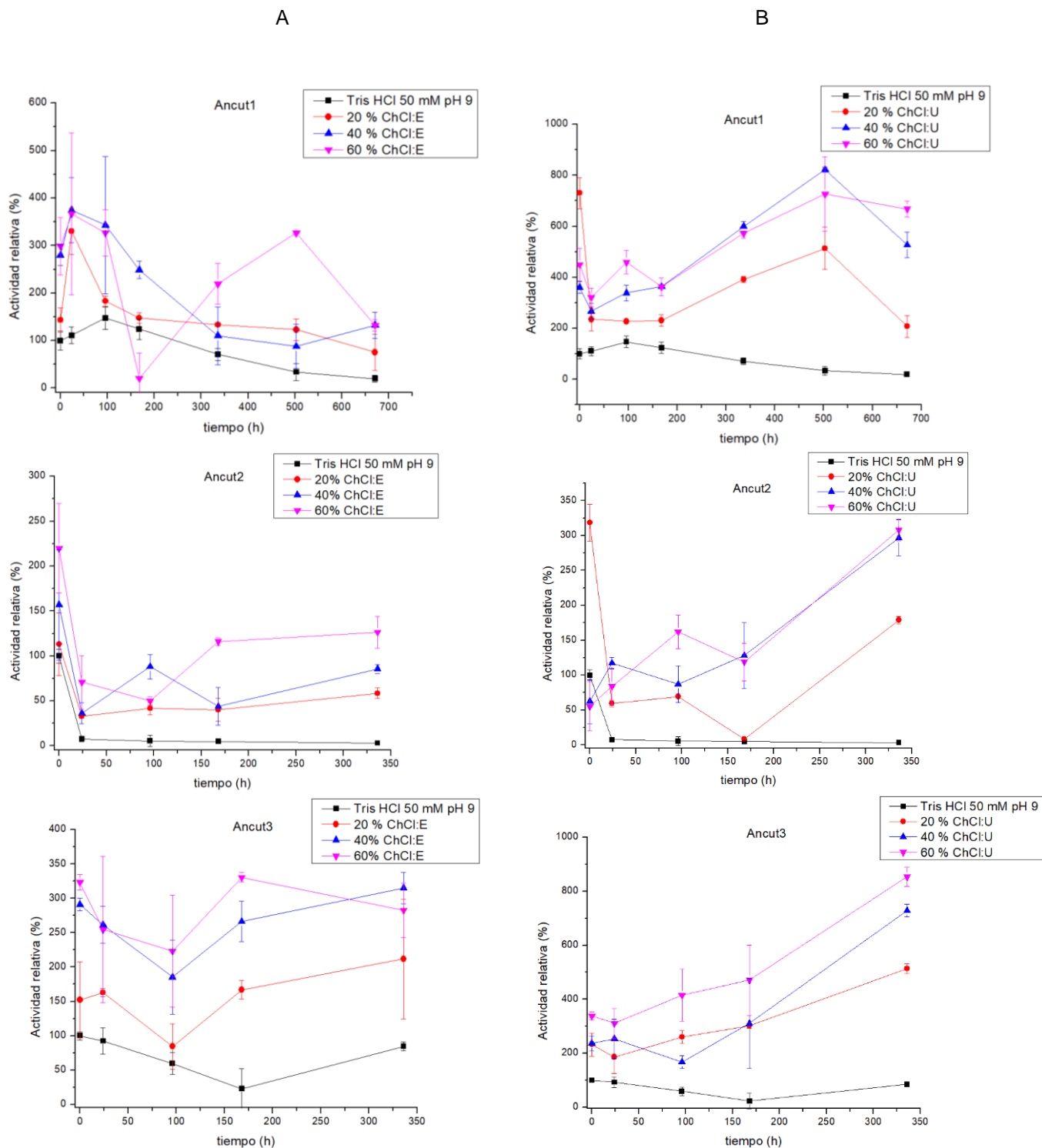
Los DES seleccionados para este trabajo fueron del tipo III, que consisten en una sal cuaternaria de amonio y un compuesto orgánico. La sal seleccionada fue el cloruro de colina (ChCl) y los compuestos orgánicos fueron etilenglicol, glicol y urea. Estos fueron seleccionados tomando como referencia que han sido utilizados en diversas investigaciones en diversas enzimas con esterasas y lipasas, donde se observó que conservan su actividad y obtenían resultados favorables, además de ser baratos y fáciles de obtener (Arikaya *et al.*, 2019; Nian *et al.*, 2019; Hae y Verpoorte, 2019)

Se utilizaron diferentes proporciones de disolventes eutécticos como se reporta en Arikaya *et al.*, 2019 y Choi *et al.*, 2011 y se procedió a evaluar el mismo parámetro en presencia de diferentes porcentajes de DES, como se muestra a continuación en las figuras 9 y 10.



**Figura 9. Actividad residual relativa de ANCUT1, ANCUT2 y ANCUT3 en presencia de diferentes porcentajes de DES (ChCl:G:H<sub>2</sub>O) a 50 °C (A) y 55 °C (B).**





**Figura 10. Actividad residual relativa de ANCUT1, ANCUT2 y ANCUT3 con diferentes porcentajes de DES (ChCl:E:H<sub>2</sub>O) a 55 °C (A) y (ChCl:U:H<sub>2</sub>O) a 55 °C (B).**

Se observó que el aumento de actividad relativa es directamente proporcional al aumento del porcentaje de mezcla eutéctica en la disolución. En todos los casos la actividad relativa es mayor en presencia de DES que cuando sólo se utiliza amortiguador. Esto coincide con lo presentado en Sanchez-Fernandez y Jackson (2021), quienes mencionan que una de las características sobresalientes del uso de mezclas eutécticas con enzimas es la protección térmica y la crio protección de estas, por lo que es de esperarse que la actividad relativa después de la incubación sea mayor cuando tiene cantidades mayores de la mezcla que cuando tiene un porcentaje mayor de agua o del amortiguador.

Existe un efecto debido a la naturaleza de la mezcla eutéctica sobre la enzima, ya que, la que contiene urea es la que presenta un aumento de actividad relativa para las tres enzimas. Esto se puede justificar con lo mencionado en Hammond, Bowron y Edler en 2017, quienes señalan que las interacciones de las mezclas eutécticas al aumentar el porcentaje de agua se muestran más débiles, debido a que el agua contribuye a la nanoestructura de red de la mezcla eutéctica por lo cual las propiedades fisicoquímicas de la misma se pueden ver modificadas. Sin embargo, en el caso de la interacción de hidrógeno colina/urea ( $\text{OH}\cdots\text{NH}_2$ ) la interacción molecular es mucho más fuerte, lo que respondería al efecto que existe en la interacción de la enzima con el DES preparado con urea y los preparados con otro componente orgánico.

Esquemre *et al.* (2013) realizaron dicroísmo circular a una lisozima en 1:2 cloruro de colina: urea, 1:2 cloruro de colina:glicerol y en medio acuoso, donde encontraron una estructura terciaria similar. Mencionan como posible incremento de la termoestabilidad debido a los grupos hidroxilo contenidos los alquilamonio (como lo es el cloruro de colina) debido a la unión extra entre los enlaces de hidrógeno y el sitio aceptor, lo que reduce las interacciones hidrófobas con la proteína, lo que se traduce como el incremento de la estabilidad física y termoestabilidad de la proteína. Hammond, Bowron y Edler (2017) usando modelado molecular sobre las interacciones de *Candida albicans* B (CALB) en 1:2 cloruro de colina:urea, mostraron que la estructura secundaria es preservada y fuertemente asociada al disolvente, inhibiendo las interacciones con residuos de aminoácidos y evitando la desnaturalización de la proteína. Los resultados obtenidos en este proyecto indican que estas mezclas eutécticas pueden ser adecuadas para cutinasas, promoviendo su termoestabilidad al presentar

interacciones similares a la CALB y coinciden con lo reportado en Tan *et al.* (2021) el único estudio donde se reporta el uso de disolventes eutécticos como cosolvente para incrementar la actividad y estabilidad térmicamente de una cutinasa de *Amycolatopsis mediterranei*.

### 7.3 Medición cualitativa de actividad enzimática de las cutinasas con zimograma

Debido a la viscosidad que presenta el medio si se emplea solo la mezcla eutéctica como medio, la determinación espectrofotométrica de la actividad volumétrica y específica, no mostraba ser una buena opción para esta medición, por lo que se optó por realizar un zimograma para comprobar si las ANCUT1, ANCUT2 y ANCUT3 eran activas.

Se incubaron a 50 °C por 96 h en estático ANCUT1 y ANCUT3 con diferentes mezclas eutécticas. Para la cutinasa ANCUT1 se probaron dos diluciones, 1:10 y 1:20 mientras que para ANCUT3 se probó la dilución 1:10, debido a que se observó que para poder observar la actividad se requería una muestra más concentrada. Las mezclas eutécticas utilizadas fueron ChCl: urea: agua, ChCl: etilenglicol: agua, ChCl: glicerol: agua. Como ya se mencionó anteriormente estas mezclas son fáciles de producir, son económicas y han mostrado propiedades termoprotectoras de modo que pueden sustituir disolventes orgánicos o acuosos. Por lo tanto, se comprueba que las cutinasas ANCUT1 y ANCUT3 son activas en las mezclas eutécticas utilizadas como se muestra en la figura 9.

En la figura 11 y 12 se muestra Incubación en estático por 96 h a 55° de ANCUT1, ANCUT2 y ANCUT3, teniendo actividad para ANCUT1 y ANCUT2 ChCl:U:H<sub>2</sub>O como solvente.

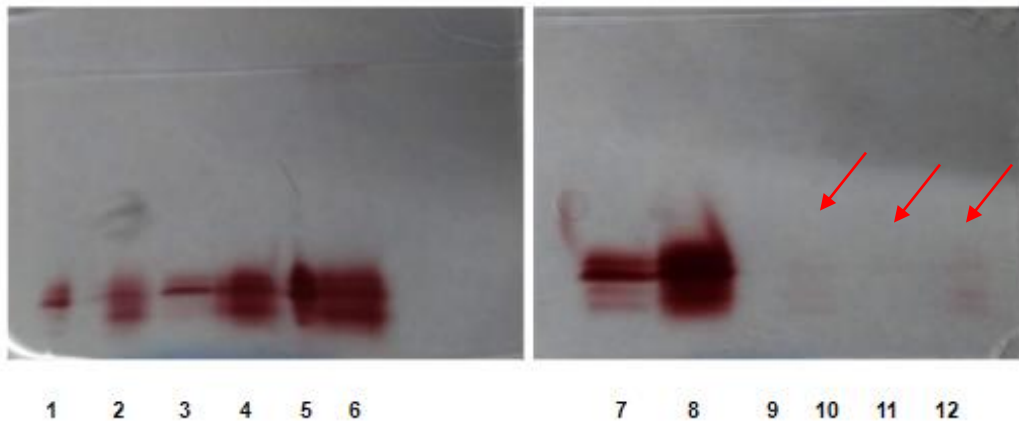


Figura 11. Actividad de las cutinasas ANCUT1 y ANCUT3 con diferentes mezclas eutécticas evaluada en zimogramas utilizando con  $\alpha$ -naftil acetato como sustrato, revelado con FastRed. Las diferentes preparaciones se incubaron en estático por 96 h a 50°C. **1** ANCUT1, dilución 1:20, amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9; **2** ANCUT1, dilución 1:20, ChCl:E:H<sub>2</sub>O; **3** ANCUT1, dilución 1:20, ChCl:U:H<sub>2</sub>O; **4** ANCUT1, dilución 1:20, ChCl:G:H<sub>2</sub>O; **5** ANCUT1, dilución 1:10, amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9; **6** ANCUT1, dilución 1:10, ChCl:E:H<sub>2</sub>O; **7** ANCUT1, dilución 1:10, ChCl:U:H<sub>2</sub>O; **8** ANCUT1, dilución 1:10, ChCl:G:H<sub>2</sub>O; **9** ANCUT3, dilución 1:10, amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9; **10** ANCUT3, dilución 1:10, ChCl:E:H<sub>2</sub>O; **11** ANCUT3, dilución 1:10, U:ChCl:H<sub>2</sub>O; **12** ANCUT3, dilución 1:10, G:ChCl:H<sub>2</sub>O.

### 7.3.1 Medición cualitativa de actividad enzimática en la cutinasa ANCUT1, ANCUT2 y ANCUT3 por zimografía.

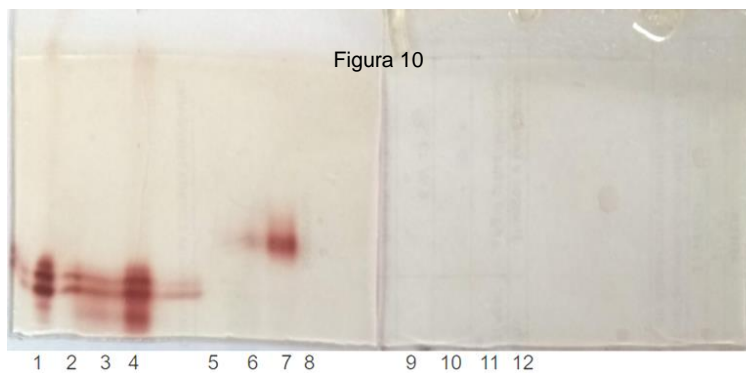


Figura 12. Medición cualitativa de actividad enzimática sobre  $\alpha$ -naftil acetato como sustrato en las diferentes cutinasas, revelado con FastRed. ANCUT1, ANCUT2 y ACUT3 por zimografía. Las muestras se incubaron en estático por 96 horas a 55°C, **1** ANCUT1, dilución 1:20, amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9; **2** ANCUT1, dilución 1:20, ChCl:E:H<sub>2</sub>O; **3** ANCUT1, dilución 1:20, ChCl:G:H<sub>2</sub>O; **4** ANCUT1, dilución 1:20, ChCl:U:H<sub>2</sub>O; **5** ANCUT2, dilución 1:10, amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9; **6** ANCUT2, dilución 1:10, ChCl:E:H<sub>2</sub>O; **7** ANCUT2, dilución 1:10, ChCl:G:H<sub>2</sub>O; **8** ANCUT2, dilución 1:20, ChCl:U:H<sub>2</sub>O; **9** ANCUT3, dilución 1:10, amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9; **10** ANCUT3, dilución 1:10, ChCl:G:H<sub>2</sub>O; **11** ANCUT3, dilución 1:10, ChCl:E:H<sub>2</sub>O; **12** ANCUT3, dilución 1:10, ChCl:U:H<sub>2</sub>O.

Sin embargo, para la cutinasa ANCUT3, la observación de bandas en el zimograma es casi imperceptible con amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9 después de 96 h a 55 °C, debido a que la actividad catalítica de la cutinasa disminuyó casi en su totalidad. Para la cutinasa y la mezcla eutéctica se observan bandas más definidas, lo que indica que la cutinasa tiene actividad enzimática al cambiar de amortiguador a mezcla eutéctica (ChCl:E:H<sub>2</sub>O, ChCl:G:H<sub>2</sub>O y ChCl:U:H<sub>2</sub>O).

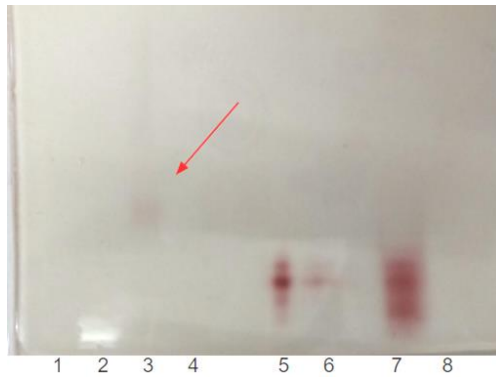


Figura 13. **Actividad de las cutinasas ANCUT1 y ANCUT3 con diferentes mezclas eutécticas determinada por zimograma con  $\alpha$ -naftil acetato como sustrato y revelado con FastRed.** Las muestras se incubaron en estático por 264 h a 55°C **1** ANCUT2, dilución 1:20, amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9; **2** ANCUT2, dilución 1:20, ChCl:U:H<sub>2</sub>O; **3** ANCUT2, dilución 1:20, ChCl:G:H<sub>2</sub>O; **4** ANCUT1, dilución 1:20, ChCl:E:H<sub>2</sub>O; **5** ANCUT2, dilución 1:20, amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9; **6** ANCUT2, dilución 1:20, ChCl:U:H<sub>2</sub>O; **7** ANCUT2, dilución 1:20, ChCl:G:H<sub>2</sub>O; **8** ANCUT2, dilución 1:20, ChCl:E:H<sub>2</sub>O.

El zimograma de la figura 13 muestra que hay actividad de la cutinasa ANCUT1 con amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9 después de 264 horas de incubación, y que la actividad enzimática aumenta con las mezclas eutécticas con etilenglicol, glicerol y urea con una dilución de enzima 1:20.

En la figura 11 la actividad enzimática incrementa al aumentar la concentración de la enzima, se observa que la actividad enzimática que con mezclas eutécticas en el medio aumenta la intensidad de la banda comparado con amortiguador, notando un aumento cuando se usa la mezcla eutéctica ChCl:G:H<sub>2</sub>O.

### 7.3.2 Reacción enzimática de degradación de PET con etilenglicol: (n(urea)/n(ZnCl<sub>2</sub>)) 4:1

Wang *et al.* (2014) mencionan, aproximadamente, un 80% de degradación de PET usando etilenglicol como disolvente y como catalizador (n(urea)/n(ZnCl<sub>2</sub>))4:1, a una temperatura de 170 °C, en un tiempo de hasta 60 min.

Aunque la actividad con cutinasas no había sido probada en esta mezcla eutéctica, se esperaba que conjuntando ambas, aun bajando la temperatura por debajo de la de transición vítrea de PET, fuera posible su degradación.

En tubos de cristal, con rosca, se colocó etilenglicol al 30% (n(urea)/n(Zn Cl<sub>2</sub>))4:1, amortiguador fosfatos pH 9, al 70 %, con 10 mg de PET para el blanco. Para la reacción enzimática se empleó etilenglicol la misma mezcla y 1000 U/mL de extracto crudo ANCUT1, para la prueba 2, agregando cada 24 h etilenglicol al 30 %, amortiguador fosfatos pH=9 al 70 % y el correspondiente de extracto crudo a una temperatura de 60° C, esto debido a la disminución de la actividad de la enzima después de 24 h.

## 7.4 Evaluación de la degradación de PET

La degradación del PET puede medirse de diferentes maneras: pérdida de peso, cambios en la cristalinidad y apariencia del polímero, y generación de productos de degradación como monómeros y oligómeros.

### 7.4.1 Detección de oligómeros por cromatografía en capa fina

Después de las 96 horas de incubación, se realizó en cromatografía en capa fina para la identificación de BHET, de los triplicados (a,b,c) eluyendo con la fase móvil para productos cíclicos (cloroformo), observando manchas que determinan la presencia de DMT (figura 14) sin embargo no se presenta en 3b por un problema de reproducibilidad.

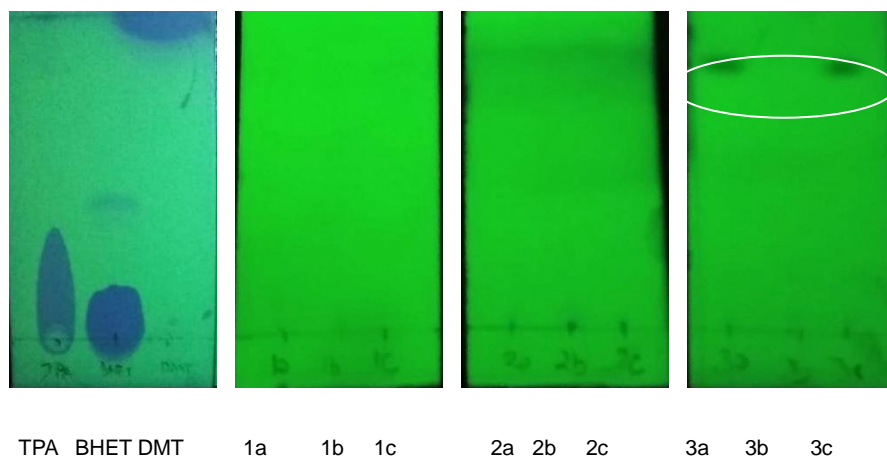


Figura 14. **Cromatoplasmas de silica gel de los productos de reacción obtenidos después de 96 horas de incubación de PET con enzima.** Los productos están disueltos en cloroformo. Referencias TPA y BHET; 1a, 1b, 1c tratamiento sin enzima (amortiguador + etilenglicol:  $(n(\text{urea})/n(\text{ZnCl}_2))$  4:1); 2a, 2b, 2c tratamiento con enzima ANCUT1 (amortiguador + etilenglicol:  $(n(\text{urea})/n(\text{ZnCl}_2))$  4:1); 3a,3b,3c tratamiento con enzima ANCUT2 (amortiguador + etilenglicol:  $(n(\text{urea})/n(\text{ZnCl}_2))$  4:1).

La muestra del producto de degradación se mezcló con DMSO 1:1 para la identificación de productos de la reacción como TPA, y se eluyó en fase móvil para productos cíclicos. Se muestra en la figura 15 la presencia de manchas no coincidentes con las referencias (marcadas dentro de un círculo), por lo que se considera la posible presencia de oligómeros. Los productos son diferentes de acuerdo a la enzima utilizada.

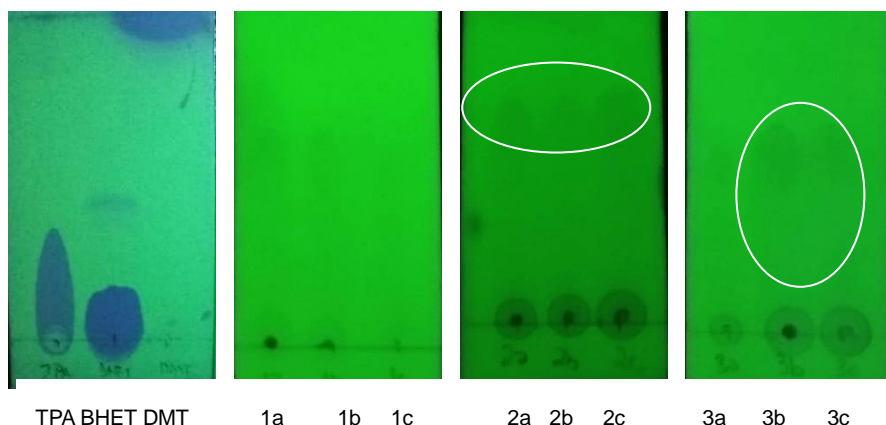


Figura 15. **Productos de reacción después de 96 horas de incubación detectados en cromatoplasmas de silica gel.** Los productos de reacción están disueltos en DMSO. Referencias TPA y BHET. 1a, 1b, 1c tratamiento sin enzima (amortiguador Tris-HCl + etilenglicol:  $(n(\text{urea})/n(\text{ZnCl}_2))$  4:1), 2a, 2b, 2c tratamiento con enzima ANCUT1 (amortiguador + etilenglicol:  $(n(\text{urea})/n(\text{ZnCl}_2))$  4:1), 3a,3b,3c tratamiento con enzima ANCUT2 (amortiguador + etilenglicol:  $(n(\text{urea})/n(\text{ZnCl}_2))$  4:1).

#### 7.4.2 Detección de monómeros y oligómeros por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC)

Se utilizaron las curvas de calibración y los tiempos de retención presentados por Lovera y Torres (2019) (figura 16) para determinar las cantidades de TPA, BHET y DMT, obteniendo los resultados de la tabla 13 .

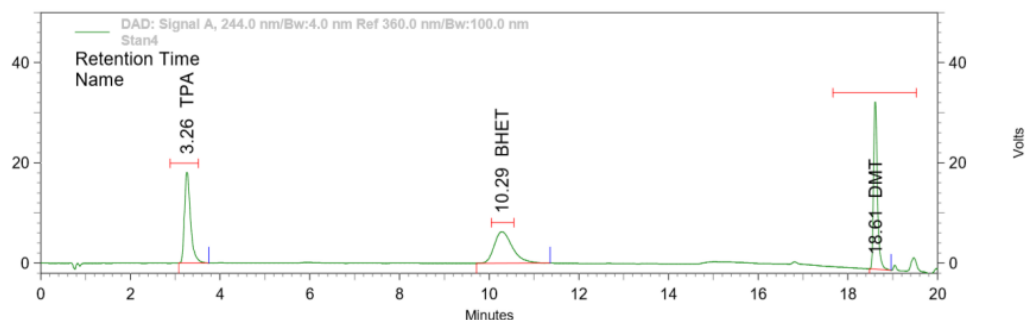


Figura 16. Tiempos de retención de TPA, BHET y MHET obtenidos tras separación cromatográfica obtenida por fase reversa utilizando una columna de sílica 18 Chromolith RP-18 e. Obtenida de Lovera y Torres 2019.

Tabla 13. TPA, BHET y DMT obtenidos durante la reacción a 75 °C utilizando como medio de reacción 30% etilenglicol ( $n(\text{urea})/n(\text{Zn Cl}_2)$ )4:1 por 96 h.

	TPA ppm	Rendimiento (%)	BHET ppm	DMT ppm
Control sin enzima	0.67	0.29	0.93	0
ANCUT1	1.67	0.72	1.13	0
ANCUT2	1.67	0.72	5.98	1.93

Con estos datos se puede referir que la mezcla favorece la reacción de degradación de PET, y los resultados dependen del tipo de enzima empleada, con valores más altos en el caso de ANCUT2.



### 7.4.3 Reacción enzimática de degradación de PET con mezclas eutécticas como disolvente de reacción

En tubos Eppendorf se realizó la reacción enzimática añadiendo ANCUT1, ANCUT2 y ANCUT3 en una proporción 1:20 con las mezclas eutécticas ChCl:E:H<sub>2</sub>O, ChCl:G:H<sub>2</sub>O y ChCl:U:H<sub>2</sub>O, a 50°C con agitación de 50 rpm, 10 mg de PET, 1 mL de volumen total y 3 semanas de reacción. Se añadió enzima solo al inicio de la reacción (figura 17). Concentración enzimática de proteína de los extractos: ANCUT1 0.397mg/mL, ANCUT2 0.196 mg/mL y ANCUT3 0.134 mg/mL.

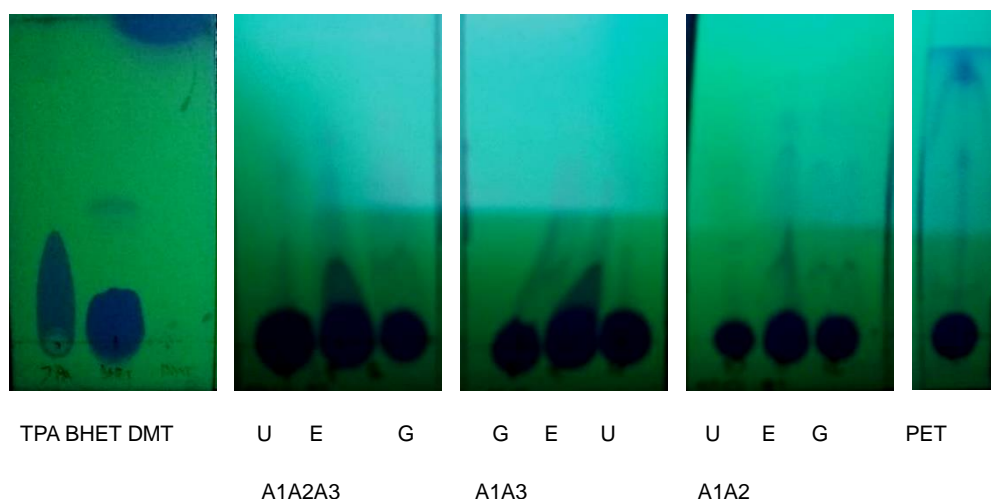


Figura 17. **Productos obtenidos de la reacción de degradación de PET con única adición de enzima inicial tras tres semanas de incubación con enzima y mezclas eutécticas.** Las muestras se corrieron en silica gel. Las mezclas se llevaron a cabo con los siguientes solventes **B**: amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9, **G**: DES ChCl:G:H<sub>2</sub>O, **E** DES ChCl:E:H<sub>2</sub>O y **U**: DES ChCl:E:H<sub>2</sub>O

En las cromatoplasmas las manchas para la reacción de PET con enzimas en presencia de mezclas eutécticas eluyen al mismo R<sub>f</sub> de TPA, mostrando mayor intensidad para el caso de la mezcla a base de etilenglicol. Para descartar que lo que está eluyendo fuera el PET *per se*, se disolvió en ácido tricloroacético al 10%, se realizó una cromatoplasma, donde se aprecia que la banda que está eluyendo no coincide con ninguna de las cromatoplasmas de reacción.

Se llevó a cabo una segunda reacción enzimática de degradación de PET con mezclas eutécticas como disolvente de reacción, en la que se añadió enzima cada 7 días hasta

completar 3 semanas (figura 18) para descartar que la enzima se inactivara y perdiera su actividad.

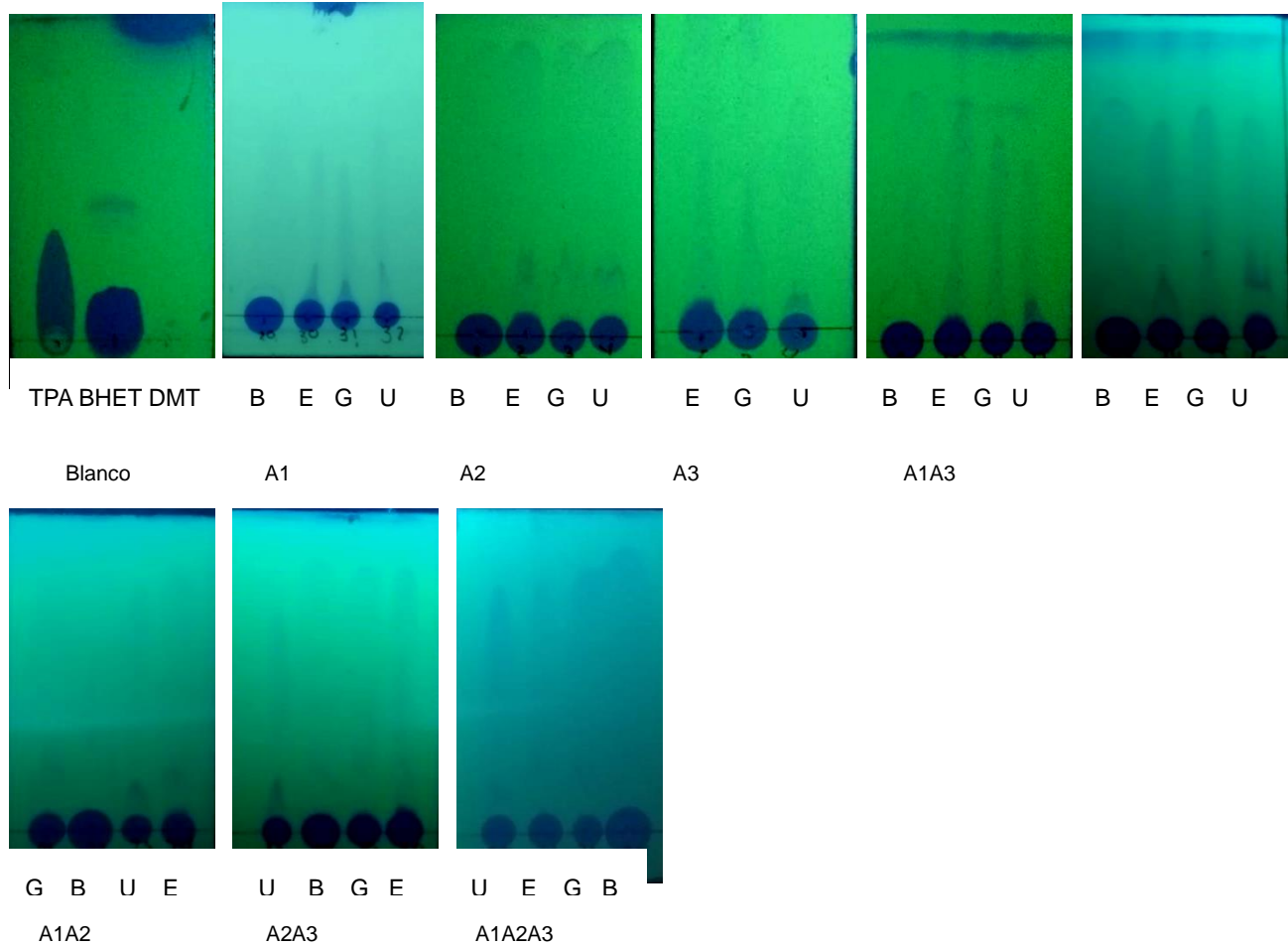


Figura 18. **Productos obtenidos de la reacción de degradación de PET con adición de enzima cada semana, durante de 3 semanas de reacción con mezclas eutécticas en cromatoplas de silica gel. B:** amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9, **G:** DES ChCl:G:H<sub>2</sub>O, **E** DES ChCl:E:H<sub>2</sub>O y **U:** DES ChCl:E:H<sub>2</sub>O

En tubos Eppendorf se realizó la reacción enzimática añadiendo AN CUT1, AN CUT2 y AN CUT3 en una proporción 1:10 con las mezclas eutécticas ChCl:E:H<sub>2</sub>O, ChCl:G:H<sub>2</sub>O y ChCl:U:H<sub>2</sub>O, a 50 °C con agitación de 50 rpm y 10 mg de PET. Se añadió enzima cada 7 días hasta completar las 3 semanas (figura 18). Concentración enzimática: AN CUT1 1.198mg/mL, AN CUT2 0.033 mg/mL y AN CUT3 0.373 mg/mL.

En las cromatoplas de reacción con AN CUT1, AN CUT2 y AN CUT3 se distingue nuevamente manchas que eluyen al R<sub>f</sub> de TPA y otros que no corresponden y aumenta la

intensidad de la mancha con respecto a la reacción en amortiguador debido a la presencia de las enzimas. En los resultados se observan que las cutinasas en mezclas eutécticas, como ya se ha demostrado en otras enzimas de tipo esterases (Hammond, Bowron y Edler, 2017), logran degradar al PET en DES como medio de reacción.

Para las cromatoplasmas (figura 18) de mezclas eutécticas con etilenglicol y urea, en el caso de la ANCUT3 y ANCUT1 se ve favorecido la obtención de TPA, pues en este caso las manchas presentan mayor intensidad. Esto indicaría una sinergia entre ANCUT1 y ANCUT3, para la primera enzima la especificidad de cadena es corta y media, y para la segunda con especificidad de cadena corta en la cutina como en sustrato (Bermúdez-García *et al.*, 2019), esto sugiere que una cutinasa podría estar ayudando a la otra cutinasa para la obtención de TPA. Sin embargo, faltarían estudios para saber el corte para PET. Para la ANCUT2 y ANCUT1 con etilenglicol y urea, se muestra el mismo efecto de las ANCUT1 y la ANCUT3, pero con manchas de menor intensidad esto puede deberse al tipo de corte de cadena (en cutina) de la ANCUT2 es diferente que al de ANCUT3. En el caso de ANCUT2 y ANCUT3 se favorece la obtención de TPA, mientras que para las otras mezclas o el amortiguador destaca la presencia de oligómeros. Cuando se emplea la mezcla de las 3 enzimas en todos los casos aparecen manchas que no corresponden a las referencias, lo que pueden ser debido a la presencia de oligómeros.

#### 7.5 Escalamiento de reacción de degradación de PET utilizando mezclas eutécticas como disolvente de reacción

Se realizó un escalamiento a 100 mg de PET y 10 mL de medio de reacción con el fin de obtener el sólido suficiente para su estudio. Se realizó a 50 °C y se agregó enzima cada 7 días y para temperatura ambiente se agregó enzima solo al principio de la reacción. Las muestras que se analizaron por rayos X, HPLC y microscopía electrónica de barrido fueron aquellas en donde los medios de reacción fueron el amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9 y con las mezclas eutécticas a base de glicerol y urea, ya que mostraron mayor actividad y estabilidad, coincidiendo con lo establecido en Esquembre *et al.* (2013).

Para analizar las muestras por rayos X y SEM, se realizaron lavados con etanol al sólido obtenido después de la reacción, agregando etanol y retirándolo después de agitarlo en Vortex (SI-0236). El etanol agregado que se retiraba se conservó debido a que presentaba partículas de tamaño menor al PET introducido al principio de la reacción. Cabe destacar que para los blancos se utilizó PET con amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9 y PET con mezclas eutécticas, y no se observó la obtención de este material; este producto se disolvió en 1:1 DMSO-Agua y se mandó a analizar con HPLC. Se utilizó DMSO, debido a que anteriormente se había probado exitosamente la solubilidad de ácido tereftálico en DMSO, ya se esperaba que el producto de degradación obtenido fuera ácido tereftálico.

#### 7.5.1 Detección de productos de degradación de PET con HPLC

Utilizando como referencia los tiempos de retención de Lovera y Torres (2019), ya mencionados, se analizaron los cromatogramas. Las muestras analizadas fueron la reacción de PET con ANCUT1 con amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9, ANCUT1 con mezclas eutécticas (G:ChCl:H<sub>2</sub>O, U:ChCl:H<sub>2</sub>O y E:ChCl:H<sub>2</sub>O), ANCUT2 con amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9, a una temperatura de 50°C y ANCUT1 con mezclas eutécticas (G:ChCl:H<sub>2</sub>O, U:ChCl:H<sub>2</sub>O y E:ChCl:H<sub>2</sub>O) y con amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9, ANCUT2 con mezclas eutécticas (G:ChCl:H<sub>2</sub>O, U:ChCl:H<sub>2</sub>O y E:ChCl:H<sub>2</sub>O) y con amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9 y ANCUT3 con mezclas eutécticas (G:ChCl:H<sub>2</sub>O, U:ChCl:H<sub>2</sub>O y E:ChCl:H<sub>2</sub>O) y con amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9 a temperatura ambiente.

En las muestras a temperatura ambiente con la mezcla eutéctica U:ChCl:H<sub>2</sub>O con la enzima ANCUT1 y ANCUT3 se obtuvieron 351 y 339 ppb de ácido tereftálico respectivamente, se señala el cromatograma (figura 19 y 20). En los cromatogramas a temperatura ambiente, observamos otros picos que no coinciden con las muestras estándares (TPA 3.3 minutos, BHET 10.3 minutos y DMT 18.6 minutos), con tiempos de retención en 2.2, 1.7 y 1.8 minutos, lo que confirma la presencia de oligómeros.

La reacción realizada a 50 °C, no se encontraron picos en el cromatograma con tiempos de retención similares a los estándares. Se observaron otros picos en 1.7, 1.9, 6.3, y 11.4 minutos; para la mezcla a base de glicerol y la enzima ANCUT1; mientras que para ANCUT2

se obtuvieron picos en 6.3, 2.1, 7.2, 8.3 y 11.5 minutos, obteniendo nuevamente más picos para la mezcla de glicerol y para la enzima ANCUT3 se obtuvo un pico a los 1.7 minutos para la mezcla de urea. De estas dos corridas, comparando la presencia de nuevos picos y mayor cantidad de estos, se infiere que la temperatura de reacción, el medio de reacción y la enzima para la reacción de degradación incidirán en las diferencias en los productos de degradación. Los mejores medios de reacción son lo DES a base de glicerol y de Urea, ya que en estos se obtuvieron ácido tereftálico y otros productos de degradación.

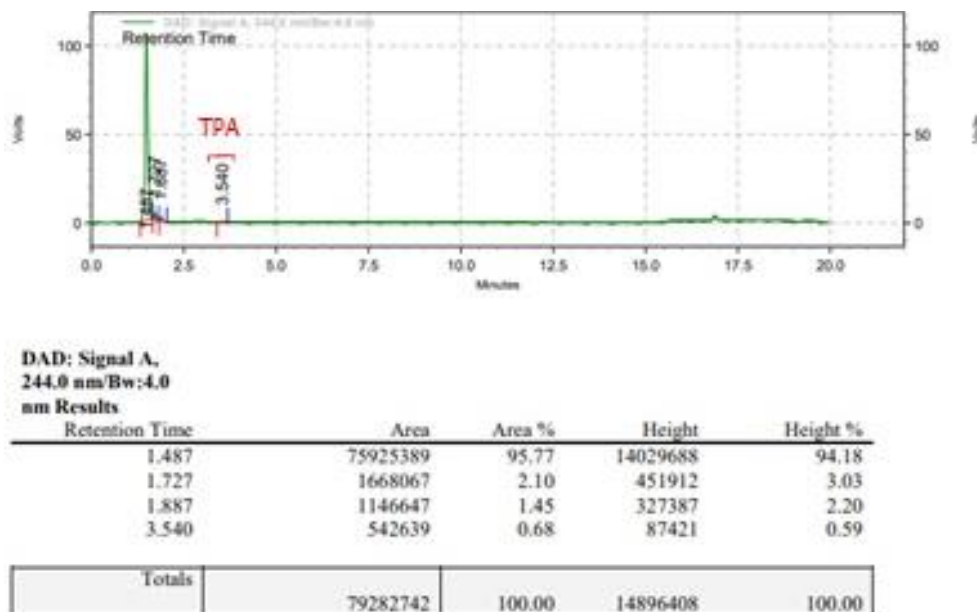


Figura 19. Cromatograma de reacción de degradación de PET con la enzima ANCUT1 a temperatura ambiente y DES a base de urea como medio de reacción.

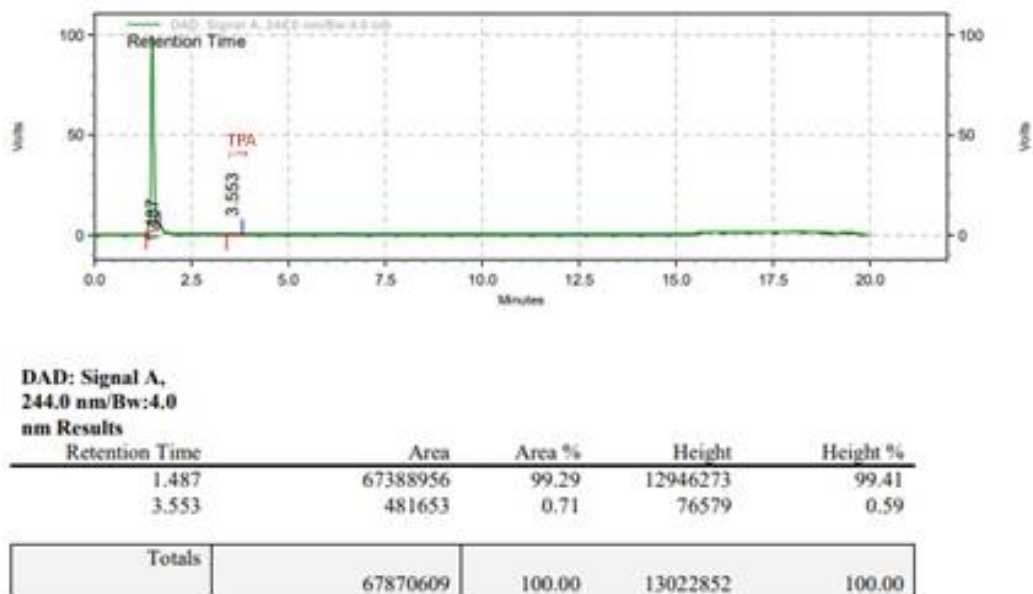


Figura 20. Cromatograma de reacción de degradación de PET con la enzima ANCUT3 a temperatura ambiente y DES a base de urea como medio de reacción.

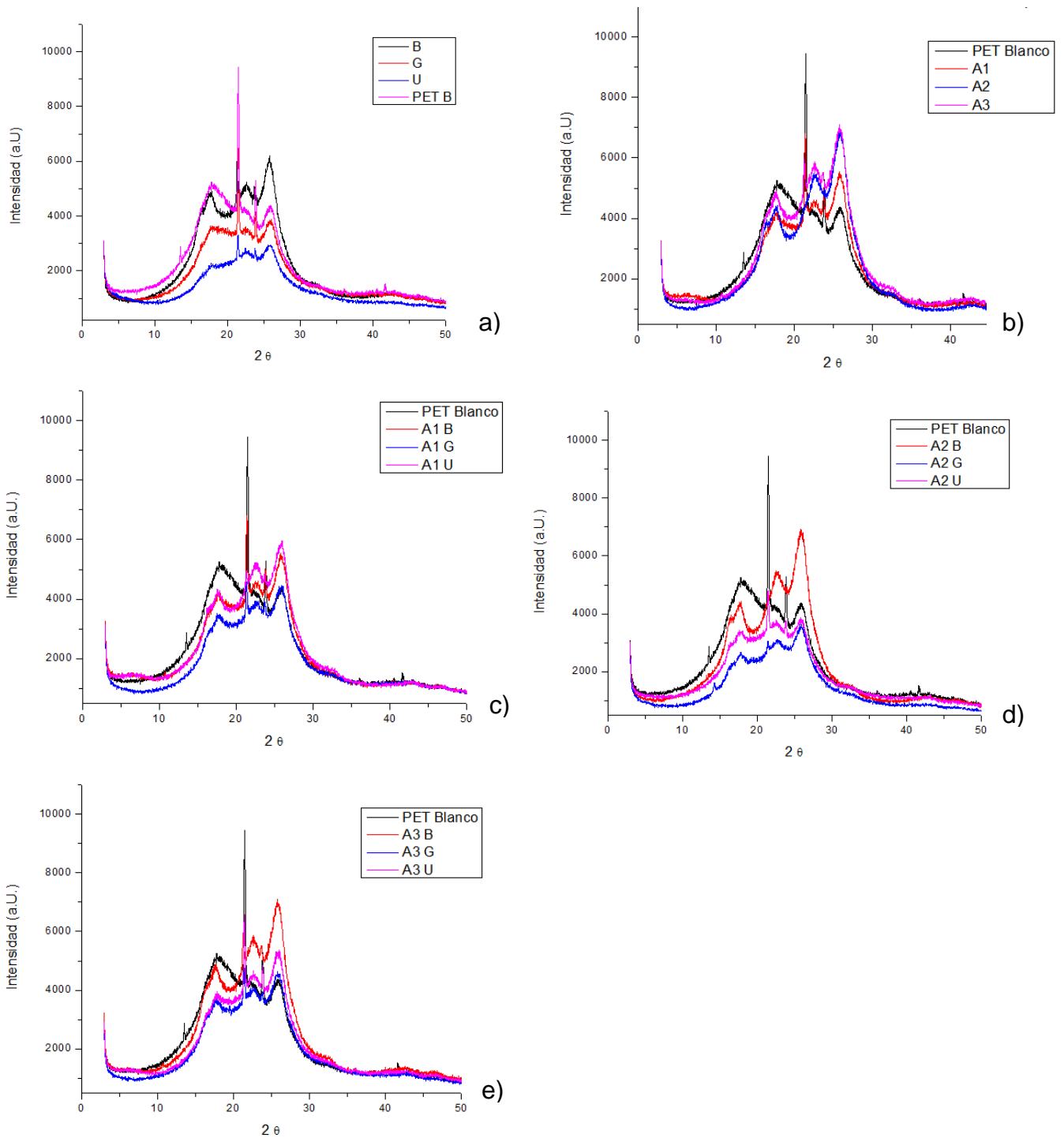
### 7.5.2 Evaluación de degradación de PET difracción de Rayos X

En la figura 21 se muestran los difractogramas de las muestras resultantes de PET sin tratamiento enzimático después de 3 semanas de incubación a 50 °C y con tratamiento enzimático a 50 °C con las enzimas ANCUT1, ANCUT2 y ANCUT3, evaluando diferentes disolventes como medio de reacción 1) amortiguador Tris-HCl pH 9 50 mM, 2) G:ChCl:H<sub>2</sub>O y 3) U:ChCl:H<sub>2</sub>O. Los patrones de difracción son comparados con PET sin tratamiento enzimático y sin incubación.

La muestra de PET muestra una señal de reflexión desde  $2\theta=15$  hasta  $30^\circ$  con un máximo en  $2\theta=22^\circ$ . El PET con tratamiento enzimático muestra señales de reflexión que aumentan en comparación con el PET sin tratamiento en  $2\theta=21.4$ ,  $26.2$  y una disminución en  $2\theta=18$ , lo que se puede deber al aumento y disminución de señales debido de la degradación del PET y la formación de oligómeros y ácido tereftálico. Se observan sobreposición de los picos y disminución de picos indicando un cambio en la estructura del PET, lo que coincide con lo descrito por Ramírez et al. (2015). De los difractogramas, podemos observar el PET con tratamiento enzimático tiene un menor grado de cristalinidad que el PET sin tratamiento

enzimático; el uso de las mezclas eutécticas disminuye el grado de cristalinidad en comparación al PET con tratamiento enzimático con amortiguador como medio de reacción.

Figura 21. Difractogramas de PET incubado 50 °C a) sin tratamiento enzimático, b) tratamiento enzimático (ANCUT1, ANCU2 y ANCU3) con Tris-HCl 50 mM pH 9, c) tratamiento enzimático con enzima ANCU1 comparando mezclas eutécticas y amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9, d) tratamiento enzimático con enzima ANCU2 comparando mezclas eutécticas y amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9, e) tratamiento enzimático con enzima ANCU3 comparando mezclas eutécticas y amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9.





En la figura 22 se muestran los difractogramas de las muestras resultantes de PET sin tratamiento enzimático después de 3 semanas de incubación a temperatura ambiente y con tratamiento enzimático a temperatura ambiente con las enzimas ANCUT1, ANCUT2 y ANCUT3, evaluando diferentes disolventes como medio de reacción 1) amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9, 2) G:ChCl:H<sub>2</sub>O y 3) U:ChCl:H<sub>2</sub>O, los patrones de difracción son comparados con PET sin tratamiento enzimático y sin incubación.

La forma y el tamaño de la celda unitaria es determinado por las posiciones angulares de las líneas de difracción y la distribución de los átomos dentro de esta celda unitaria, lo que determina los picos y las líneas del difractograma, que permiten compararlos entre las diferentes condiciones. La muestra de PET sin tratamiento enzimático muestra una señal de reflexión desde  $2\theta=15$  hasta  $30^\circ$  con un máximo en  $2\theta=22$ . El PET con tratamiento enzimático muestra señales de reflexión que aumentan en comparación con el PET sin tratamiento en  $2\theta=21.4$ ,  $26.2$  y una disminución en  $2\theta=21.4$  comparado con el PET sin tratamiento indica que el aumento y disminución de señales pueden ser debidos a la degradación del PET y la formación de oligómeros y ácido tereftálico.

Los blancos, que corresponden a los difractogramas sin tratamiento enzimático, pero con mezcla eutéctica, muestran modificación en la cristalinidad ya que disminuyen los picos característicos de PET. Con amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9 los picos en  $2\theta=18.1$ ,  $21.4$ ,  $26.2$  se ven modificados para las tres enzimas, además de que, para la ANCUT2 se observa un aumento del pico en el diagrama de difracción.

Para ANCUT1 los picos disminuyen en  $2\theta=18.1$  y aumenta en  $2\theta=26.2$ . Para los difractogramas de los tratamientos con las mezclas eutécticas que se ve disminuido y como ya se mencionó para amortiguador aumenta su pico en  $2\theta=21.4$ . Para ANCUT3 los picos de los difractogramas tanto para amortiguador como para mezclas eutécticas se ven disminuidos en los picos  $2\theta$  ya mencionados.

Se observa que los difractogramas del PET sometido a tratamiento enzimático tiene un menor grado de cristalinidad que el PET sin tratar, al observar los picos disminuidos. Cabe destacar que, con el uso de las mezclas eutécticas disminuye el grado de cristalinidad en comparación al PET tratado enzimáticamente con amortiguador como medio de reacción.

Se hace notar que la temperatura ambiente fue adecuada para causar degradación de PET.

Evaluación de degradación de PET con microscopia electrónica de barrido (SEM)

En las figura 23 y 24 se observan micrográficas representativas de las muestras de PET. Esto se realizó con el fin de observar cambios en la morfología del polímero y se compararon con PET sin tratamiento enzimático. En las tablas 14 y 15 se muestran las condiciones de reacciones realizadas a temperatura ambiente y a 50 °C.

Los recuadros b), e) y h) en ambas imágenes corresponden a las muestras tratadas con amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9, los recuadros c), f) e i) corresponden a las muestras tratadas con G:ChCl:H<sub>2</sub>O y los recuadros d), g) y j) con U:ChCl:H<sub>2</sub>O. Los recuadros b), c) y d) fueron tratados con la enzima ANCUT1, los e), f) y g) con la enzima ANCUT2 y los h), i) y j) con la enzima ANCUT3. En todos los recuadros con tratamiento enzimático se observan señaladas con flechas rojas las zonas donde se observan cambios comparados con el PET sin tratamiento enzimático, con desprendimiento de fibras, agujeros y cambios en la topografía del poliéster. Lo cual confirma nuevamente que hay degradación de PET con las enzimas ANCUT1, ANCUT2 y ANCUT3 utilizando mezclas eutécticas como medio de reacción.

Figura 22 **Difractogramas de PET incubado a temperatura ambiente** a) sin tratamiento enzimático, b) tratamiento enzimático con Tris-HCl 50 mM pH 9, c) tratamiento enzimático con enzima ANCUT1 comparando mezclas eutécticas y amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9, d) tratamiento enzimático con enzima ANCUT2 comparando mezclas eutécticas y amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9, e) tratamiento enzimático con enzima ANCUT3 comparando mezclas eutécticas y amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9.

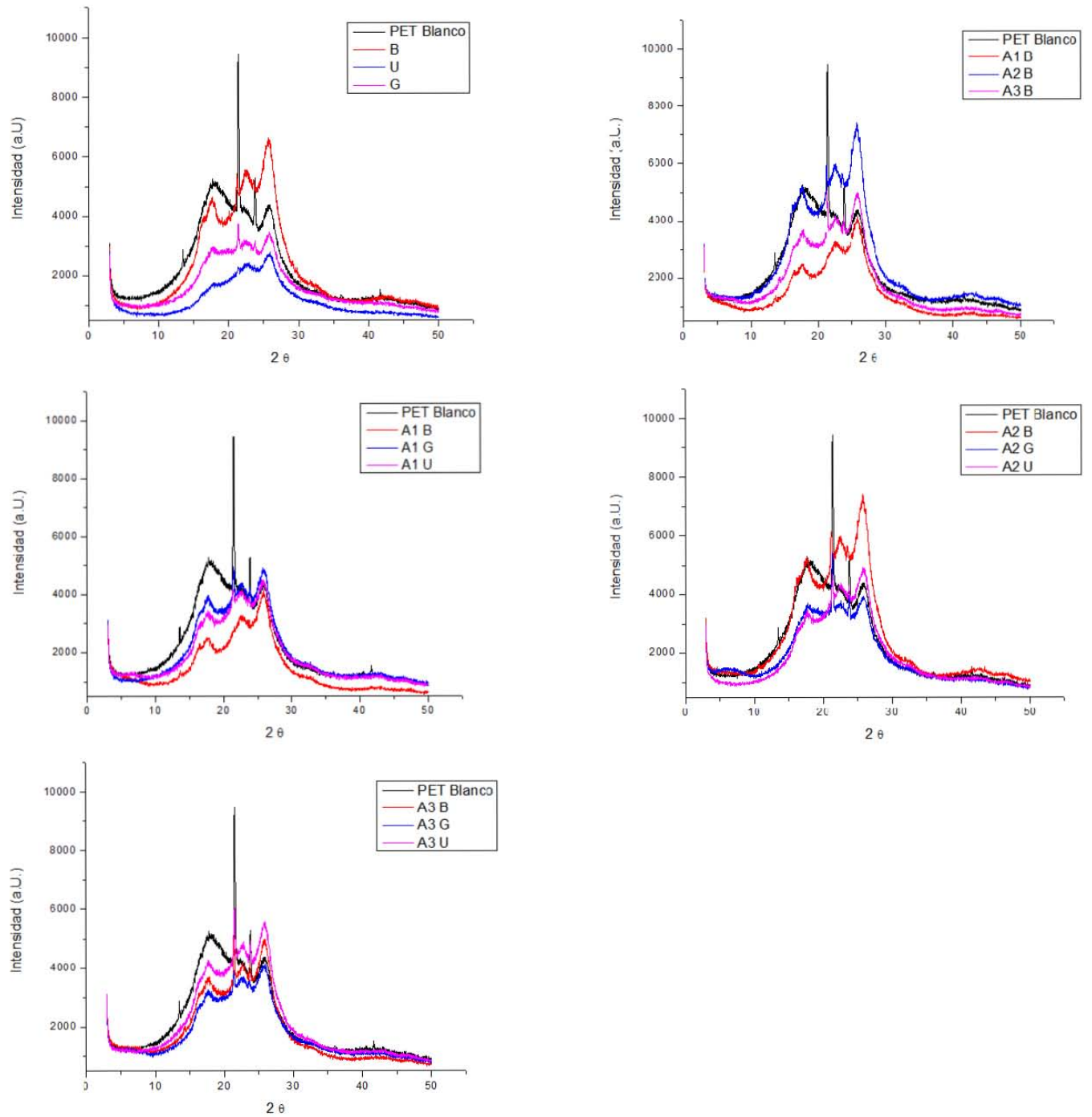


Tabla 14. Condiciones de reacción para la obtención de micrografías logradas con microscopía electrónica de barrido con PET molido a 50 °C utilizando diferentes disolventes (figura 21).

<b>Reacción</b>	<b>Enzima</b>	<b>Disolvente</b>	<b>Tiempo de reacción</b>
<b>a)</b>	-	Amortiguador TrisHCl pH 9 50 mM	t0
<b>b)</b>	ANCUT1	Amortiguador Tris HCl pH 9 50 mM	3 semanas
<b>c)</b>	ANCUT1	G:ChCl:H <sub>2</sub> O	3 semanas
<b>d)</b>	ANCUT1	U:ChCl:H <sub>2</sub> O	3 semanas
<b>e)</b>	ANCUT2	Amortiguador Tris HCl pH 9 50 mM	3 semanas
<b>f)</b>	ANCUT2	G:ChCl:H <sub>2</sub> O	3 semanas
<b>g)</b>	ANCUT2	U:ChCl:H <sub>2</sub> O	3 semanas
<b>h)</b>	ANCUT3	Amortiguador Tris HCl pH 9 50 mM	3 semanas
<b>i)</b>	ANCUT3	G:ChCl:H <sub>2</sub> O	3 semanas
<b>j)</b>	ANCUT3	U:ChCl:H <sub>2</sub> O	3 semanas

Tabla 15. Condiciones de reacción para la obtención de micrografías logradas con microscopía electrónica de barrido con PET molido a Temperatura ambiente utilizando diferentes disolventes (figura 22)

<b>Reacción</b>	<b>Enzima</b>	<b>Disolvente</b>	<b>Tiempo de reacción</b>
<b>a)</b>	-	Amortiguador TrisHCl pH 9 50 mM	t0
<b>b)</b>	ANCUT1	Amortiguador Tris HCl pH 9 50 mM	3 semanas
<b>c)</b>	ANCUT1	G:ChCl:H <sub>2</sub> O	3 semanas
<b>d)</b>	ANCUT1	U:ChCl:H <sub>2</sub> O	3 semanas
<b>e)</b>	ANCUT2	Amortiguador Tris HCl pH 9 50 mM	3 semanas
<b>f)</b>	ANCUT2	G:ChCl:H <sub>2</sub> O	3 semanas
<b>g)</b>	ANCUT2	U:ChCl:H <sub>2</sub> O	3 semanas
<b>h)</b>	ANCUT3	Amortiguador Tris HCl pH 9 50 mM	3 semanas
<b>i)</b>	ANCUT3	G:ChCl:H <sub>2</sub> O	3 semanas
<b>j)</b>	ANCUT3	U:ChCl:H <sub>2</sub> O	3 semanas

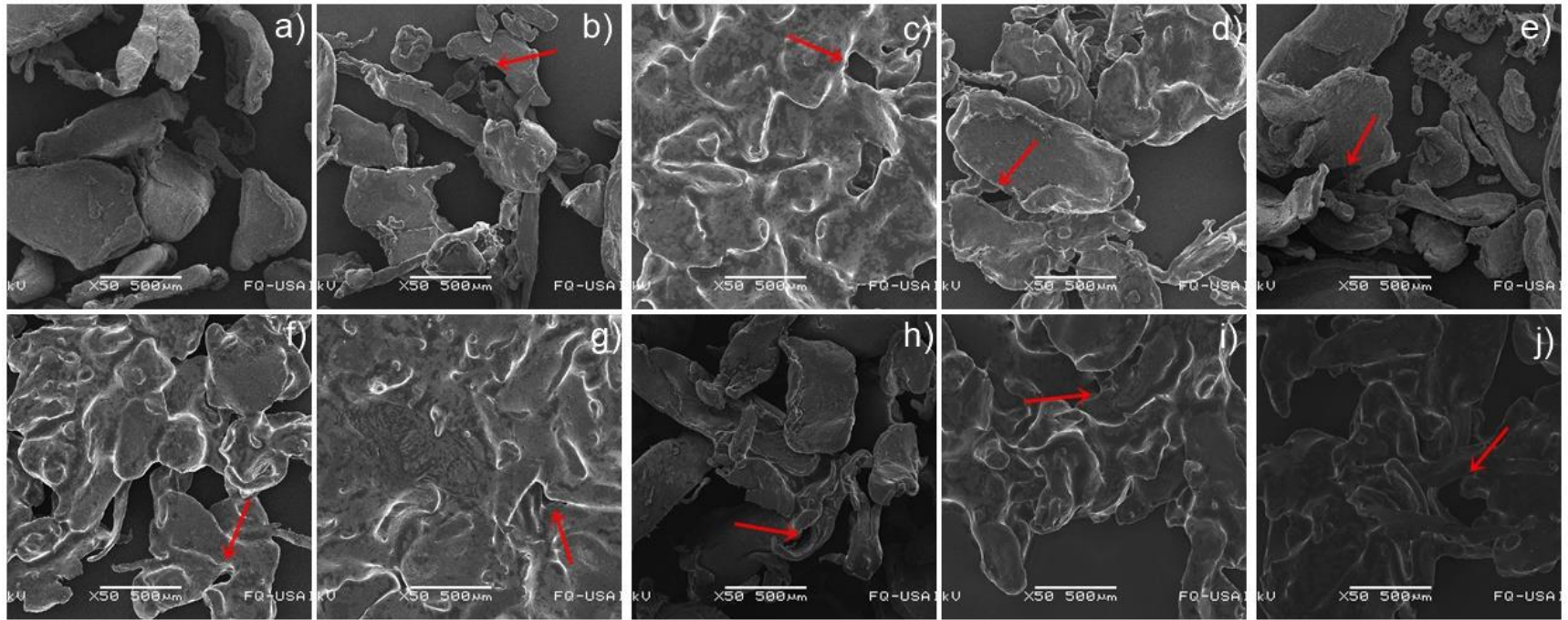


Figura 23. **Micrografías logradas a partir de Microscopía Electrónica de Barrido con PET molido a 50 °C.** Se señala con flechas color rojo los cambios ocurridos después de la degradación de PET (tabla 14).

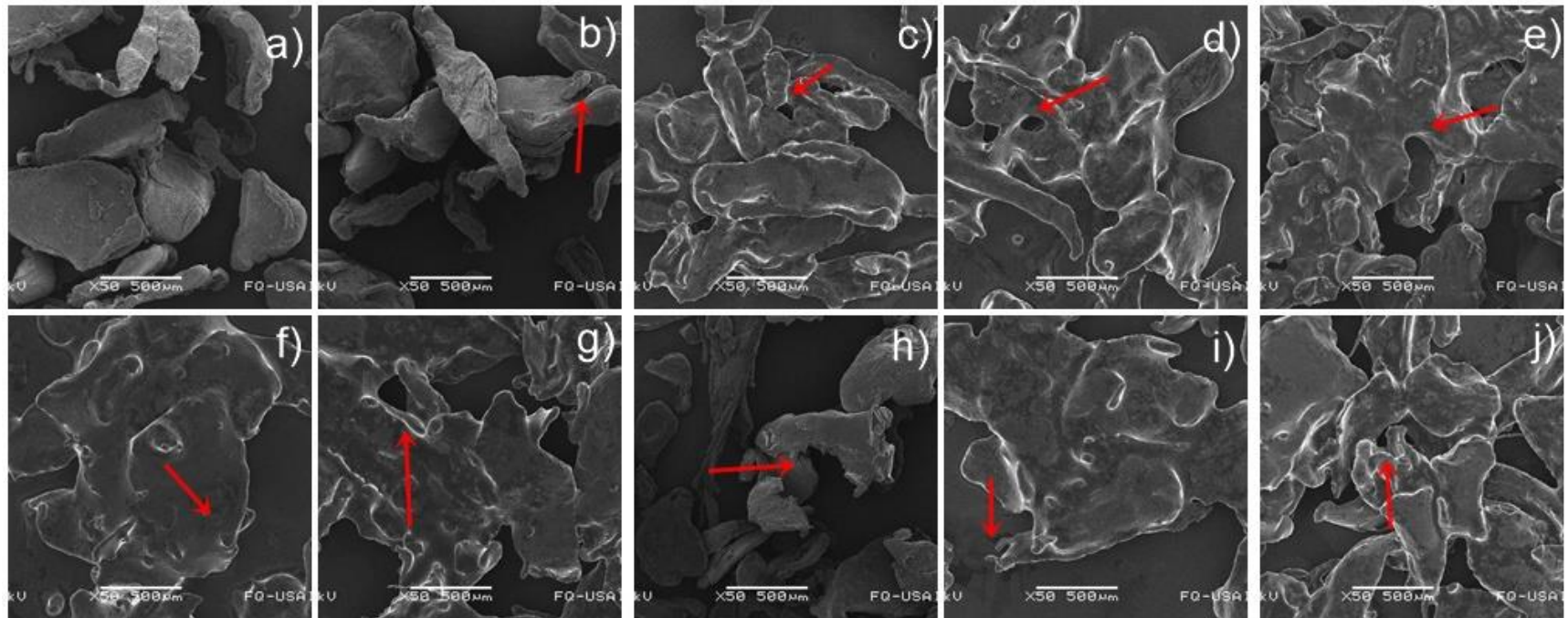


Figura 24. **Micrografías logradas a partir de Microscopía Electrónica de Barrido con PET molido a temperatura ambiente.** Se señala con flechas color rojo los cambios ocurridos después de la degradación de PET (tabla 15).

Se demostró la actividad enzimática de las cutinasas de *Aspergillus nidulans* usando como disolvente mezclas eutécticas. En la bibliografía solamente se ha reportado la actividad de cutinasas en disolventes eutécticos para la cutinasa *Amycolatopsis mediterranei* (Tan *et al.*, 2021). Sus resultados coinciden en dos puntos encontrados en este trabajo: incremento en la actividad en presencia del disolvente eutéctico y mayor estabilidad a la temperatura. Lo atribuyen, sin confirmarlo experimentalmente, a las interacciones de puentes de hidrógeno de cloruro de colina con el sustrato.

En Domínguez de María *et al.* (2019) mencionan proporciones de mezclas eutécticas combinadas con agua, dando porcentajes de dilución v/v, de 0-20 % de agua, el agua funciona como un cosolvente. Por encima de este porcentaje se forma una disolución electrolítica, que sin embargo por debajo de 50 % (v/v), se conservan cúmulos de mezcla eutéctica. En Tan *et al.* (2022) se mencionan mezclas eutécticas diluidas tal como en Miranda *et al.*, 2019, donde se favorece la actividad y estabilidad de las enzimas, por lo que es probable que este comportamiento sea debido a una mezcla activadora y no una mezcla eutéctica como tal. En el presente trabajo se registró, el aumento de actividad de la catálisis usando como sustrato *p*-nitrofenil butirato y la posible estabilidad térmica que presentan las cutinasas en temperaturas por encima de su temperatura óptima (50, 55, 60 y 65°C) comparado con el uso de amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 9. En conjunto, los resultados dan una pauta para la mejora de catálisis usando estas condiciones, debido a la obtención de rendimientos bajos comparados con Tournier *et al.*, 2019, quienes logran degradación de 90 % en 10 horas con una eficiencia de 16.7 gramos de TPA por litro por hora.

Bermúdez-García *et al.* (2019) demostraron que el corte de hidrólisis para cutina es diferente dependiendo la enzima, por lo que es de esperarse que para otros sustratos como lo es el PET, también se siga este patrón de corte dependiendo de la enzima utilizada. Al conjuntar dos enzimas de tipo *exo* como lo son la ANCUT2 y ANCUT3 con la ANCUT1 de tipo *endo* podremos tener mejores resultados. En las cromatoplasmas presentadas se observaron patrones de degradación de oligómeros con mayor intensidad en las manchas cuando se mezclaron las enzimas ANCUT2 y ANCUT3 con ANCUT1, demostrando la obtención de oligómeros, que son de importancia industrial para la generación de otros plastificantes y así poder entrar al proceso de economía circular. Aunque por este medio no se llegó a



demostración de obtención de TPA, la obtención de oligómeros y la demostración de la actividad de las enzimas, en medios no acuosos, como lo son las mezclas eutécticas, muestra un gran avance a este proyecto y da pauta para futuras investigaciones.

Carniel *et al.* (2016) demuestran la sinergia de la cutinasa de *Humicola insolens* y la lipasa de *Candida antarctica* (CALB) para la hidrólisis de PET, obteniendo ácido tereftálico, por lo que no hay que descartar posibles sinergias de las cutinasas ANCUT1, ANCUT2 y ANCUT3 con otras enzimas como la CALB para la obtención final del monómero. Por lo que se debe de retomar el análisis de la sinergia de las cutinasas con mezclas eutécticas y usar otras enzimas como la CALB.

## **8 Conclusiones**

Una de las limitantes al uso de cutinasas fúngicas para degradación de PET es que se requiere que sean activas a la temperatura de transición vítrea del polímero, que se ubica entre 65-75 °C dependiendo los factores en que se encuentre el PET. Para las cutinasas de *Aspergillus nidulans*, las que, como se demuestra en este trabajo se inactivan después de 24 horas de incubación. Este trabajo partía del supuesto de que la estabilidad térmica de las mismas mejoraría en presencia de disolventes eutécticos, tomando como modelo mezclas de cloruro de colina con etilenglicol, glicol o urea. Los resultados avalan este supuesto, ya que las cutinasas muestran actividad por 4 semanas de incubación e incluso aumentan la misma.

Por tanto, este trabajo contribuye a implementar una estrategia para incrementar la termoestabilidad de las enzimas mediante el uso de mezclas que contienen disolventes eutécticos en diversas proporciones.

Por otra parte, había sido reportado el hecho de que disolventes eutécticos pueden, *per se* degradar PET, aunque se trataba de mezclas diferentes a las empleadas aquí. Este trabajo contribuye con un ejemplo de que este tipo de disolventes coadyuvan a la degradación del polímero y que activa la degradación enzimática del mismo, ya que se obtienen nuevos productos de reacción cuando están presente tanto los DES como las enzimas.

Los efectos de las variables aquí evaluadas deberán de ser explicados con estudios básicos estructurales de las enzimas y de las interacciones entre los DES y las mismas. Asimismo, se requieren estudios cuantitativos de la producción de oligómeros y monómeros.

## 9 Bibliografía

Arıkaya, A., Ünlü, A. E., y Takaç, S. (2019). Use of deep eutectic solvents in the enzyme catalysed production of ethyl lactate. *Process Biochemistry*, 84, 53-59

Alauddin, M. B. A. D. C. U., Choudhury, I. A., El Baradie, M. A., y Hashmi, M. S. J. (1995). Plastics and their machining: a review. *Journal of Materials Processing Technology*, 54(1-4), 40-46.

Billmeyer, E. W. (2020). *Ciencia de los polímeros*. Reverté (pp. 3-10).

Bermúdez-García E., Peña-Montes C., Martins I., País J., Silva P. C., Sánchez S., Farrés A., (2019). Regulation of cutinases expressed by *Aspergillus nidulans* and evaluation of their role in cutin degradation., *Applied Microbiology and Biotechnology*, (103), 3863-3874.

CONAMA. Congreso Nacional de Medio Ambiente. (2017). Boletín Número 3469, 13 de abril de 2017, Cámara de Diputados, disponible en línea <http://www5.diputados.gob.mx/index.php/esl/Comunicacion/Boletines/2017/Abril/13/3469-En-Mexico-90-millones-de-botellas-de-plastico-de-refrescos-y-agua-son-lanzados-a-la-via-publica-rios-y-mares>

Bordes P., Pollet E. y Avérous L., (2009). Nano-biocomposites: Biodegradable polyester/nanoclay, *Progress in Polymer Science*, (34), 125-155.

Carniel, A., Valoni, É., Junior, J. N., da Conceição Gomes, A. y de Castro, A. M. (2017). Lipase from *Candida antarctica* (CALB) and cutinase from *Humicola insolens* act synergistically for PET hydrolysis to terephthalic acid. *Process Biochemistry*, 59, 84-90.

Carvalho, C. M., Aires-Barros, M. R. y Cabral, J. (1998). Cutinase structure, function and biocatalytic applications. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1(3), 28-29.

Castro-Ochoa D., Peña-Montes C., Farrés A., (2013). Evaluation of strategies to improve the production of alkaline protease PrtA from *Aspergillus nidulans*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, (169), 1672-1682.

Castro R. J. A., (2017). Mejoramiento de la producción de la cutinasa ANCUT1 utilizando el sistema de expresión de *Pichia pastoris*., Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias, UNAM, Facultad de Química, México. D.F., México.

Chen S., Su L., Chen J., Wu J., (2013). Cutinase: Characteristics, preparation, and application, *Biotechnology Advances*, (31),1754-1767.

Choi, Y. H., van Spronsen, J., Dai, Y., Verberne, M., Hollmann, F., Arends, I. W. y Verpoorte, R. (2011). Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiology*, 156(4), 1701-1705.

Cvjetko B.A., Jurinjak T. A., Vinlovic M., Radosevi k., Gaurina S. V., Radojcic R. I., (2015). Cholium-based deep eutectic disolventes and ionic liquids from lipase-catalyzed synthesis of butyl acetate, *Journal of Molecular Catalysis B; enzymatic*, (122)188-198.

Dai, Y., Van Spronsen, J., Witkamp, G. J., Verpoorte, R. y Choi, Y. H. (2013). Ionic liquids and deep eutectic solvents in natural products research: mixtures of solids as extraction solvents. *Journal of Natural Products*, 76(11), 2162-2173.

de María, P. D. y Maugeri, Z. (2011). Ionic liquids in biotransformations: from proof-of-concept to emerging deep-eutectic-solvents. *Current Opinion in Chemical Biology*, 15(2), 220-225.

Domínguez de María, P., Guajardo, N., & Kara, S. (2019). Enzyme catalysis: In DES, with DES, and in the presence of DES. *Deep Eutectic Solvents: Synthesis, Properties, and Applications*, 257-271.

Egmond M.R., de Vlieg J. (2000). *Fusarium solani pisi* cutinase. *Biochimie*, (82), 1015–1021.

El Achkar, T., Fourmentin, S. y Greige-Gerges, H. (2019). Deep eutectic solvents: An overview on their interactions with water and biochemical compounds. *Journal of Molecular Liquids*, 288, 111028.

Erbeldinger, M., Mesiano, A. J. y Russell, A. J. (2000). Enzymatic catalysis of formation of Z-aspartame in ionic liquid– an alternative to enzymatic catalysis in organic solvents. *Biotechnology Progress*, 16(6), 1129-1131.

Esquembre, R., Sanz, J. M., Wall, J. G., del Monte, F., Mateo, C. R. y Ferrer, M. L. (2013). Thermal unfolding and refolding of lysozyme in deep eutectic solvents and their aqueous dilutions. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15(27), 11248-11256.

Ezgi Ünlü A., Arikaya A. y Takac, (2019). Use of Deep eutectic solvent as catalyst: A mini-review. *Green Process Synth*, (8) 355-372.

Farres G. A., Peña M.C., Hernández D. E., Morales G. S., Sánchez S. M., Solís B., Recombinant cutinases from *Aspergillus nidulans* for the degradation of polyesters, México, MX/006869.

Ghaderian, A., Haghghi, A. H., Taromi, F. A., Abdeen, Z., Boroomand, A. y Taheri, S. M. R. (2015). Characterization of rigid polyurethane foam prepared from recycling of PET waste. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, 59(4), 296-305.

Geyer, B., Lorenz, G., y Kandelbauer, A. (2016). Recycling of poly (ethylene terephthalate)-A review focusing on chemical methods. *Express Polymer Letters*, 10(7).

Gorke, J., Srienc, F. y Kazlauskas, R. (2010). Toward advanced ionic liquids. Polar, enzyme-friendly solvents for biocatalysis. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15(1), 40-53.

Gutiérrez, M. C., Ferrer, M. L., Yuste, L., Rojo, F. y del Monte, F. (2010). Bacteria incorporation in deep-eutectic solvents through freeze-drying. *Angewandte Chemie*, 122(12), 2204-2208.

Hae C. Y. y Verpoorte R. (2019). Green solvents for the extraction of bioactive compounds from natural products using ionic liquids and deep eutectic solvents. *Current Opinion in Food Science*, 26:87-93.

Hammond, O. S., Bowron, D. T. y Edler, K. J. (2017). The effect of water upon deep eutectic solvent nanostructure: an unusual transition from ionic mixture to aqueous solution. *Angewandte Chemie International Edition*, 56(33), 9782-9785.

Huang, Z. L., Wu, B. P., Wen, Q., Yang, T. X. y Yang, Z. (2014). Deep eutectic solvents can be viable enzyme activators and stabilizers. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 89(12), 1975-1981.

Imran, M., Al-Masry, W. A., Mahmood, A., Hassan, A., Haider, S. y Ramay, S. M. (2013). Manganese-, cobalt-, and zinc-based mixed-oxide spinels as novel catalysts for the chemical recycling of poly (ethylene terephthalate) via glycolysis. *Polymer Degradation and Stability*, 98(4), 904-915.

Jaeger K-E., Dijkstra B. W., Reetz M.T. (1999). Bacterial biocatalysis: molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases, *Annual Review of Microbiology*, (53), 315-351.

Jiménez Herrero L.M., Pérez L.E., Valero C.A., Cerdá E., Sanz L. F. J., Martínez F. J., Molina A., Morató J., Tollín N., Villanueva B., de Benito B., (2019). Economía Circular-Espiral: Transición hacia un metabolismo económico cerrado. *Editorial del Economista*, 27-33.

Kawai, F., Oda, M., Tamashiro, T., Waku, T., Tanaka, N., Yamamoto, M., & Tanokura, M. (2014). A novel  $\text{Ca}^{2+}$  activated, thermostabilized polyesterase capable of hydrolyzing polyethylene terephthalate from *Saccharomonospora viridis* AHK190. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(24), 10053-10064.

Kawai F., Kawabata T. y Oda M., (2019). Current knowledge on enzymatic PET degradation and its possible application to waste stream management and other fields, *Applied Microbiology and Biotechnology*, (103), 4253-4268.

Khoonkari M., Haghghi A.H. Sefidbakht Y., Shekoohi K., Ghaderian A. (2015). Chemical recycling of PET wastes with different catalysts, *International Journal of Polymer Science*. ID 124524.

Kim, H. R., & Song, W. S. (2010). Optimization of papain treatment for improving the hydrophilicity of polyester fabrics. *Fibers and Polymers*, 11(1), 67-71.

Llanos A. C. (2018). Aplicación de las cutinasas recombinantes ANCUT3 y ANCUT4 provenientes de *Aspergillus nidulans* en la degradación de poliésteres. Tesis para obtener el título de Maestra en Ciencias, UNAM, Facultad de Química, México. Cd. De México.

Miranda- Molina A., Xolalpa W., Strompen S., Arreola-Barroso R., Olvera L., López Munguía A., Castillo E. y Saab-Rincon G. (2019). Deep eutectic solvents as new reaction media to produce alkyl-glycosides using alpha-amylase from *Thermotoga maritima*. *International Journal of Molecular Sciences*. (20) 5439.

Morales S. L., (2015). Purificación y caracterización de la enzima recombinante ANCUT2 de *Aspergillus nidulans*, Tesis para obtener el título de Química de Alimentos, UNAM, Facultad de Química, México. D.F., México.

Morales S. L., (2018). Degradación de polietilen tereftalato (PET) con las cutinasas recombinantes ANCUT1 y ANCUT2 de *Aspergillus nidulans*, Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias, UNAM, Facultad de Química, México. D.F., México.



Müller R-J, Schrandt H., Profe J., Dresler K., Deckwet W-D., (2005). Enzymatic degradation of poly (ethylene terephthalate): rapid hydrolysis using a hydrolase from *T. fusca*, *Macromolecular Rapid Communications*, (26), 1400-1405.

Nian B., Cao C. y Liu Y., (2019). How *Candida antarctica* lipase B can be activated in natural deep eutectic solvents: experimental and molecular dynamics studies. *Journal of Chemistry Technology and Biotechnology*, (95)86-93.

Ramírez-Hernández, A., Aparicio-Saguilán, A., Conde-Acevedo, J. C. y Valera-Zaragoza, M. (2015). Comportamiento térmico de películas de almidón de plátano con poli (etileno tereftalato) degradado. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 14(2), 513-521.

Sanchez-Fernandez, A. y Jackson, A. J. (2021). Proteins in deep eutectic solvents: Structure, dynamics, and interactions with the solvent. *Advances in Botanical Research* (97), 69-94. Academic Press.

Segura, D., Noguez, R. y Espín, G. (2007). Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables. *Biotecnología*, 14(3), 361-372.

Seymour R. B., y Carraher J. C. E., (1995). *Introducción a la Química de los Polímeros*, Reverté (pp. 29-30).

Sinha V., Patel M.R. y Patel J. V., (2010). PET waste management by chemical recycling: a review, *Journal of Polymers, and the Environment*, (18), 8–25.

Solís B. I., (2015). Producción, purificación y caracterización de la cutinasa recombinante ANCUT1 producida en *Pichia pastoris*, Tesis para obtener el título de Química de Alimentos, UNAM, Facultad de Química, México. D.F., México.

Smith, E. L., Abbott, A. P. y Ryder, K. S. (2014). Deep eutectic solvents (DESs) and their applications. *Chemical Reviews*, 114(21), 11060-11082.

Swatloski, R. P., Spear, S. K., Holbrey, J. D. y Rogers, R. D. (2002). Dissolution of cellulose with ionic liquids. *Journal of the American Chemical Society*, 124(18), 4974-4975.

Tan, Y., Henahan, G. T., Kinsella, G. K. y Ryan, B. J. (2021). Cutinase from *Amycolatopsis mediterannei*: Marked activation and stabilisation in Deep Eutectic Solvents. *Bioresource Technology Reports*, 16, 100882.

Tournier, V., Topham, C. M., Gilles, A., David, B., Folgoas, C., Moya-Leclair, E., & Marty, A. (2020). An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles. *Nature*, 580(7802), 216-219.

Ünlü, A. E., Arıkaya, A. y Takaç, S. (2019). Use of deep eutectic solvents as catalyst: A mini-review. *Green Processing and Synthesis*, 8(1), 355-372.

Vertommen, M. A. M. E., Nierstrasz, V. A., Van Der Veer, M. y Warmoeskerken, M. M. C. G. (2005). Enzymatic surface modification of poly (ethylene terephthalate). *Journal of biotechnology*, 120(4), 376-386.

Vele Salto, A. M., Abril González, M. F., Zalamea Piedra, T. S. y Pinos Vélez, V. P. (2021). Mini revisión: aplicación de líquidos iónicos en hidrólisis ácida de material lignocelulósico para la obtención de azúcares. *Ciencia en Desarrollo*, 12(1), 55-67.

Wang H., Liu Y., Li Z., Zhang X., Zhang S., Zhang Y., (2008). Glycolysis of poly (ethylene terephthalate) catalyzed by ionic liquids. *European Polymer Journal*. (45) 1535-1544.

Wang H., Li Z., Liu Y. Zhang X., Zhang S., (2009). Degradation of poly (ethylene terephthalate) using ionic liquids. *Green Chemistry*, (11), 1568–1575.

Wang Q., Yao X., Geng Y., Shou Q., Lu X., y Zhang S., (2015). Deep eutectic solvents as a highly active catalysts for the fast and mild glycolysis of poly/ethylene terephthalate (PET). *Green Chemistry*,. (11), 1568-1575.

Wei R. y Zimmerman W., (2017). Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we? *Microbial Biotechnology*., (10) 1308-1322.

Zhang, Q., Vigier, K. D. O., Royer, S. y Jerome, F. (2012). Deep eutectic solvents: syntheses, properties, and applications. *Chemical Society Reviews*, 41(21), 7108-7146.

Zhou L., Lu X., Ju Z., Liu B., Yao H., Xu J., Zhou Q., Hu Y. y Zhang S. (2019). Alcoholysis of polyethylene terephthalate to produce dioctyl terephthalate using choline chloride-based deep eutectic solvents as efficient catalysts. *Green Chemistry*. Royal Society of Chemistry. (21) 897.