



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Químicas - Programa de Doctorado en Ciencias con Mención en
Química

**OBTENCIÓN DE MICROESFERAS POLIMÉRICAS CON
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PARA LA DEGRADACIÓN
CATALÍTICA DE PLAGUICIDAS EN MEDIO ACUOSO**



Tesis para optar al grado de Doctora en Ciencias con Mención en Química

MYLEIDI VERA OTERO
CONCEPCIÓN - CHILE
Enero-2019

Profesor guía: Bernabé Luis Rivas Quiroz
Departamento de Polímeros, Facultad de Ciencias Químicas
Universidad de Concepción

©2019, MYLEIDI VERA OTERO. Ninguna parte de esta tesis puede reproducirse o transmitirse bajo ninguna forma o por ningún medio o procedimiento, sin permiso por escrito del autor.



COMISIÓN EVALUADORA:

Dr. Bernabé L. Rivas Q.
Profesor guía



Dr. Julio Belmar M
Evaluador interno

Dra. Susana Sánchez D.
Evaluadora interna

Dr. Luis Hernán Tagle D.
Evaluador externo



A Dios y a mi familia
Mis papás Ramón y Jenny
Mis hermanos Ramón A. y Jhon F.
y mi abuela Asceneth

AGRADECIMIENTOS

La autora agradece a las siguientes entidades y personas que con su ayuda hicieron posible desarrollar totalmente la presente tesis doctoral.

A mi profesor guía, el Dr. Bernabé L. Rivas por permitirme realizar mi trabajo de investigación bajo su dirección, por la buena disposición, confianza, apoyo y valiosos aportes durante todo este proceso.

A la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica, CONICYT, por la beca de doctorado nacional N° 21150178.

A la Universidad de Concepción, en especial a la Facultad de Ciencias Químicas, la Dirección de Posgrado y a la red doctoral, REDOC.

A los miembros de la comisión evaluadora Dr. Julio Belmar M., a la Dra. Susana Sánchez D. y al Dr. Luis Hernán Tagle D. por sus valiosos aportes en la revisión de esta tesis doctoral.

A los profesores Gibson S. Nyanhongo y Katja Loos por permitirme realizar mis pasantías en sus grupos de investigación. Así como también a los compañeros de laboratorio de ambos centros, por sus consejos y disponibilidad en todo momento.

Al profesor Eduardo Pereira y a su grupo de investigación por haberme permitido realizar parte de mi trabajo en su laboratorio y por hacerme sentir como un miembro de su equipo.

A mis compañeros del laboratorio y en especial a la químico analista Lorena Leyton, que con su buena energía, hicieron que todo este proceso fuera más agradable.

Agradecimientos especiales a todos los miembros de mi familia que sin duda son mi motivación más grande, en particular a mi abuela y a mi padre, que a pesar de la distancia siempre creyeron en mí y gracias a su amor incondicional todo esto fue posible.

A Yadiris García, quien me apoyó, motivo y creyó en mí durante todo este tiempo, logrando que creciera no sólo como persona, sino también como profesional.

Y finalmente, gracias a todos mis amigos que se volvieron como mi familia, estando en las buenas y en las malas, haciendo que el paso por el doctorado estuviese lleno de aventuras, confidencialidad y amor.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABLAS	XIV
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	XVI
RESUMEN	XIX
ABSTRACT	XX
PRÓLOGO	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Plaguicidas	3
1.2 Degradación de plaguicidas	5
1.3 Enzimas lacasas	6
1.4 Inmovilización enzimática	10
1.5 Polimerización por dispersión	13
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	15
3. SÍNTESIS DE MICROESFERAS POLIMÉRICAS: SELECCIÓN DEL SOPORTE ADECUADO PARA LA INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS LACASA	16
3.1 Introducción	16
3.2 Metodología	17
3.2.1 Obtención de los soportes poliméricos para la inmovilización enzimática	17
3.2.2 Caracterización de las microesferas PGMA y PGMA-NH ₂	19
3.2.3 Determinación de la concentración de proteína	20
3.2.4 Inmovilización de la lacasa Trametes versicolor sobre microesferas de PGMA y PGMA-NH ₂	20
3.2.5 Determinación de la actividad de la enzima TvL libre e inmovilizada	22
3.2.6 Efecto del pH sobre la actividad de las enzimas TvL libre e inmovilizada	23

3.2.7	Estabilidad térmica de TvL libre e inmovilizada _____	24
3.2.8	Determinación de los parámetros cinéticos _____	24
3.2.9	Reusabilidad y estabilidad de almacenamiento _____	24
3.3	Resultados y discusión _____	25
3.3.1	Síntesis y caracterización de las microesferas poliméricas _____	25
3.3.2	Optimización de las condiciones de inmovilización enzimática mediante análisis estadístico _____	32
3.3.3	Efecto del pH y la temperatura sobre la enzima lacasa libre e inmovilizada _____	36
3.3.4	Parámetros cinéticos _____	38
3.3.5	Reusabilidad y estabilidad de almacenamiento _____	40
3.4	Conclusiones _____	43
4.	CO-INMOVILIZACIÓN DE DOS ENZIMAS LACASA Y SU APLICACIÓN EN LA DEGRADACIÓN DE DIAZINON _____	44
4.1	Introducción _____	44
4.2	Metodología _____	45
4.2.1	Inmovilización de las enzimas lacasa _____	45
4.2.2	Determinación de la actividad enzimática _____	45
4.2.3	Caracterización de las enzimas libres e inmovilizadas _____	46
4.2.4	Análisis estadístico de los datos _____	46
4.2.5	Degradación de diazinon usando el sistema de enzimas co-inmovilizadas _____	47
4.2.6	Análisis de la degradación de diazinon _____	47
4.3	Resultados y discusión _____	48
4.3.1	Inmovilización de las enzimas lacasa _____	48
4.3.2	Efecto del pH y la temperatura en las enzimas libres e inmovilizadas _____	49
4.3.3	Estudios de reusabilidad y estabilidad de almacenamiento _____	51
4.3.4	Degradación enzimática de diazinon _____	54
4.4	Conclusiones _____	56

5.	CO-INMOVILIZACIÓN DE TRES ENZIMAS LACASA Y SU APLICACIÓN EN LA DEGRADACIÓN DE AZINFOS-METIL _____	58
5.1	Introducción _____	58
5.2	Metodología _____	59
5.2.1	Purificación de la enzima MtL y determinación del peso molecular de todas las enzimas de trabajo _____	59
5.2.2	Optimización de la inmovilización de la enzima MtL _____	59
5.2.3	Inmovilización y co-inmovilización de las enzimas TvL, MtL y ApL _____	61
5.2.4	Caracterización enzimática _____	62
5.2.5	Degradación de azinfos-metil _____	63
5.2.6	Análisis de la degradación de AZPM _____	64
5.3	Resultados y discusión _____	65
5.3.1	Purificación de MtL y determinación del peso molecular de las enzimas de trabajo _____	65
5.3.2	Inmovilización enzimática _____	66
5.3.3	Efecto del pH sobre la actividad de las enzimas _____	70
5.3.4	Estabilidad térmica _____	72
5.3.5	Reusabilidad y estabilidad de almacenamiento _____	74
5.3.6	Parámetros cinéticos _____	76
5.3.7	Degradación de azinfos-metil _____	77
5.4	Conclusiones _____	82
6.	CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS _____	84
6.1	Conclusiones _____	84
6.2	Perspectivas _____	86
7.	PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS _____	87
8.	REFERENCIAS _____	90
9.	INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA _____	106

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1.1. Representación esquemática de centros de coordinación de cobre y los ligandos relevantes para enzima lacasa (Adaptado de Barrios, C. et al. ⁶⁵)	7
Fig. 1.2. Ciclo catalítico de la enzima lacasa (Adaptado de Barrios, C. et al. ⁶⁵)	8
Fig. 1.3. Estructura de los mediadores más utilizados (Fuente: Elaboración propia)	9
Fig. 1.4. Tipos de inmovilización enzimática. (A) Atrapamiento, (B) Anclaje a un soporte y (C) Agregados (Fuente: Elaboración propia)	10
Fig. 1.5. Esquema general de una polimerización por dispersión. (A) Etapa de nucleación, (B) etapa de crecimiento y (C) formación de microesferas poliméricas (Fuente: Elaboración propia)	14
Fig. 3.1. Esquema de la funcionalización con grupos hidrazida de las microesferas de PGMA (Adaptado de M. Vera et al. ⁸⁴)	18
Fig. 3.2. Micrografías de los productos de la polimerización por dispersión para (A) PHEMA, (B) PGMA, (C) PAGE, (D) P(HEMA-AGE) (Fuente: Elaboración propia)	26
Fig. 3.3. Micrografías de microesferas de PGMA para (A) centrifugados (B) lavados en un vaso de precipitado (Fuente: Elaboración propia)	27
Fig. 3.4. Micrografía de las microesferas de PGMA obtenidas mediante polimerización por dispersión (Fuente: Elaboración propia)	28
Fig. 3.5. Espectros FTIR de las microesferas de PGMA y PGMA-NH ₂ (Adaptado de M. Vera, et al. ⁸⁴)	29
Fig. 3.6. Difractograma DRX de las microesferas de PGMA y PGMA-NH ₂ (Adaptado de M. Vera, et al. ⁸⁴)	30
Fig. 3.7. Termogramas de TGA y DTG bajo atmósfera de nitrógeno para microesferas de PGMA (Fuente: elaboración propia)	31
Fig. 3.8. Termogramas de DSC bajo atmósfera de nitrógeno de las microesferas de PGMA (Fuente: Elaboración propia)	32

Fig. 3.9 Superficies de respuesta obtenidas al evaluar la EI de la enzima TvL sobre microesferas de PGMA (A, C y E) y PGMA-NH₂ (B, D y F). En (A) y (B) se evaluó la respuesta a diferentes tiempos de contacto y pH, manteniendo las concentraciones de enzima constantes en 10.1 mg/mL y 20 mg/mL, respectivamente. En (C) y (D) se evaluó el efecto de la concentración de enzima y el tiempo a valores de pH constantes de 4.25 y 5.50 respectivamente. En (E) y (F) se evaluó el efecto de la concentración de enzimas y el pH a tiempos constantes de 1.0 h y 12.5 h (Adaptado de M. Vera, *et al.*⁸⁴) _____35

Fig. 3.10. Actividad relativa de la enzima TvL libre e inmovilizada sobre microesferas de PGMA y PGMA-NH₂ a diferentes valores de pH. Todos los experimentos se realizaron por triplicado a 25 °C y se muestran con la correspondiente desviación estándar (Adaptado de M. Vera, *et al.*⁸⁴) _____37

Fig. 3.11. Actividad relativa de la enzima TvL libre e inmovilizada sobre microesferas de PGMA y PGMA-NH₂ a diferentes valores de temperatura. Todos los experimentos se realizaron por triplicado a pH 3.0 y se muestran con la correspondiente desviación estándar (Adaptado de M. Vera, *et al.*⁸⁴) _____38

Fig. 3.12. Análisis de reusabilidad de la enzima TvL inmovilizada sobre microesferas de PGMA y PGMA-NH₂. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se muestran con la correspondiente desviación estándar (Adaptado de M. Vera, *et al.*⁸⁴) _____40

Fig. 3.13. Análisis de estabilidad de almacenamiento de la enzima TvL libre e inmovilizada sobre microesferas de PGMA y PGMA-NH₂. Todos los experimentos se realizaron por triplicado a 25 °C y se muestran con la correspondiente desviación estándar (Adaptado de M. Vera, *et al.*⁸⁴) _____41

Fig. 3.14. Estructura tridimensional de la enzima TvL obtenida a partir de difracción de rayos X (RCSB Protein Data Bank: 1GYC¹¹⁷) con los grupos lisina marcados (Fuente: Elaboración propia) _____42

Fig. 4.1. Efecto del pH sobre las enzimas libres, inmovilizadas y co-inmovilizadas. Se muestra el valor promedio de tres medidas con la correspondiente desviación estándar en cada caso (Fuente: Elaboración propia) _____50

Fig. 4.2. Efecto de la temperatura sobre las enzimas libres, inmovilizadas y co-inmovilizadas. Se muestra el valor promedio de tres medidas con la correspondiente desviación estándar en cada caso (Fuente: Elaboración propia) _____51

Fig. 4.3. Estudios de reusabilidad del sistema de enzimas co-inmovilizadas sobre microesferas de PGMA. Las medidas se realizaron por triplicado y se muestran con la correspondiente desviación estándar en cada caso (Fuente: Elaboración propia) _____52

Fig. 4.4. Estabilidad de almacenamiento de las enzimas libres e inmovilizadas almacenadas a 4 °C. Las medidas se realizaron por triplicado y se muestran con la correspondiente desviación estándar (Fuente: Elaboración propia) _____53

Fig. 4.5. Análisis de diazinon por HPLC-DAD: (A) cromatogramas del estándar y (B) curva de calibración (Fuente: Elaboración propia) _____54

Fig. 4.6. Degradación de diazinon usando el sistema de enzimas co-inmovilizadas con TvL y AbL. Todos los experimentos se realizaron por duplicado y son reportados con la correspondiente desviación estándar (Fuente: Elaboración propia) _____56

Fig. 5.1. Muestras de (A) MtL y (B) SDS-PAGE de MtL antes y después de la purificación y (C) SDS-PAGE de MtL, TvL y ApL (Adaptado de M. Vera, *et al.*⁴⁷) __66

Fig. 5.2. Gráficas de contorno de superficie respuesta para (A) molaridad de buffer y pH manteniendo la concentración de enzima constante (1.0 mg/mL, 10 %), (B) concentración de enzima y pH a molaridad de buffer constante (0.05 mol/L), y (C) concentración de enzima y molaridad de buffer a pH constante (5.5) (Adaptado de M. Vera, *et al.*⁴⁷ ____68

Fig. 5.3. Micrografía SEM representativa de las microesferas de PGMA antes (A) y después de la co-inmovilización (B) de las enzimas TvL, ApL, y MtL (Fuente: Elaboración propia) _____70

Fig. 5.4. Actividad a diferentes valores de pH para las enzimas TvL, MtL y ApL (A) libres, (B) inmovilizadas individualmente y (C) biocatalizador polimérico. Todas las medidas se realizaron por triplicado y se representan con su correspondiente desviación estándar (Fuente: Elaboración propia) _____72

Fig. 5.5. Efecto de la temperatura sobre la actividad de (A) TvL libre e inmovilizada, (B) MtL libre e inmovilizada, (C) ApL libre e inmovilizada, y (D) enzimas co-inmovilizadas y las inmovilizadas individualmente. Todas las medidas se realizaron por triplicado y están reportadas con su correspondiente desviación estándar (Fuente: Elaboración propia)

73

Fig. 5.6. Estudios de reusabilidad del sistema de enzimas co-inmovilizadas sobre microesferas de PGMA a los 3 valores de pH de máxima actividad. Las medidas se realizaron por triplicado y se muestran con su correspondiente desviación estándar (Fuente: Elaboración propia)

74

Fig. 5.7. Estudios de estabilidad de almacenamiento a 25 y 4 °C de las enzimas libres e inmovilizadas provenientes de (A) MtL, (B) TvL, (C) ApL. Comparación de las enzimas inmovilizadas y el sistema de enzimas co-inmovilizadas a 4 °C (D). Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se muestran con su respectiva desviación estándar (Fuente: Elaboración propia)

76

Fig. 5.8. Análisis de AZPM por HPLC-DAD: (A) cromatogramas de los estándares y (B) curva de calibración. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se muestran con su respectiva desviación estándar (Fuente: Elaboración propia)

78

Fig. 5.9. Porcentaje de degradación de AZPM con y sin ABTS utilizando la enzima MtL libre e inmovilizada. Los experimentos se realizaron por duplicado y se muestran con sus respectivas desviaciones estándar (Fuente: Elaboración propia)

79

Fig. 5.10. Porcentaje de degradación de AZPM con y sin ABTS a los valores de pH óptimos del sistema de enzimas inmovilizadas. Los experimentos se realizaron por duplicado y se muestran con las respectivas desviaciones estándar (Fuente: Elaboración propia)

82

Fig. S5.1. Gráficas de Michaelis-Menten de la enzima MtL libre (A) e inmovilizada (C) en las cuales se varió la concentración de sustrato (ABTS) en el rango de 1.0 – 20.0 mM. Adicionalmente se muestran las gráficas de Lineweaver-Burk de la enzima MtL libre (B) e inmovilizada (D). Todas las medidas se realizaron por triplicado a 25 °C y se muestran con su respectiva desviación estándar (Adaptado de M. Vera, *et al.*⁴⁷)

111

Fig. S5.2. Gráficas de Michaelis-Menten de la enzima TvL libre (A) e inmovilizada (C) en las cuales se varió la concentración de sustrato (ABTS) en el rango de 1.0 – 20.0 mM. Adicionalmente se muestran las gráficas de Lineweaver-Burk de la enzima TvL libre (B) e inmovilizada (D). Todas las medidas se realizaron por triplicado a 25 °C y se muestran con la desviación estándar (Fuente: Elaboración propia) _____ 112

Fig. S5.3. Gráficas de Michaelis-Menten de la enzima ApL libre (A) e inmovilizada (C) en las cuales se varió la concentración de sustrato (ABTS) en el rango de 1.0 – 20.0 mM. Adicionalmente se muestran las gráficas de Lineweaver-Burk de la enzima ApL libre (B) e inmovilizada (D). Todas las medidas se realizaron por triplicado a 25 °C y se muestran con su respectiva desviación estándar (Fuente: Elaboración propia)._____ 113



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Estructura y características de diazinon y azinfos-metil ¹⁸⁻²³	4
Tabla 3.1. Condiciones para la síntesis de microesferas poliméricas (Fuente: Elaboración propia)	17
Tabla 3.2. Variables y niveles establecidos en el DBB para la inmovilización de TvL sobre microesferas de PGMA y PGMA-NH ₂ (Fuente: Elaboración propia)	21
Tabla 3.3. Valores de los coeficientes de extinción molar del ABTS a diferentes valores de pH*	23
Tabla 3.4. Parámetros cinéticos de la enzima TvL libre e inmovilizada (Fuente: Elaboración propia)	39
Tabla 4.1. Lacasas inmovilizadas y co-inmovilizadas sobre microesferas de PGMA (Fuente: Elaboración propia)	49
Tabla 5.1. Variables y niveles establecidos en el DBB para la inmovilización de la enzima MtL (Fuente: Elaboración propia)	60
Tabla 5.2. Actividad de las enzimas inmovilizadas individualmente y cantidad de proteína usada en las estrategias de co-inmovilización (Fuente: Elaboración propia)	62
Tabla 5.3. Parámetros cinéticos de enzimas libres e inmovilizadas individualmente (Fuente: Elaboración propia)	77
Tabla S3.1. Valores de variables independientes generados tras evaluar las condiciones experimentales propuestas por el diseño de Box-Behnken (Fuente: Elaboración propia)	106
Tabla S3.2. Análisis de varianza para el modelo cuadrático de superficie respuesta para la inmovilización de la enzima TvL sobre las microesferas de PGMA (Fuente: Elaboración propia)	107
Tabla S3.3. Análisis de varianza para el modelo cuadrático de superficie respuesta para la inmovilización de la enzima TvL sobre las microesferas de PGMA-NH ₂ (Fuente: Elaboración propia)	108
Tabla S5.1. Valores de variables dependientes e independientes generados tras evaluar las condiciones experimentales propuestas por el diseño de Box-Behnken en la inmovilización de MtL (Fuente: Elaboración propia)	109

Tabla S5.2. Análisis de varianza para el modelo cuadrático de superficie respuesta para la inmovilización de la enzima MtL sobre las microesferas de PGMA (Fuente: Elaboración propia) _____110



ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Acrónimos

AbL	Lacasa <i>Agaricus bisporus</i>
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
AGE	Alil glicidil éter
ANOVA	Análisis de varianza
ApL	Lacasa <i>Aspergillus sp</i>
AZPM	Azinfos-metil
¹³ C RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
DBB	Diseño estadístico de Box-Behnken
DRX	Difracción de rayos X
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
DTG	Derivada de los valores obtenidos del análisis termogravimétrico
EDX	Dispersión de energía de rayos X
EGDMA	Etilenglicol dimetacrilato
EI	Eficiencia de inmovilización
FTIR	Infrarrojo con transformada de Fourier
GMA	Glicidil metacrilato
HEMA	Hidroxietil metacrilato
HPLC-DAD	Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos
MSR	Metodología de superficie respuesta
MtL	Lacasa de <i>Myceliophthora thermophila</i>
PGMA	Poli(glicidil metacrilato)
PGMA-NH ₂	Poli(glicidil metacrilato) con grupos hidrazida
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfonato de sodio
SEM	Microscopía electrónica de barrido
TGA	Análisis termogravimétrico
TvL	Lacasa <i>Trametes versicolor</i>
UV-vis	Ultravioleta-visible

Símbolos griegos

α_i	Actividad de la enzima inmovilizada
α_f	Actividad de la enzima libre
ΔA	Cambio en la absorbancia a 420 nm
Δt	Tiempo de reacción
β_0	Intercepto en el diseño de Box-Behnken
β_1	Coefficiente lineal 1 en el diseño de Box-Behnken
β_2	Coefficiente lineal 2 en el diseño de Box-Behnken
β_3	Coefficiente lineal 3 en el diseño de Box-Behnken
β_{11}	Coefficiente cuadrático 1 en el diseño de Box-Behnken
β_{22}	Coefficiente cuadrático 2 en el diseño de Box-Behnken
β_{33}	Coefficiente cuadrático 3 en el diseño de Box-Behnken
β_{12}	Coefficiente de interacción 1 en el diseño de Box-Behnken
β_{13}	Coefficiente de interacción 2 en el diseño de Box-Behnken
β_{23}	Coefficiente de interacción 3 en el diseño de Box-Behnken
E	Coefficiente de extinción molar

Símbolos latinos

A	Actividad de la enzima
D	Dispersidad
D_i	Diámetro de cada partícula
D_n	Diámetro promedio
D_w	Peso promedio
F	Factor de dilución empleado
K_{cat}	Número de recambio
K_M	Constante de Michaelis-Menten
K_{cat}/K_M	Eficiencia catalítica
N	Número total de partículas analizadas
R^2	Coefficiente de determinación

T_g	Temperatura de transición vítrea
U	Unidad de medida para expresar la actividad enzimática
V	Volumen total de la reacción
V_e	Volumen de solución de enzima empleado
V_{max}	Velocidad máxima de la enzima
l	Longitud óptica



RESUMEN

Los plaguicidas de uso agrícola son sustancias ampliamente utilizadas para el control de cualquier tipo de plaga que afecte la calidad de los cultivos. Sin embargo, debido a su alta toxicidad y su impacto ambiental, se han propuesto muchos métodos para la degradación de estos compuestos, siendo el tratamiento con enzimas lacasa uno de los más prometedores debido a que es eficiente, rápido y ambientalmente amigable. No obstante, debido a la poca estabilidad de las enzimas libres, para que estas puedan utilizarse en aplicaciones reales deben ser inmovilizadas. Hasta el momento, la inmovilización individual ha demostrado ser exitosa en la biodegradación de contaminantes, sin embargo, existen casos en los que el uso de una sola enzima resulta insuficiente para catalizar una reacción química y se requieren reacciones en cascada o mayor control del pH en las soluciones. En esta misma línea de ideas, una alternativa para superar los inconvenientes mencionados anteriormente y expandir las posibles aplicaciones en un mismo sistema, es la inmovilización de dos o más enzimas (co-inmovilización).

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un robusto, sustentable y eficiente biocatalizador compuesto por diversas enzimas lacasa co-inmovilizadas sobre un soporte polimérico para su uso en la biodegradación de plaguicidas. Para lograrlo, en primer lugar se llevó a cabo la obtención del soporte, sintetizando microesferas de poli(glicidil metacrilato), con dos tipos de grupos funcionales superficiales (hidrazida y oxirano) y se estudió el efecto del grupo funcional en el soporte sobre la enzima inmovilizada. Una vez seleccionado el mejor soporte para la inmovilización, éste se utilizó en la construcción del primer biocatalizador polimérico compuesto por dos enzimas co-inmovilizadas y se determinó su eficiencia en la degradación del pesticida diazinon, obteniéndose degradaciones del 100 % a los dos valores de pH de máxima actividad. Finalmente, se llevó a cabo la construcción del segundo biocatalizador constituido por tres lacasas co-inmovilizadas. Este sistema se caracterizó y se evaluó en la degradación del pesticida azinfos-metil lográndose la total degradación de este compuesto a los tres valores de pH de máxima eficiencia. De este trabajo, se puede concluir que mediante la co-inmovilización de enzimas lacasa en microesferas poliméricas es posible obtener biocatalizadores que trabajen en un amplio rango de pH, con posibles aplicaciones en la degradación de compuestos recalcitrantes a nivel científico e industrial en el marco de la química verde.

ABSTRACT

Pesticides for agricultural use are substances widely used for the control of any type of pest that affects the quality of crops. However, due to its high toxicity and its environmental impact, many methods have been proposed for the degradation of these compounds, being treatment with laccase enzymes one of the most promising because it is efficient, fast and eco-friendly. However, they must be immobilized to be used in real applications. So far, individual immobilization of laccases has proven to be successful in the biodegradation of pollutants. Nevertheless, there are cases in which the use of a single enzyme is insufficient to catalyze a chemical reaction and cascade reactions or greater pH control are required in the solutions. In this same line of ideas, an alternative to overcome the drawbacks mentioned above and expand the possible applications in the same system, is the immobilization of two or more enzymes (co-immobilization).

The objective of this work was to develop a robust, sustainable and efficient biocatalyst composed of various co-immobilized laccase enzymes on a polymeric support for use in the biodegradation of pesticides. To achieve this, the support was first obtained by synthesizing poly(glycidyl methacrylate) microspheres, with two types of superficial functional groups (hydrazide and oxirane) and the effect of the functional group on the support on the immobilized enzyme was studied. Once the best support for immobilization was selected, it was used in the construction of the first polymeric biocatalyst composed of two co-immobilized enzymes and its efficiency in the degradation of the pesticide diazinon was determined, obtaining 100% degradations at the two pH values of maximum activity. Finally, the construction of the second biocatalyst constituted by three co-immobilized laccases was carried out. This system was characterized and evaluated in the degradation of the azinphos-methyl pesticide, achieving the total degradation of this compound at the three maximum efficiency pH values. From this work, it can be concluded that by co-immobilizing laccase enzymes on polymeric supports it is possible to obtain biocatalysts that work in a wide range of pH with multiple applications in the degradation of recalcitrant compounds at a scientific and industrial level within the framework of the green chemistry.

PRÓLOGO

Este prólogo tiene como finalidad introducir al lector en la estructura y organización de esta tesis doctoral, la cual se ha dividido en 8 capítulos, 3 de ellos escritos en forma de artículos científicos. En el capítulo 1 se presenta la revisión bibliográfica con respecto al uso de plaguicidas, métodos de degradación, enzimas y la inmovilización enzimática (artículo de revisión enviado a la revista *Polymer Reviews*). En el capítulo 2 se detallan las hipótesis y objetivos planteados en esta tesis. En el capítulo 3 muestra la síntesis del soporte polimérico a utilizar en la inmovilización enzimática y se determina el grupo funcional que genera las mejores propiedades en la enzima inmovilizada (artículo científico publicado en la revista *Journal of Applied Polymer Science*). Posteriormente, en el capítulo 4 se muestra la síntesis de un primer biocatalizador polimérico basado en la co-inmovilización de dos enzimas lacasas, el cual se caracterizó y se probó en la degradación de diazinon (artículo científico enviado a la revista *European Polymer Journal*). En el capítulo 5 se realizó la co-inmovilización de 3 enzimas, el biocatalizador polimérico obtenido se caracterizó y se evaluó en la degradación de azinfos-metil (un artículo científico publicado en la revista *Journal of Applied Polymer Science* y otro artículo en preparación). En el capítulo 6 se encuentran las conclusiones generales y las perspectivas. En el capítulo 7 se detallan las publicaciones y asistencias a congresos generados por el trabajo realizado en esta tesis y finalmente en el capítulo 8 se muestran las referencias bibliográficas revisadas en este trabajo.

Esta distribución, se desarrolló con el objetivo de hacer más amigable y entendible la lectura, siguiendo el mismo orden en que se plantearon los objetivos específicos, los cuales llevaron a comprobar las hipótesis propuestas.

1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo a los datos suministrados por el Banco Central de Chile, en el año 2018 el país presentó uno de los mayores incrementos en la economía de los últimos años, clasificando en el segundo trimestre como el país con el mayor crecimiento económico en toda Latinoamérica con un aumento del 2.8 % hasta el tercer trimestre de ese año¹. Este crecimiento económico estuvo estrechamente relacionado con el incremento que ha tenido la actividad agrícola de manera simultánea en el país. Esto refleja la importancia que tiene la agricultura en la economía de la nación y por lo tanto resulta indispensable garantizar una mejora en la producción agrícola. Una alternativa para lograr el incremento de la calidad y cantidad de estos productos, es el uso de plaguicidas que permitan el adecuado control de plagas, ya que son éstas una de las principales causas de la disminución en la producción agrícola y de la propagación de enfermedades como la malaria, el dengue y la filariasis².

Si bien, el uso de plaguicidas químicos posee múltiples ventajas tales como el manejo efectivo de las plagas, altos rendimientos de los cultivos y prevención de enfermedades transmitidas por insectos, estas sustancias también son conocidas por ser altamente tóxicas y bioactivas, cuyo uso está relacionado con el deterioro de la calidad del agroecosistema³, siendo una de las principales causas de la contaminación de aguas subterráneas y superficiales^{4,5}. Esto ha generado gran preocupación por la alteración de la calidad del agua y sus efectos adversos sobre la salud humana, lo que ha conducido a la búsqueda constante de técnicas para minimizar sus efectos sobre la comunidad. Es por ello que se han planteado múltiples métodos (químicos y biológicos) para la degradación de plaguicidas⁶⁻⁸. Sin embargo, la mayoría de los métodos propuestos hasta el momento no son los más idóneos ya que generan contaminación por el uso de solventes orgánicos, subproductos de degradación más tóxicos que los compuestos de partida, son de difícil implementación o requieren mucho tiempo para la degradación total^{9,10}.

Basado en lo expuesto previamente, es evidente la necesidad de la creación de un nuevo material que permita la degradación de plaguicidas y que pueda ser útil en la biorremediación de suelos y aguas, así como en el desarrollo de nuevos sistemas de control de calidad de aguas, contribuyendo al fortalecimiento del sector agrícola del país.

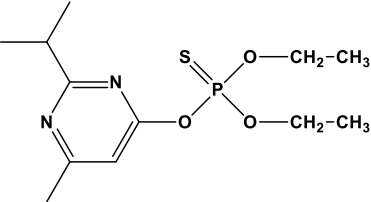
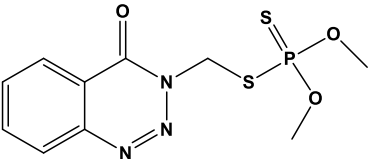
En este contexto, la presente tesis doctoral plantea la obtención de microesferas poliméricas con actividad enzimática para la degradación catalizada de plaguicidas de forma eficiente, ambientalmente amigable y en una variedad de condiciones de pH y temperatura. A continuación se detallan algunos aspectos que darán las herramientas necesarias para comprender a cabalidad el fundamento de esta tesis doctoral.

1.1 Plaguicidas

De acuerdo a la definición dada por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), los plaguicidas se definen como cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, enfermedad y maleza que afectan a los cultivos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladores del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o inhibidores de la germinación, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte¹¹.

Entre los plaguicidas más utilizados en Chile, se encuentran los que presentan como principio activo compuestos organofosforados (15.5 %)¹², estos compuestos actúan fosforilando la enzima acetilcolinesterasa en las terminaciones nerviosas, generando pérdida de la función enzimática y afectando el sistema nervioso en general^{13,14}, lo cual se manifiesta en cambios en el estado de conciencia, debilidad muscular, cefalea, ansiedad, visión borrosa, excesiva actividad secretora, entre otros^{15,16}. Entre estos compuestos, el diazinon y el azinfos-metil (AZPM) resaltan como algunos de los más utilizados tanto en Chile como a nivel mundial¹² y es por ello que serán los compuestos de estudio en esta tesis doctoral (ver Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Estructura y características del diazinon y azinfos-metil¹⁷⁻²².

Plaguicida	Diazinon	Azinfos-metil
Nombre científico	O,O-dietil-O-(2- isopropil-6-metilpirimidin-4 il)fosforotioato	(S)-[3,4-dihidro-4-oxobenzo(d)-(1,2,3)-triazin-3-ilmetil]-O,O-dimetil fosforoditioato
Estructura		
Solubilidad en agua a 20 °C (mg/L)	40	29
Presión de vapor a 20 °C (mmHg)	1.4×10^{-4}	7.5×10^{-9}
Constante de la ley de Henry (atm m ³ /mol)	1.4×10^{-6}	1.1×10^{-7}
Toxicidad*	Clase II (moderadamente peligroso)	Clase Ib (altamente peligroso)
Cultivos	Uvas, arroz, manzanas, peras, pistachos, y diversos cítricos.	Manzanas, peras, cerezas, ciruelas, limones y nogales.

*Clasificación dada por la Organización Mundial de la Salud²⁰.

Tanto el diazinon como el AZPM son organofosforados ampliamente utilizados en el control de insectos domésticos y en la agricultura²³. Debido a su gran eficiencia, son empleados en una gran variedad de cultivos, tal como se detalla en la Tabla 1.1. Estos compuestos son estables a pH 7, además, debido a que son relativamente solubles en agua y de acuerdo a sus valores de presión de vapor y constantes de la ley de Henry (Tabla 1.1), se sabe que no se volatilizan fácilmente en el agua o el suelo, lo que indica que pueden persistir en el ambiente²⁴.

Esta alta estabilidad, moderada solubilidad y persistencia en el suelo, facilita la contaminación de aguas subterráneas²⁵, fluviales urbanas²⁶, residuales²⁷, y aguas de consumo derivadas de la superficie²⁸. De hecho, se han encontrado concentraciones superiores a 3.0 mg/L en cuerpos de aguas superficiales adyacentes a los campos de cultivos²⁹. Además, en regiones donde es común el uso de estos plaguicidas como en el norte de la región patagónica en Argentina, se han encontrado concentraciones cercanas a 3.2 µg/L de AZPM en pozos de agua subterránea, siendo este compuesto el detectado

con mayor frecuencia durante el periodo de aplicación de plaguicidas³⁰. Estas altas concentraciones de plaguicida en cuerpos de aguas de la región, generan como consecuencia la presencia de plaguicidas en diversos productos agrícolas, afectando de este modo a organismos no objetivo, y representando un gran riesgo para la salud de los seres vivos^{6,31-33}.

1.2 Degradación de plaguicidas

Debido a la gran persistencia y toxicidad que presentan los plaguicidas organofosforados, durante décadas se han desarrollado diversos métodos químicos para su degradación, entre los que se encuentran la fotocatalisis, radiación UV, oxidación electroquímica o usando persulfato activado, irradiación con rayos gamma ionizados, el uso de rayos X y foto-Fenton^{23,34-37}. Sin embargo, muchos de estos tratamientos generan subproductos de degradación más tóxicos que el pesticida inicial, requieren reactivos tóxicos para su desarrollo, los cuales generan más contaminación como producto del tratamiento de descontaminación y además poseen altos costos asociados a su implementación^{7,35}.

Por otro lado, se encuentran las estrategias de degradación basadas en sistemas biológicos en las que se utilizan microorganismos tales como bacterias³⁸, hongos¹³, y microalgas³⁹. Cuando la degradación se lleva a cabo por estos sistemas, se denomina biodegradación, y consiste en el rompimiento de una molécula en pequeños fragmentos inertes¹³. Este proceso varía dependiendo del tipo de microorganismo presente, así como las condiciones de pH, temperatura, humedad, y presencia de luz/aire⁴⁰. En general, la biodegradación representa una alternativa ambientalmente amigable para la degradación de plaguicidas, la cual se lleva a cabo en condiciones suaves, es menos costosa que los métodos químicos, no requiere de sustancias químicas contaminantes y en la mayoría de los casos alcanza la degradación total de los compuestos recalcitrantes^{41,42}. Sin embargo, la implementación de sistemas de biodegradación empleando microorganismos de forma directa, tales como lechos biológicos o tratamientos ex/in-situ son engorrosos y en general estos sistemas requieren de mucho tiempo para la completa degradación, lo cual disminuye las posibilidades de que estos procesos se lleven a la práctica⁴³⁻⁴⁵.

En los últimos años, se ha propuesto el uso de enzimas microbianas aisladas de los microorganismos de los que provienen como catalizadores específicos en la degradación

de contaminantes, con el fin de superar las limitaciones asociadas al uso directo de microorganismos en la biodegradación⁴⁵. Hasta el momento, una gran variedad de enzimas han sido empleadas en la biodegradación, las cuales se pueden dividir en dos grandes grupos; (1) las oxidoreductasas, entre las que se encuentran las oxigenasas⁴⁶, lacasas⁴⁷, y peroxidasas⁴⁸; y (2) las hidrolasas, como lo son las lipasas⁴⁹, celulasas⁵⁰, carboxilesterasas⁵¹, y haloalcano dehalogenasas⁵². Entre las enzimas oxidativas, las lacasas, han demostrado ser útiles, versátiles, eficientes y poseer altas velocidades en la biodegradación de contaminantes orgánicos. Por ello que se plantean como una potencial alternativa para la degradación de plaguicidas, ya que conservan todas las ventajas asociadas al uso de microorganismos, pero adicionando las propiedades características de este tipo de enzimas oxidativas^{53,54}.

1.3 Enzimas lacasas

Las lacasas son enzimas multicobre extracelulares pertenecientes al grupo de las oxidasas azules, éste tipo de enzima fue descrita por Yoshida por primera vez en 1883⁵⁵, siendo una de las enzimas más antiguamente conocidas. Las lacasas se encuentran presentes en plantas superiores⁵⁶, hongos⁵⁷, bacterias⁵⁸, e insectos⁵⁹ y han demostrado ser excelentes biocatalizadores con múltiples posibles aplicaciones químicas, industriales y biotecnológicas^{60,61}. Todo esto debido a la capacidad que poseen de catalizar la oxidación de una amplia gama de sustratos (principalmente fenoles), utilizando oxígeno del aire, y produciendo agua como subproducto⁶². Entre las lacasas con mayor actividad catalítica se encuentran las provenientes de hongos, en los cuales se reporta la mayor presencia de estas, de hecho se han encontrado lacasas en prácticamente todos los hongos examinados⁶³ y en la mayoría coexisten varias de ellas, que con frecuencia difieren en su peso molecular. Por ejemplo en el caso del hongo *Rhizoctonia solani* se determinaron cuatro lacasas diferentes⁶⁴.

La actividad enzimática de las lacasas se encuentra vinculada a tres sitios de cobre, los cuales parecen conservarse en todas ellas. Sin embargo, en general estas enzimas presentan grandes diferencias entre sí (principalmente debido a los azúcares en su estructura proteínica), a tal punto que se ha considerado que debiesen subdividirse en

varios grupos (como en el caso de las lacasas blancas y las amarillas) y no clasificarse únicamente en función de sus sitios catalíticos, sin embargo, aún se conserva la división de acuerdo a su sitio catalítico⁶³. En términos generales, la estructura del sitio activo de las lacasas comprende tres dominios que por lo regular involucran cuatro átomos de cobre (Cu). Los sitios de cobre difieren en sus características espectroscópicas y paramagnéticas y se clasifican en tres grupos: Tipo 1 (T1, un átomo de Cu), Tipo 2 (T2, un átomo de Cu) y Tipo 3 (T3, dos átomos de Cu)⁶⁵, tal como se muestra en la Fig. 1.1.

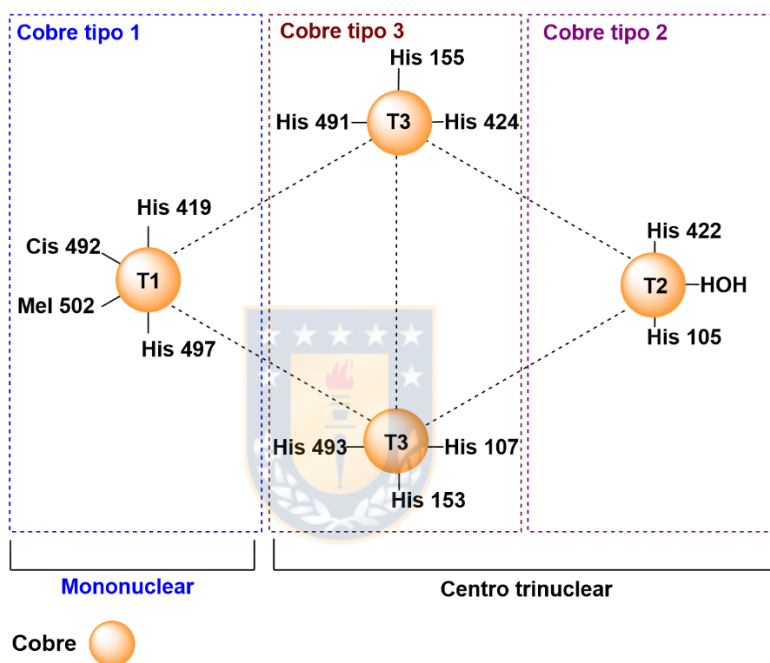


Fig. 1.1. Representación esquemática de centros de coordinación de cobre y los ligandos relevantes para enzima lacasa (Adaptado de *Barrios, C. et al.*⁶⁵).

En cuanto al mecanismo de acción de las lacasas, se ha propuesto que ocurre mediante un proceso de oxidación en el que cuatro moléculas del sustrato son oxidadas por un electrón en el sitio activo de la enzima, para finalmente reducir oxígeno a agua⁶⁵. En este mecanismo, el primer paso ocurre en el centro T1, donde se reciben los cuatro electrones provenientes de sustratos individuales, reduciendo el átomo de cobre de Cu (II) a Cu (I) y generando cationes radicales inestables, los cuales podrían experimentar más reacciones enzimáticas o no enzimáticas^{62,66}. Posteriormente, se lleva a cabo la transferencia de un electrón desde T1 al centro trinuclear T2/T3 mediante un puente de Histidina-Cistina-

Histidina (H-C-H). En este centro trinuclear es donde se produce finalmente la reducción del oxígeno a agua y después de la restauración interna de la estructura de la lacasa, esta vuelve a su forma oxidada⁶⁷. El ciclo catalítico se muestra en la Fig. 1.2, donde los átomos de cobre están representados en color naranja.

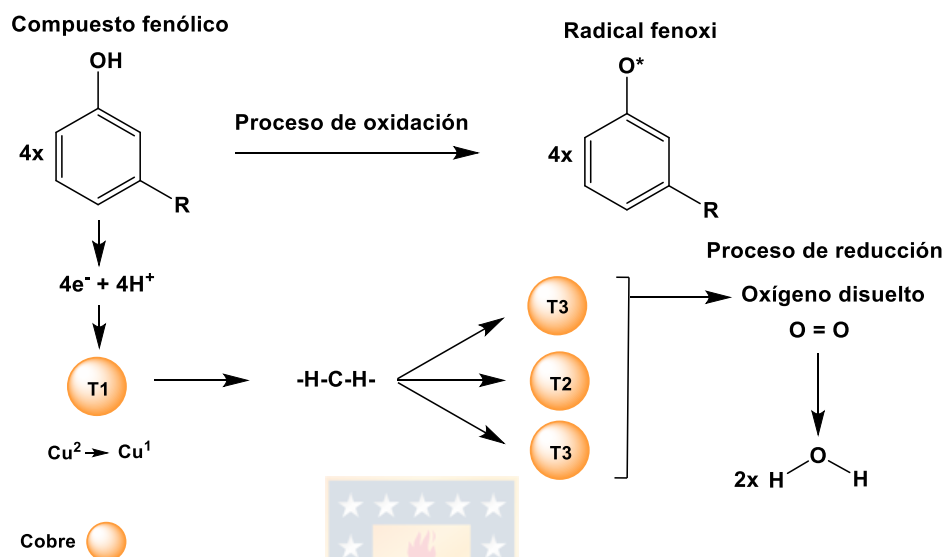


Fig. 1.2. Ciclo catalítico de la enzima lacasa (Adaptado de Barrios, C. et al.⁶⁵).

Las lacasas actúan a varios rangos de temperatura y pH, y aunque su estabilidad es generalmente más alta a pH ácido y altas temperaturas, las condiciones óptimas de cada enzima varían significativamente dependiendo de su fuente⁶⁸. Adicionalmente, aunque su mayor efecto se da en la oxidación de fenoles, mediante el uso de mediadores, se puede ampliar el rango de compuestos oxidables, logrando oxidar una gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos⁶⁵. Los mediadores son un grupo de compuestos de bajo peso molecular con un alto potencial redox (por encima de 900 mV) que tienen la capacidad de mejorar la actividad catalítica de las lacasas y que actúan como una especie de "lanzador eléctrico" el cual una vez que es oxidado por la enzima, genera un intermediario muy oxidante conocido como co-mediador o mediador oxidado, que se difunde fuera de la enzima y, a su vez, oxida cualquier sustrato que, debido a su tamaño, no pueda ingresar directamente al sitio activo^{67,69}. En este sentido, un mediador ideal es aquel que puede realizar muchos ciclos sin degradaciones y sin reacciones secundarias. Dentro de los mediadores más utilizados se encuentran el ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-

(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)), TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil.), y HBT (1-hidroxibenzotriazol)⁷⁰ (ver Fig. 1.3). En este trabajo, con el fin de mejorar la capacidad oxidativa de las enzimas hacia los plaguicidas, se evaluará el efecto del mediador ABTS en la degradación de los plaguicidas de estudio.

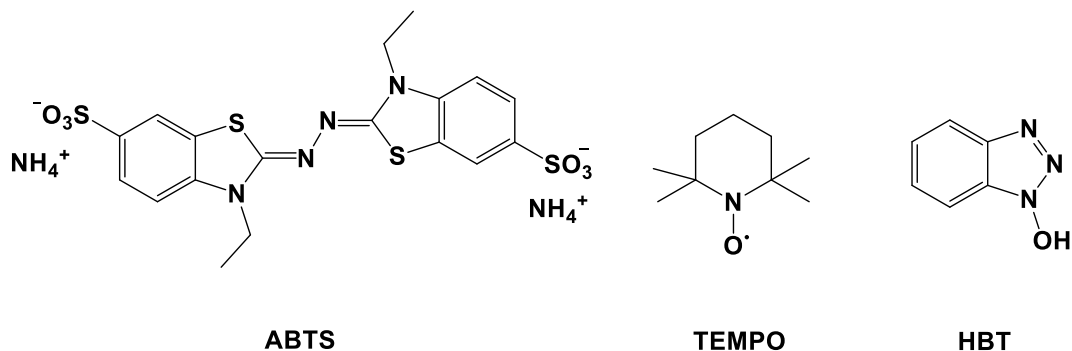


Fig. 1.3. Estructura de los mediadores ABTS, TEMPO y HBT (Fuente: Elaboración propia).

La capacidad que tienen las enzimas lacasa para expandir su rango de sustratos es lo que las hace excepcionalmente versátiles y es la razón por la cual son útiles en la biodegradación de contaminantes ambientales. Si bien, las enzimas lacasa poseen múltiples ventajas útiles en la biorremediación, como lo son los bajos requerimientos energéticos, bajo impacto ambiental, y alta eficiencia, su uso a nivel industrial se ha visto restringido debido a algunas características propias de las enzimas como lo son su baja estabilidad, no reusabilidad, alta sensibilidad a agentes desnaturalizantes y altos costos de producción⁷¹. Afortunadamente, muchas de estas limitaciones se pueden reducir mediante la inmovilización enzimática sobre soportes adecuados. Algunas de las ventajas asociadas a la inmovilización enzimática son el aumento de la estabilidad térmica, mecánica y de almacenamiento, la reducción en la inhibición, la posibilidad de reutilización y una fácil extracción del medio de reacción, lo que genera una mayor facilidad para su aplicación en procesos industriales^{72,73}. Es por ello, que en esta tesis se trabajará con enzimas inmovilizadas.

1.4 Inmovilización enzimática

La inmovilización enzimática se refiere al confinamiento de una enzima en una fase diferente a aquella en la que se encuentran los sustratos y productos⁷⁴. Esta se puede llevar a cabo sobre una gran variedad de materiales y por diferentes métodos de inmovilización, dependiendo de la aplicación final deseada⁷⁵. Sin embargo, en los procesos de inmovilización, siempre se busca que el soporte posea un bajo costo, alta área superficial, que no genere problemas con la difusión de sustratos y con el producto de las reacciones enzimáticas.

Dentro de los principales métodos de inmovilización se encuentran; (1) el atrapamiento, el cual se refiere a la inclusión física de la enzima en una matriz porosa o por microencapsulación⁷⁶, (2) el anclaje a un soporte, que puede ser por adsorción o por enlaces covalentes⁷⁷ y (3) la formación de agregados, que es un método de inmovilización en ausencia de soporte en el que las enzimas están covalentemente entrecruzadas gracias a la acción de agentes bifuncionales⁷⁸ (ver Fig. 1.4). Es importante resaltar que el tipo de inmovilización llevado cabo, así como las condiciones de esta, influyen considerablemente en las propiedades de las enzimas⁷⁹.

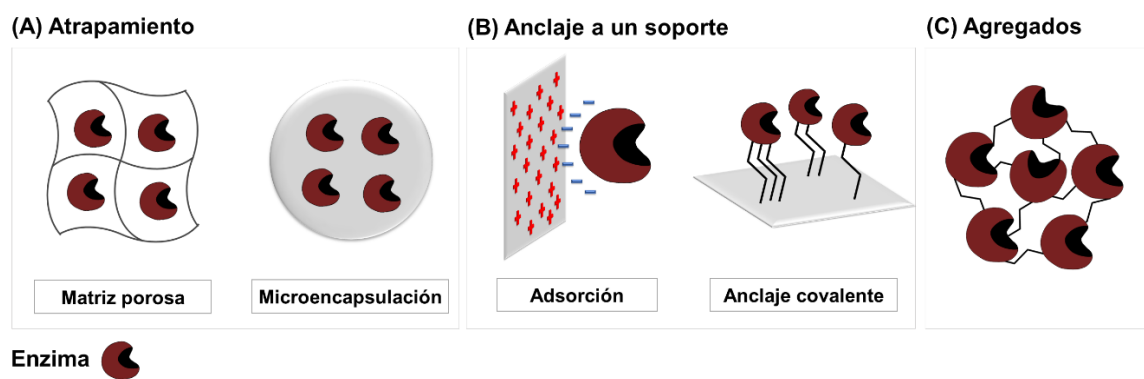


Fig. 1.4. Tipos de inmovilización enzimática. (A) Atrapamiento, (B) Anclaje a un soporte y (C) Agregados (Fuente: Elaboración propia).

De estos métodos, el más utilizado es la formación de enlaces covalentes, debido a que genera interacciones más fuertes entre la enzima y el soporte, lo cual evita la liberación de la enzima en el medio de reacción, siendo de este modo más adecuado para aplicaciones

a nivel industrial⁸⁰. En este tipo de inmovilización, una de las características más deseadas es la unión multipunto entre la enzima y el soporte, ya que esta genera una alta estabilidad en la enzima, evitando su desnaturalización debido a cambios en la temperatura, el pH y la fuerza iónica en el medio de reacción. Para lograr la unión multipunto, se requiere ciertas características en el soporte tales como gran superficie disponible para la inmovilización, alta densidad de grupos funcionales, y bajos impedimentos estéricos de los grupos de acoplamiento⁸¹.

En esta misma línea de ideas, tanto las propiedades físicas (morfología, porosidad, tamaño de partícula, superficie disponible para la inmovilización) como las propiedades químicas (grupos funcionales, densidad de grupos reactivos, reactividad química) deben analizarse antes de la inmovilización, debido a que todos estos aspectos influyen significativamente la cantidad, estabilidad, selectividad, perfiles de pH y temperatura, orientación y actividad de la enzima inmovilizada⁷⁵. Todo lo anterior, se atribuye a que el contacto directo de la enzima con el soporte modifica el microambiente de la enzima, generando como consecuencia modificaciones en su estructura y estabilidad⁸².

La mayoría de las inmovilizaciones de tipo covalente ocurren por la interacción de grupos funcionales en el soporte tales como epóxidos (que se consiguen comercialmente como microesferas de Eupergit), glutaraldehído o carbonilos con los grupos amino del aminoácido lisina que por lo general se encuentran en la superficie de la enzima, los cuales son altamente reactivos y no afectan el sitio catalítico de la enzima^{47,83,84}. También se han reportado inmovilizaciones sobre soportes con grupos hidrazida en los que se realiza la inmovilización por los diferentes carbohidratos presentes en la superficie de la enzima⁸⁵. Adicionalmente, una gran variedad de soportes se han utilizado en la inmovilización enzimática, entre los que resaltan las membranas, nano, micro y macroesferas, resinas, geles y fibras^{80,86,87}. Entre estos, unos de los soportes más utilizadas son las esferas, debido a que poseen gran área superficial disponible para la inmovilización enzimática. Además, diversos autores han encontrado un efecto directo entre el tamaño de las esferas y su porosidad con la cantidad de enzimas inmovilizadas y la actividad de las mismas⁸³. Encontrándose que el tamaño micrométrico es el más adecuado debido a que se evita la interacción entre las enzimas inmovilizadas, además cuando se utilizan microesferas no porosas se eliminan limitaciones de difusión, aumentando de este modo la actividad de

las enzimas inmovilizadas⁸⁴. Es por ello, que en esta tesis de doctorado la inmovilización se realizará sobre microesferas poliméricas no porosas y se analizará la influencia de dos tipos de grupos funcionales en la superficie del soporte.

Desafortunadamente, hasta el momento no existe un método general de inmovilización apropiado para todas las enzimas y sus diferentes aplicaciones. Es por ello, que al momento de realizar la inmovilización enzimática se debe establecer cuidadosamente el tipo de soporte a utilizar y las condiciones de inmovilización, debido a que se corre el riesgo de producir una pérdida parcial o total de la actividad enzimática como producto de la inmovilización⁷⁵. En este sentido, una alternativa para estudiar el efecto de múltiples factores en la estabilidad de la enzima inmovilizada con el fin de poder encontrar las condiciones óptimas de inmovilización es el uso de diseños de experimentos, los cuales con un mínimo número de corridas (o experimentos) permite la optimización de diversos parámetros que influyen en la respuesta a analizar⁸⁴.

– *Co-inmovilización enzimática*

Hasta el momento, queda claro la importancia de la inmovilización en la mejora de diversas propiedades enzimáticas, las cuales otorgan a las enzimas posibles aplicaciones científicas e industriales debido al gran aporte económico y tecnológico que representa. Sin embargo, existen múltiples procesos en los cuales una sola enzima no puede catalizar completamente una reacción y se hace necesario el trabajo de múltiples enzimas en cascada⁹⁰. En la naturaleza, este problema se ve resuelto por la presencia de diferentes enzimas que llevan a cabo reacciones en forma secuencial, como en el caso del ciclo de Krebs, en el que un complejo de ocho enzimas altamente ordenadas reaccionan de forma secuencial, permitiendo mantener una alta concentración local de los intermediarios de la reacción y reduciendo pérdidas por difusión, lo cual aumenta la eficiencia catalítica del proceso y es sumamente útil en el caso de intermediarios altamente tóxicos⁹¹.

En un intento por imitar a la naturaleza y además ampliar el rango de pH de trabajo óptimo para el sistema de enzimas inmovilizadas, se propone la co-inmovilización de varias enzimas lacasa sobre el mismo soporte y de este modo sacar provecho de la diversidad de propiedades que presentan diversos tipos de enzimas lacasa, logrando expandir al menos el rango de pH óptimo del biocatalizador polimérico resultante.

En este contexto, la co-inmovilización presenta varios retos, tales como la conservación de la actividad enzimática para todas las enzimas inmovilizadas, alcanzar altos porcentajes de inmovilización y además debido a que se trabajará en un espacio reducido y las enzimas poseen un gran tamaño (> 10 kDa) es posible que se produzcan grandes efectos estéricos, por lo que deberá reducirse al máximo las interacciones entre ellas con el fin de no afectar sus actividades. Todos estos aspectos pueden ser controlados con una optimización de las condiciones en las que se lleva a cabo la co-inmovilización, ya que estas deben ser adecuadas para todas las enzimas involucradas.

1.5 Polimerización por dispersión

Como se mencionó anteriormente, las microesferas no porosas de tamaño homogéneo son un excelente soporte para la inmovilización enzimática debido a su gran área superficial disponible para la inmovilización y por esta razón se seleccionaron microesferas como soporte polimérico. Dentro de los métodos para la síntesis de esferas poliméricas, la polimerización por dispersión destaca debido a la capacidad de obtención de microesferas con un estrecho rango de distribución de tamaños, siendo el mejor método en cuanto a homogeneidad de tamaño, cuando se compara con métodos como emulsión, miniemulsión, microemulsión y polimerización por suspensión^{92,93}. Este método permite trabajar con monómeros hidrofílicos e hidrofóbicos, únicamente mediante variaciones del solvente o mezcla de solventes. En la polimerización por dispersión, se parte de una solución homogénea en la que el monómero, el iniciador y el estabilizador estérico son solubles en el medio de polimerización, pero este es un mal disolvente para el polímero resultante⁹⁴. De esta forma, al iniciar el calentamiento se forma el polímero que por ser insoluble tiende a precipitar, formándose núcleos inestables, los cuales son estabilizados por la adsorción del agente estabilizador, generando la formación de partículas con un tamaño entre 0.1 – 15.0 μm y una alta homogeneidad de tamaño⁸⁴. Las características de las microesferas obtenidas dependerán del control de diversas variables tales como, la concentración del monómero, la temperatura, la polaridad del medio de reacción, el

iniciador, el tipo y concentración del estabilizador y la purga con nitrógeno⁹⁵. Un esquema general de la polimerización por dispersión se muestra a continuación en la Fig. 1.5.

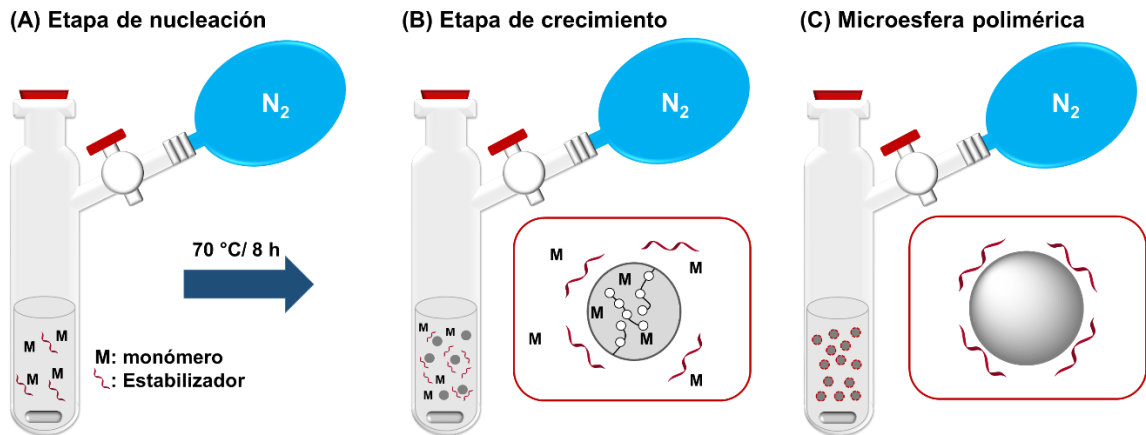


Fig. 1.5. Esquema general de una polimerización por dispersión. (A) Etapa de nucleación, (B) etapa de crecimiento y (C) formación de microesferas poliméricas (Fuente: Elaboración propia).



2. Hipótesis y objetivos

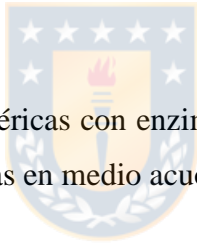
Hipótesis

- Es posible la inmovilización covalente de al menos dos tipos diferentes de enzimas lacasa sobre microesferas poliméricas no porosas superficialmente activas, dando como resultado una mejora en la estabilidad de las enzimas sin perder la capacidad oxidativa de alguna de ellas.
- El sistema de enzimas covalentemente inmovilizadas sobre el soporte polimérico trabajará de forma óptima en un mayor rango de pH de trabajo y será efectivo en la degradación de los plaguicidas organofosforados diazinon y azinfos-metil.

Objetivos

Objetivo general

- Obtener microesferas poliméricas con enzimas lacasas inmovilizadas para su uso en la degradación de plaguicidas en medio acuoso.



Objetivos específicos

- Sintetizar y caracterizar microesferas poliméricas con grupos funcionales hidrazida y oxirano superficiales mediante polimerización por dispersión.
- Inmovilizar enzimas lacasa por medio de enlaces covalentes a través de grupos hidrazida y oxirano presentes en las microesferas poliméricas y evaluar la influencia del grupo funcional en el soporte sobre las propiedades de la enzima inmovilizada.
- Desarrollar sistemas de diversas enzimas lacasa covalentemente co-inmovilizadas que permitan trabajar en un mayor rango de pH y que otorgue a las enzimas inmovilizadas mayor estabilidad térmica, de almacenamiento y reusabilidad.
- Evaluar la capacidad de degradación de los plaguicidas diazinon y azinfos metil por parte de los sistemas de enzimas co-inmovilizadas.

3. Síntesis de microesferas poliméricas: selección del soporte adecuado para la inmovilización de enzimas lacasa

3.1 Introducción

La inmovilización enzimática es una herramienta ampliamente usada para superar algunas de las limitaciones propias de las enzimas tales como su alta sensibilidad a estímulos externos, difícil extracción del medio de reacción, no reusabilidad y baja estabilidad^{47,75}. No obstante, el tipo de soporte utilizado para la inmovilización, influye de forma significativa en las propiedades de la enzima inmovilizada. En este contexto, una gran variedad de soportes con diferentes morfologías, grupos funcionales y propiedades mecánicas se han propuesto para la inmovilización enzimática^{72,96}.

Desafortunadamente no existe un protocolo general para la inmovilización que sea apropiado para todas las enzimas en todas las aplicaciones, es por ello que es importante optimizar las condiciones de inmovilización, con el fin de obtener la máxima eficiencia de inmovilización en cada caso⁹⁷.

En este capítulo se describe la síntesis, caracterización y selección del soporte adecuado para la inmovilización de la enzima lacasa *Trametes versicolor* (TvL). Para ello, se realizaron diversas polimerizaciones por dispersión, hasta obtener microesferas poliméricas de tamaño homogéneo como soporte polimérico. Posteriormente, se llevó a cabo una modificación superficial con el fin de tener dos soportes con las mismas características físicas, pero con diferentes grupos funcionales (dos de los más utilizados para la inmovilización enzimática, oxirano e hidrazida). La inmovilización para cada soporte se optimizó usando diseño de experimentos. Con los valores óptimos, se realizaron las respectivas inmovilizaciones y se caracterizaron tanto las enzimas inmovilizadas como las libres. Finalmente, basándose en las propiedades de las enzimas inmovilizadas, se determinó el soporte ideal para la inmovilización de enzimas lacasa.

3.2 Metodología

3.2.1 Obtención de los soportes poliméricos para la inmovilización enzimática

- Síntesis de microesferas poliméricas

Para la obtención del soporte polimérico ideal en la inmovilización enzimática, se probaron diferentes sistemas reportados en la literatura para la síntesis de microesferas poliméricas mediante polimerización por dispersión. En todos los casos se varió el tipo de monómero utilizado, el tipo de agente estabilizante, se realizaron reacciones de homopolimerización y una copolimerización, y se varió el tipo de solvente usado en la polimerización, de acuerdo a las condiciones mostradas en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Condiciones para la síntesis de microesferas poliméricas (Fuente: Elaboración propia).

Monómeros	Agente estabilizante	Entrecruzador	Disolvente	Tipo de polímero	Ref .
Hidroxietyl metacrilato (HEMA)	Acetato-butirato de celulosa	Etilenglicol dimetacrilato (EGDMA)	Tolueno/2-metilpropan-1-ol	homopolímero	98
HEMA/Alil glicidil éter (AGE)	Acetato-butirato de celulosa	Etilenglicol dimetacrilato (EGDMA)	Tolueno/2-metilpropan-1-ol	copolímero	-
Glicidil metacrilato (GMA)	Polivinilpirrolidona	-	Metanol/N,N-dimetilformamida	homopolímero	95
AGE	Polivinilpirrolidona	-	Metanol/N,N-dimetilformamida	homopolímero	-

Entre todas las polimerizaciones, el soporte seleccionado para la inmovilización enzimática fue las microesferas poliméricas de poli(glicidil metacrilato) (PGMA), las

cuales se sintetizaron siguiendo un procedimiento similar al descrito por Takahashi, K. *et al.*⁹⁵ Sin embargo, con el fin de mejorar la morfología, remover correctamente el estabilizador estérico y disminuir la dispersidad del tamaño de las microesferas, algunos parámetros experimentales se modificaron, estableciéndose el siguiente protocolo general de síntesis.

En un schlenk se mezclaron 5.2 g del monómero GMA, 0.2 g del iniciador radicalario α, α' -azoisobutironitrilo, 1.0 g de poli(vinilpirrolidona) (estabilizador estérico), 44.0 mL de metanol y 4.2 mL de *N, N*-dimetilformamida. La mezcla de reacción se agitó hasta disolución completa y se burbujeó con nitrógeno durante 5 min para desplazar el oxígeno presente en el medio de reacción. Posteriormente, un globo con nitrógeno se incorporó en el reactor y éste se puso en un baño precalentado de glicerol, y se agitó a 160 rpm durante 8 h a 65 °C. Las partículas resultantes se adicionaron en metanol y posteriormente se centrifugaron y lavaron tres veces con metanol con el fin de remover la poli(vinilpirrolidona) y el exceso de monómero sin reaccionar.

- ***Funcionalización de las microesferas de PGMA con grupos hidrazida***

La funcionalización superficial de las microesferas se realizó utilizando la mitad de las microesferas obtenidas, con el fin de tener igual cantidad de soportes con grupos superficiales oxirano y con grupos hidrazida. Para la incorporación de grupos hidrazida, 1.00 g de microesferas se dispersó en 5 mL de hidrato de hidrazina a temperatura ambiente durante toda la noche. Posteriormente, las microesferas funcionalizadas se lavaron con agua destilada (5 veces, 10 mL cada vez) y se secaron a 40 °C. La reacción general de este procedimiento se muestra en la Fig. 3.1.

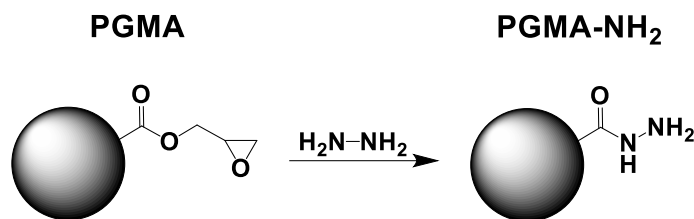


Fig. 3.1. Esquema de la funcionalización con grupos hidrazida de las microesferas de PGMA (Adaptado de M. Vera *et al.*⁸⁴).

3.2.2 Caracterización de las microesferas PGMA y PGMA-NH₂

Las microesferas de PGMA y PGMA-NH₂ se caracterizaron química, morfológica y térmicamente mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), difracción de rayos X (DRX), análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC). Las condiciones para cada una de las caracterizaciones se detallan a continuación.

- SEM

Para realizar las micrografías de las microesferas de PGMA y PGMA-NH₂, éstas se cubrieron con una capa fina de oro para su posterior análisis utilizando un microscopio electrónico de barrido JEOL 6380LV. La forma, tamaño y distribución de tamaño de partícula se determinó mediante la medida de 500 microesferas. El análisis de los datos se realizó con ayuda del analizador de imágenes Digital Micrograph 3.7.0 (Gatan Inc.). El diámetro promedio (D_n), peso promedio (D_w), y la dispersidad (\mathfrak{D}) se calcularon utilizando las ecuaciones $D_n = \sum D_i / N$, $D_w = \sum D_i^4 / \sum D_i^3$ y $\mathfrak{D} = D_w / D_n$, respectivamente, donde D_i es el diámetro de cada partícula y N es el número total de partículas analizadas.⁹⁹ De acuerdo a ésta fórmula, una alta homogeneidad de tamaño genera valores de \mathfrak{D} cercanos a 1.0. Adicionalmente, por medio de dispersión de energía de rayos X o DRX se realizó un análisis cuantitativo de la composición elemental con el fin de confirmar la funcionalización con grupos hidrazida.

- FTIR

La presencia de grupos hidrazida y oxirano en las microesferas se confirmó mediante espectroscopía de infrarrojo utilizando el método de la pastilla de KBr en un espectrofotómetro Nicolet Magna 550.

- DRX

Mediante medidas de DRX se analizaron los cambios estructurales entre ambos tipos de microesferas. Las medidas se hicieron en un difractómetro Bruker AXS D4 Endeavor. Los resultados se tomaron con un ángulo de difracción de 2θ de 2° a 70° a una velocidad de escaneo de 0.025° s⁻¹.

– TGA

La estabilidad térmica de las microesferas de PGMA se analizó utilizando un equipo TGA 209 F1 Iris (Netzsch), las medidas se realizaron en cápsulas de aluminio en un intervalo de temperatura de 30 – 550 °C, bajo atmósfera de nitrógeno con una rampa de calentamiento de 10 °C/min. La temperatura de degradación se determinó mediante el cálculo de la derivada de TGA (DTG).

– DSC

Las medidas de DSC se realizaron en un equipo DSC 204 F1 Phoenix (Netzsch) bajo atmósfera de nitrógeno. Se realizaron dos rampas de calentamiento, en la primera rampa de calentamiento, las muestras se calentaron de 25 a 120 °C a una velocidad de 10 °C/min, posteriormente las muestras se enfriaron a la misma velocidad hasta 10 °C y se volvieron a calentar hasta 100 °C a 10 °C/min.

3.2.3 Determinación de la concentración de proteína

La determinación de la cantidad de proteína se realizó mediante el ensayo de Bio-Rad¹⁰⁰, para el cual 10.0 µL de muestra se adicionaron en un pocillo de una microplaca de poliestireno y se mezclaron con 200.0 µL de una solución diluida de Bio-Rad (1:5 en agua Tipo I). La microplaca se incubó durante 5 min a 25 °C agitando a 400 rpm. Pasado ese tiempo, se midió la absorbancia a 595 nm mediante un espectrofotómetro TECAN Infinite M200 Pro. El blanco utilizado fue la solución buffer 0.1 mol/L ácido cítrico/0.2 mol/L fosfato de sodio y la cantidad de proteína se estimó usando BSA como estándar de referencia. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se reportaron con la desviación estándar correspondiente.

3.2.4 Inmovilización de la lacasa *Trametes versicolor* sobre microesferas de PGMA y PGMA-NH₂

Con el fin de comparar la estabilidad de las enzimas inmovilizadas en condiciones óptimas sobre ambos tipos de soportes y poder seleccionar el mejor soporte para la inmovilización enzimática, se realizó la optimización de las condiciones de inmovilización de la enzima lacasa *Trametes versicolor* (TvL) sobre ambos tipos de microesferas. La enzima TvL (EC

1.10.3.2 con actividad específica ≥ 0.5 U/mg) fue adquirida comercialmente en Sigma-Aldrich (Chile). Esta optimización se hizo mediante diseño de experimentos, como se describe a continuación.

- ***Optimización de las condiciones de inmovilización de la enzima TvL sobre dos tipos de soporte***

La optimización de las condiciones de inmovilización de la enzima TvL sobre cada tipo de microesferas se realizó con la ayuda del software MODDE 7.0.0.1, utilizando la metodología de superficie respuesta (MSR) y el diseño estadístico de Box-Behnken (DBB) con tres factores y tres niveles, lo que dio origen a 15 corridas, es decir 15 experimentos a diferentes condiciones. Los factores investigados fueron; (A) tiempo de contacto, (B) concentración de la enzima y (C) el pH. Los niveles de cada factor fueron seleccionados como bajo (-1), medio (0) y alto (1), tomando como base valores previamente reportados en la literatura. Los intervalos de trabajo se resumen en la Tabla 3.2. El parámetro de respuesta seleccionado fue la eficiencia de inmovilización (EI), la cual se calculó como se muestra en la ecuación 3.1

$$EI = \left(\frac{\alpha_i}{\alpha_f} \right) \times 100 \quad [\text{Ec. 3.1}]$$

donde α_i es la actividad de la enzima inmovilizada y α_f es la actividad de la enzima libre.

Tabla 3.2. Variables y niveles establecidos en el DBB para la inmovilización de TvL sobre microesferas de PGMA y PGMA-NH₂ (Fuente: Elaboración propia).

Variables independientes	Niveles		
	-1	0	+1
A: Tiempo (h)	1	12.5	24
B: Concentración de enzima (mg/mL)	0.2	10.1	20
C: pH	3	4.25	5.5

Variable independiente	Condición
EI: Eficiencia de inmovilización	Maximizar

La relación matemática entre los factores y la respuesta (EI) se analizó por el modelo cuadrático que se expresa como:

$$EI = \beta_0 + \beta_1A + \beta_2B + \beta_3C + \beta_{12}AB + \beta_{13}AC + \beta_{23}BC + \beta_{11}A^2 + \beta_{22}B^2 + \beta_{33}C^2 \quad [\text{Ec. 3.2}]$$

donde β_0 es el intercepto; β_1 , β_2 , y β_3 son los coeficientes lineales; β_{11} , β_{22} , y β_{33} son los coeficientes cuadráticos; β_{12} , β_{13} , y β_{23} son los coeficientes de interacción; A , B y C son las variables independientes. El DBB se seleccionó para esta optimización debido a que con únicamente tres factores y un número mínimo de experimentos da un gran número de datos (incluyendo los efectos principales, el efecto de las interacciones y los efectos cuadráticos). El objetivo de esta optimización fue lograr maximizar la eficiencia de inmovilización en ambos casos.

- *Inmovilización de la enzima lacasa TvL*

Para este proceso se mezclaron 10 mg de PGMA o PGMA-NH₂ con 5 mL de disolución de enzima TvL a diferentes concentraciones (0.2 – 20 mg/mL) en buffer de ácido cítrico/Na₂HPO₄ (pH: 3.0 – 5.5). El proceso de inmovilización se llevó a cabo durante diferentes períodos de tiempo (1 – 24 h) agitando de forma continua a 140 rpm a 21 °C. Posteriormente, se determinó la concentración de la enzima libre e inmovilizada mediante medidas de UV-Vis a 280 nm usando un espectrofotómetro UV2310II. Adicionalmente, al final de cada experimento se determinó la actividad de las enzimas libres e inmovilizadas con el fin de determinar la EI.

3.2.5 Determinación de la actividad de la enzima TvL libre e inmovilizada

La actividad de las enzimas libres e inmovilizadas se midió usando ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) como sustrato, el cual al oxidarse cambia de color, siendo la formación de color proporcional a la actividad de la enzima. El ABTS oxidado por la enzima TvL se monitoreó por el incremento de la absorbancia a 420 nm y 25 °C. El ensayo consistió en mezclar ABTS (0.5 mmol/L) con la enzima (libre o inmovilizada) disuelta en una solución de buffer (ácido cítrico/Na₂HPO₄) haciendo un volumen total de 1 mL. La actividad enzimática se informó en U L⁻¹, siendo una unidad

(U) la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 μmol de ABTS por minuto. La actividad se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación derivada de la ley de Beer-Lambert

$$UL^{-1} = \frac{(10^6)(\Delta A)(V)}{(\epsilon)(l)(\Delta t)} \quad [\text{Ec. 3.3}]$$

donde ΔA es el cambio en la absorbancia a 420 nm, V es el volumen total de la reacción (L), ϵ es el coeficiente de extinción molar el cual varía dependiendo del pH de la solución como se detalla en la Tabla 3.3, l es la longitud óptica (1 cm) y Δt es el tiempo de reacción.

Tabla 3.3. Valores de los coeficientes de extinción molar del ABTS a diferentes valores de pH*.

pH	ϵ (mL/ $\mu\text{mol} \times \text{cm}^{-1}$)
2	34.68
3	34.689
4	33.115
5	31.332
6	21.103
7	12.07
8	5.25

* Datos suministrados por el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Recursos Naturales y Ciencias de la Vida, Tulln, Austria.

3.2.6 Efecto del pH sobre la actividad de las enzimas TvL libre e inmovilizada

El efecto del pH en la enzima libre e inmovilizada se estudió analizando la actividad a diferentes valores de pH (2-6) utilizando disoluciones buffer de ácido cítrico/ Na_2HPO_4 . Este estudio se realizó midiendo la absorbancia de una mezcla de enzima (libre o inmovilizada) con 0.5 mmol/L de ABTS por 15 min a 25 °C, siguiendo el procedimiento descrito previamente en la sección 3.2.5. Todas las medidas se realizaron por triplicado y la actividad relativa se calculó como la razón entre la actividad de la enzima al pH óptimo y la actividad al pH de estudio.

3.2.7 Estabilidad térmica de TvL libre e inmovilizada

El efecto que tiene la temperatura sobre la actividad de la enzima se estudió a seis diferentes temperaturas (20 - 70 °C). El análisis se realizó mezclando la enzima TvL (libre o inmovilizada) con una disolución precalentada de ABTS 0.5 mmol/L en buffer pH 3, siguiendo el protocolo descrito en la Sección 3.2.5. Las medidas se hicieron por triplicado y los resultados se expresaron en términos de la actividad relativa, la cual se calculó como la razón entre la actividad de la enzima a la temperatura de máxima actividad y la actividad en la temperatura de estudio.

3.2.8 Determinación de los parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos K_m , K_{cat} , V_{max} y la eficiencia catalítica (K_{cat}/K_m) para enzimas libres e inmovilizadas se determinaron midiendo la actividad a diferentes concentraciones de ABTS (0.005 – 0.05 mmol/L) en una disolución de ácido cítrico a pH 3 y 25 °C. Los valores de los parámetros se obtuvieron de la gráfica de Lineweaver–Burk generada al usar la ecuación de Michaelis-Menten. Para ello, K_m y V_{max} se determinaron del intercepto con los ejes "x" y "y", respectivamente. Por su parte, K_{cat} se determinó como la relación entre V_{max} y la concentración de enzima utilizada.

3.2.9 Reusabilidad y estabilidad de almacenamiento

La estabilidad mecánica de la enzima se estudió mediante 5 ciclos de reuso utilizando ABTS 0.5 mmol/L como sustrato y determinando la actividad en cada ciclo. Después de cada ciclo, las enzimas se removieron del medio de reacción mediante filtración y se hicieron lavados (tres veces) con disolución buffer pH 3 con el fin de remover el ABTS. Los siguientes ciclos se realizaron disolviendo la enzima en disoluciones recién preparadas de buffer y ABTS sin oxidar.

La estabilidad de almacenamiento se evaluó mediante la medida de la actividad de las enzimas libres e inmovilizadas durante 20 días. Durante el tiempo de estudio las disoluciones de enzimas se conservaron a 4 °C. En ambos estudios, las medidas de actividad se hicieron por triplicado, midiendo a pH 3 y 25 °C siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.2.5.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Síntesis y caracterización de las microesferas poliméricas

En este capítulo los estudios se enfocaron en determinar cuál grupo funcional en el soporte genera mejores propiedades en la enzima lacasa TvL inmovilizada. Para ello, en primer lugar fue necesaria la obtención del soporte idóneo para la inmovilización, el cual debía ser de tamaño micrométrico, altamente homogéneo, poseer forma esférica que generara gran área superficial para la inmovilización y finalmente tener grupos funcionales que reaccionarán con la enzima y fuesen modificables mediante reacciones químicas superficiales. Para lograr este objetivo se preseleccionaron 3 monómeros: HEMA, AGE y GMA. Posteriormente, se llevaron a cabo las polimerizaciones por dispersión utilizando las condiciones dadas en la Tabla 3.1. Los polímeros obtenidos se caracterizaron por SEM y son mostrados en la Fig. 3.2.

Como se observa en la Fig. 3.2, las formas más esféricas y homogéneas se presentaron para los polímeros obtenidos a partir de la homopolimerización de HEMA (PHEMA, Fig. 3.2-A) y GMA (PGMA, Fig. 3.2-B), obteniéndose en el caso de PGMA una superficie más esférica, lisa y homogénea. Para la homopolimerización de AGE no se lograron obtener esferas (PAGE, Fig. 3.2-C) y finalmente para la copolimerización de HEMA-AGE (P(HEMA-AGE), Fig. 3.2-D), se obtuvieron únicamente grupos de partículas. Ahora bien, existen diversas razones por las cuales los polímeros con el monómero AGE no dieron como resultado microesferas, pero para analizarlas primero es necesario saber que en la polimerización por dispersión existen muchas variables que afectan las características del polímero final, como la temperatura, la presencia de nitrógeno, la polaridad del medio de reacción, la concentración y tipo de monómeros, y finalmente la naturaleza e interacción del agente estabilizante y del iniciador con el monómero^{93,98}. La interacción entre todas estas variables resulta compleja y únicamente es posible obtener esferas bien formadas y de tamaño uniforme cuando se trabaja en las condiciones óptimas. Las polimerizaciones de PHEMA y PGMA se realizaron con condiciones previamente optimizadas^{95,98}. Sin embargo, los polímeros obtenidos de PAGE se sintetizaron en condiciones no-optimizadas para este monómero, es por ello que la interacción entre el

agente estabilizante y las cadenas poliméricas crecientes no generó la estabilización deseada, provocando que probablemente el agente estabilizante se incorporara en la polimerización o se mantuviese soluble y no reaccionara de ninguna forma con el polímero, razón por la cual no se dio la formación de microesferas⁹³. Fenómenos como éste se han observado en muchas investigaciones y es por ello que se reporta que la correcta selección del agente estabilizante es crucial para la obtención de microesferas de tamaño homogéneo⁹⁸.

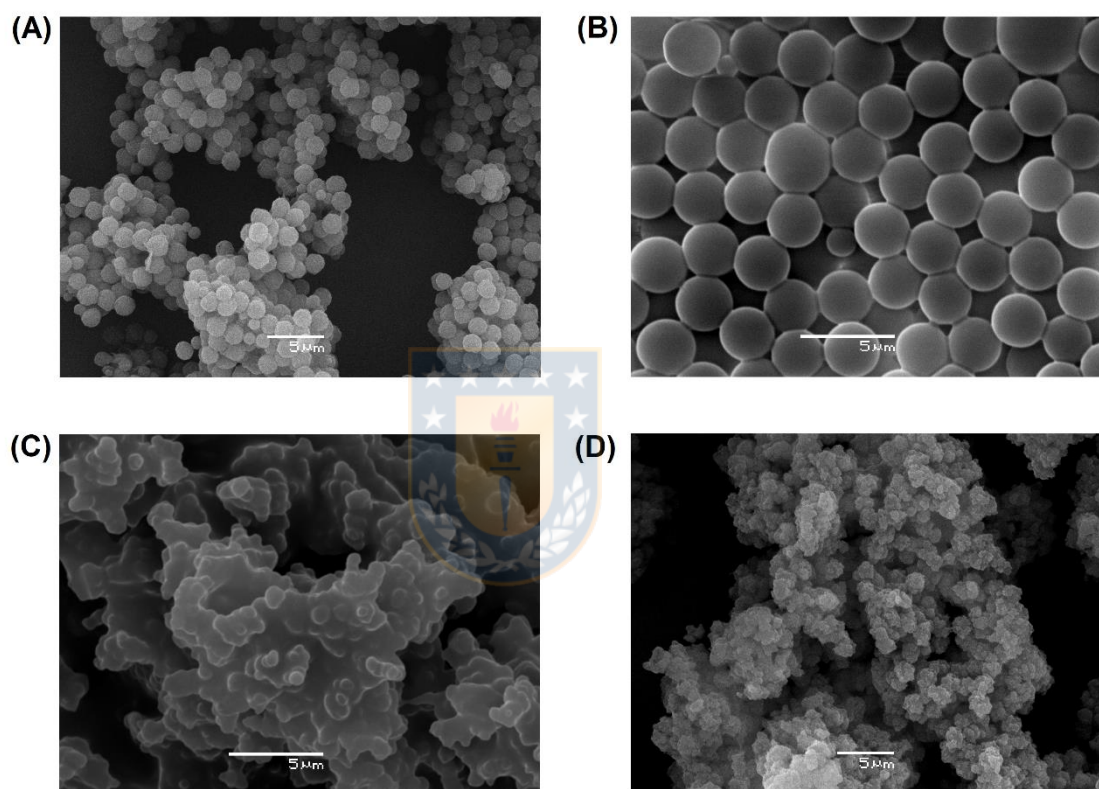


Fig. 3.2. Micrografías de los productos de la polimerización por dispersión para (A) PHEMA, (B) PGMA, (C) PAGE, (D) P(HEMA-AGE) (Fuente: Elaboración propia).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se seleccionaron las microesferas de poli(glicidil metacrilato), PGMA, para utilizarse en los procesos de inmovilización enzimática. Las esferas obtenidas contaron con las características requeridas para el soporte polimérico, ya que además del tamaño, la forma y la homogeneidad, poseían grupos oxirano en su exterior, los cuales se han reportado en la reacción con grupos amino del aminoácido lisina, generalmente ubicados en la superficie de las enzimas. Sin embargo, antes de poder

utilizarse como soporte, fue necesario la optimización de la obtención, ya que como se observa en la Fig.3.2-B, las microesferas estaban adheridas unas a otras, probablemente debido a la incompleta eliminación del agente estabilizante una vez terminada la polimerización, lo cual reducía el área para la inmovilización enzimática y podría bloquear los grupos oxirano superficiales.

La eliminación del agente estabilizante se realizó mediante lavados sucesivos con metanol y posterior centrifugación, lo que generó la obtención de microesferas como las mostradas en la Fig. 3.3-A. El problema de este paso es que genera aglomeración de las microesferas obtenidas, lo que resulta en una alteración de su forma esférica. Una alternativa para solucionar este problema, fue la adición de la dispersión de microesferas en vasos de precipitados para hacer lavados con agitación manual y decantación por gravedad, obteniéndose las microesferas mostradas en la Fig. 3.3-B. Estas microesferas si bien no estaban agregadas, se deformaban cuando precipitaban y el agente estabilizante no se removía completamente.

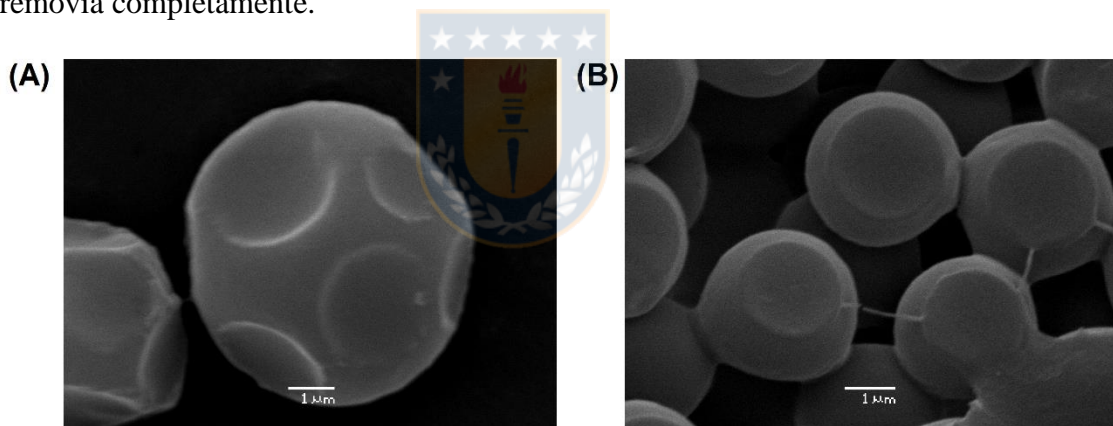


Fig. 3.3. Micrografías de microesferas de PGMA para (A) centrifugados (B) lavados en un vaso de precipitado (Fuente: Elaboración propia).

Finalmente, se optó por adicionar la dispersión de microesferas en un tubo Falcon en un gran volumen de metanol (relación 1:5 en volumen) a temperatura ambiente para asegurarse que la temperatura de la suspensión fuera baja y el polímero no se deformara. Una vez realizado este proceso y homogenizada la temperatura, se hicieron centrifugaciones sucesivas con el fin de remover el agente estabilizante. Las microesferas obtenidas tras realizar este proceso se muestran en la Fig. 3.4. Como se puede observar,

mantienen su forma esférica y no se encuentran aglomeradas. El tamaño promedio de las esferas obtenido fue de $2.85 \pm 0.16 \mu\text{m}$ de diámetro, las cuales poseen una alta uniformidad de tamaño ($\text{D} = 1.014 \pm 0.166$). En el caso de las medidas de dispersidad realizadas por SEM, cuanto más cercano es el valor a 1.0, mayor es la homogeneidad de las partículas analizadas¹⁰¹. En este caso la homogeneidad de tamaño fue significativamente alta.

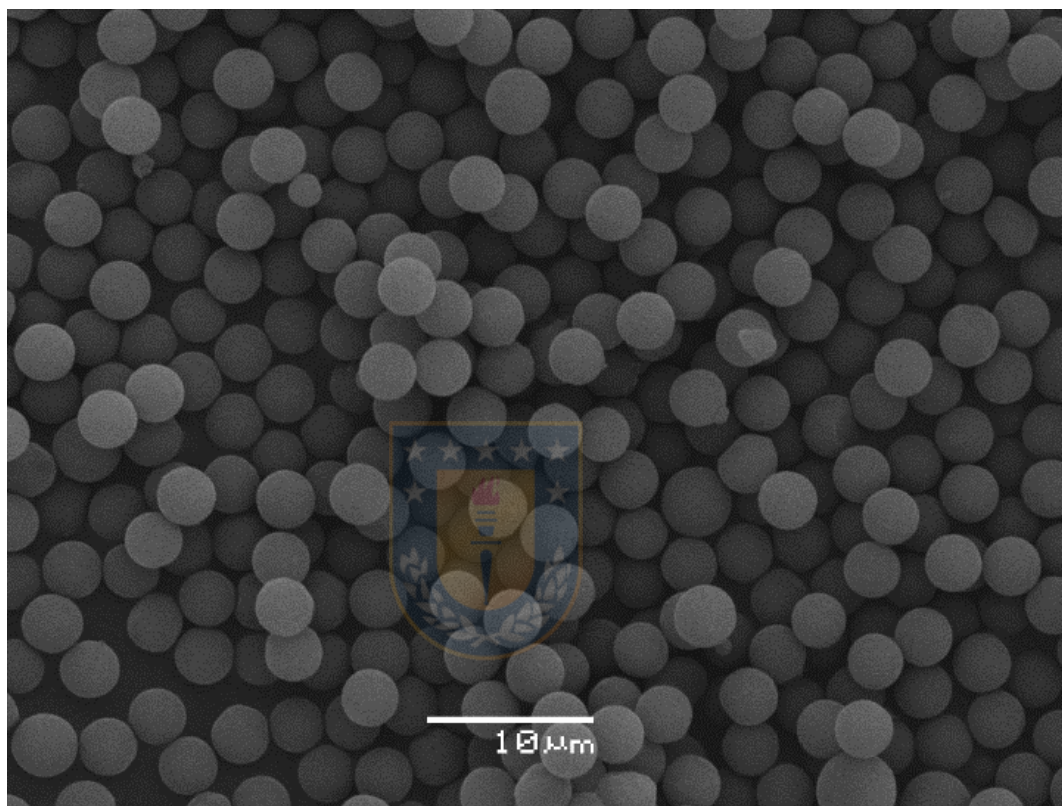


Fig. 3.4. Micrografía de las microesferas de PGMA obtenidas mediante polimerización por dispersión (Fuente: Elaboración propia).

Una vez obtenidas las microesferas de PGMA, la mitad de estas se modificaron superficialmente con hidrato de hidrazina, con el fin de generar grupos hidrazida en la superficie de las esferas y de este modo poseer dos soportes con las mismas propiedades físicas y cuya única diferencia sería el grupo funcional en la superficie del soporte. El grupo hidrazida en el soporte se seleccionó, debido a que ha sido reportado múltiples veces en la inmovilización enzimática, generalmente anclado a residuos de carbohidratos presentes en la superficie de las enzimas^{98,102,103}.

La reacción de microesferas de PGMA con hidrato de hidrazina para formar grupos hidrazida se realizó mediante una adaptación del protocolo descrito por C. Jolivalt, *et al.*¹⁰² En esta reacción, las aminas primarias reaccionan mediante ataque nucleofílico con los grupos éster en la superficie del soporte en condiciones suaves para generar grupos hidrazida. La funcionalización superficial se verificó mediante diferentes técnicas, entre ellas análisis de EDX, el cual confirmó la presencia de 5.77% de nitrógeno en la superficie de las microesferas de PGMA-NH₂. Este valor es comparable con valores reportados previamente en la modificación superficial con grupos hidrazida^{85,104}.

Adicionalmente, las microesferas con ambos grupos funcionales se caracterizaron por FTIR con el fin de confirmar la funcionalización, tal como se muestra en la Fig. 3.5. La principal diferencia entre los espectros correspondientes a ambos tipos de microesferas es el ensanchamiento de la banda en 3406 cm⁻¹ en PGMA-NH₂, la cual se atribuye a la vibración de tensión del enlace N-H. Otra evidencia de la funcionalización es el desplazamiento en la banda centrada en 1730 cm⁻¹ (PGMA) a 1722 cm⁻¹ (PGMA-NH₂), este desplazamiento es característico del enlace C=O en amidas debido a que los grupos carbonilo poseen más características de enlace simple que en el caso de los carbonilos de los grupos éster. Otras bandas características de las aminas son las que aparecen a 1644 y 1440 cm⁻¹, las cuales se asocian a las vibraciones de flexión del enlace N-H y de tensión del enlace C-N, respectivamente.

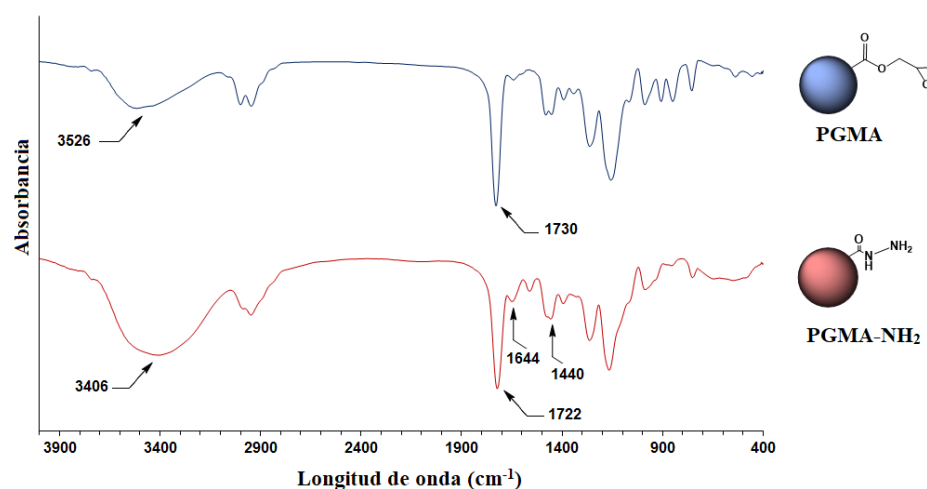


Fig. 3.5. Espectros FTIR de las microesferas de PGMA y PGMA-NH₂ (Adaptado de M. Vera, *et al.*⁸⁴).

Las microesferas también se caracterizaron mediante DRX, tal como se muestra en la Fig. 3.6. En esta figura se observa que aunque hay un solapamiento entre ambos patrones de difracción, también es evidente un pequeño desplazamiento de la señal más intensa (18°) hacia valores más bajos de 2θ . Esta pequeña diferencia puede ser atribuida a la modificación estructural de la superficie debido a la incorporación de grupos hidrazida^{105,106}. En este sentido, debido a que la modificación es únicamente superficial, es de esperarse que los patrones de difracción sólo presenten una pequeña diferencia, tal como se ha reportado previamente en modificaciones realizadas sobre PGMA^{107,108}.

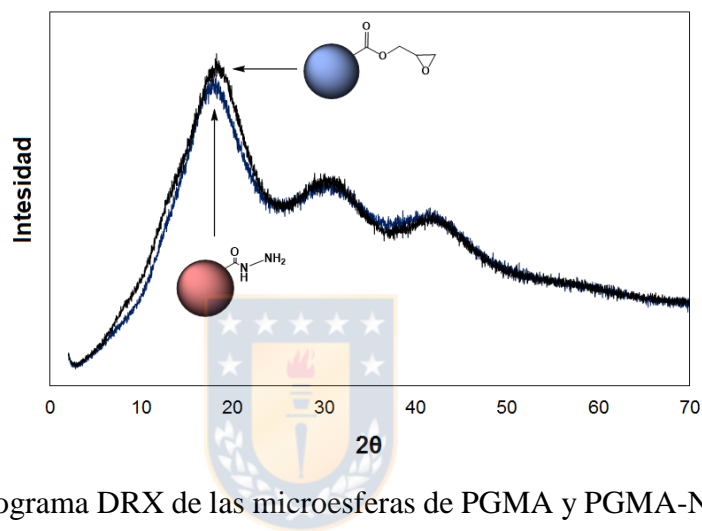


Fig. 3.6. Difractograma DRX de las microesferas de PGMA y PGMA-NH₂ (Adaptado de M. Vera, *et al.*⁸⁴).

Con el fin de evaluar la estabilidad térmica del polímero usado como soporte, se hicieron análisis de TGA y DSC a las microesferas de PGMA. En la Fig. 3.7 se muestran los termogramas obtenidos de TGA y DTG, como se puede observar la primera descomposición del polímero se da alrededor de los 291°C y la segunda alrededor de 402°C . Estos valores indican que el polímero usado como soporte posee una alta estabilidad térmica y que las enzimas inmovilizadas podrán acceder a un gran intervalo de temperaturas de trabajo antes que el soporte se descomponga.

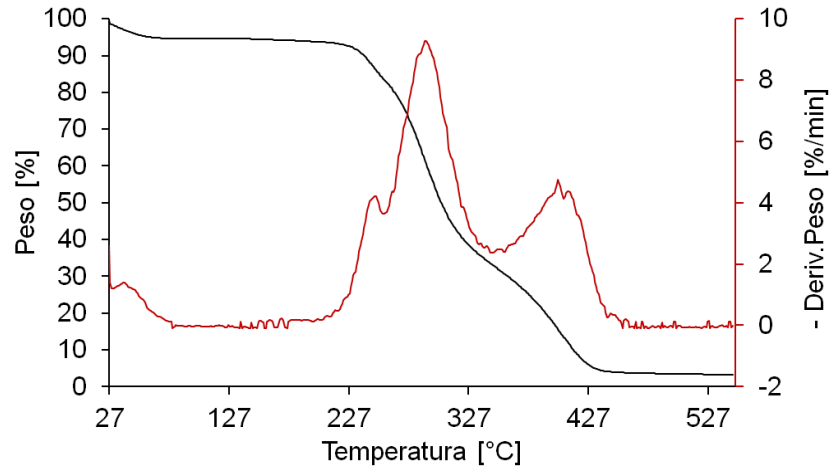


Fig. 3.7. Termogramas de TGA y DTG bajo atmósfera de nitrógeno para microesferas de PGMA (Fuente: Elaboración propia).

Una vez establecida la temperatura de descomposición del soporte, se procedió a determinar la temperatura de transición vítrea (T_g). Este parámetro indica la temperatura a la cual las propiedades mecánicas de las microesferas cambian radicalmente debido a los movimientos internos de las cadenas poliméricas. En el caso del soporte polimérico, se desea trabajar por debajo de esta temperatura, con el fin de no alterar la conformación y por ende la estabilidad de la enzima inmovilizada. El termograma obtenido de DSC se muestra en la Fig. 3.8. En este se observa que la T_g del PGMA se encuentra alrededor de $74.3\text{ }^\circ\text{C}$, este valor es lo suficientemente alto como para funcionar bien como soporte para la inmovilización enzimática, ya que las enzimas lacasas han demostrado trabajar en óptimas condiciones por debajo de $70\text{ }^\circ\text{C}$. Por lo anterior, de acuerdo al estudio térmico, se puede establecer que el polímero PGMA cuenta con la estabilidad térmica suficiente para ser utilizado en la inmovilización de las enzimas lacasa.

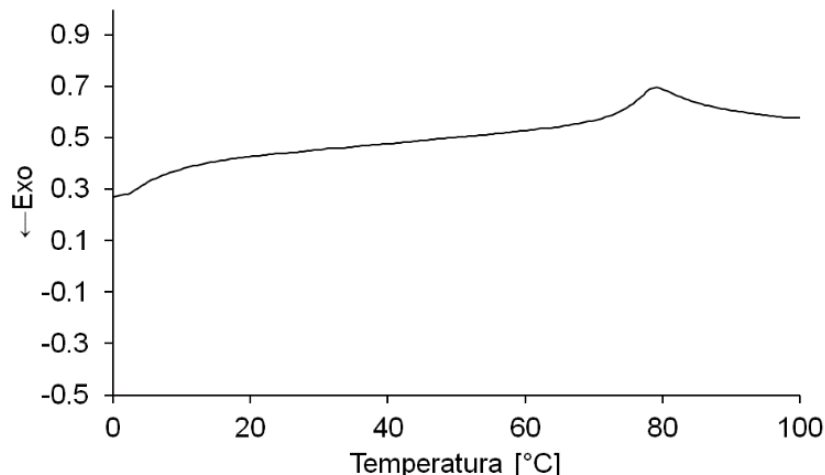


Fig. 3.8. Termogramas de DSC bajo atmósfera de nitrógeno de las microesferas de PGMA (Fuente: Elaboración propia).

La confirmación de la síntesis de las microesferas de PGMA y de su modificación superficial fue posible gracias a los resultados obtenidos de las caracterizaciones de FTIR, EDX y XRD. Adicionalmente, las propiedades térmicas del polímero usado como soporte se determinaron de acuerdo a los análisis realizados con TGA y DSC, observándose la estabilidad suficiente para su uso en la inmovilización enzimática. Basándose en estos resultados, se estableció la presencia de dos diferentes tipos de microesferas, las cuales se utilizaron en el estudio de inmovilización que se discutirá a continuación.

3.3.2 Optimización de las condiciones de inmovilización enzimática mediante análisis estadístico

Con el fin de optimizar el tiempo (de contacto), la concentración enzimática y el pH, se formuló un diseño de experimento de 3 factores con 3 niveles, para los cuales se realizaron 15 experimentos que se analizaron utilizando el modelo cuadrático mostrado en la ecuación 3.2. (Los valores de las respuestas obtenidos para los 15 experimentos, así como las condiciones experimentales de trabajo, se muestran en la Tabla S3.1 de información suplementaria).

Para el ajuste de los datos al diseño de Box-Behnken (DBB) se determinaron las ecuaciones polinómicas de segundo orden que describen la relación entre las variables

independientes y la respuesta (EI) para cada inmovilización. Estas relaciones están dadas por las ecuaciones 3.4 (para PGMA) y 3.5 (para PGMA-NH₂).

$$EI = 117.63 - 5.09A + 1.25B + 94.25C + 0.030AB + 0.57AC + 0.73BC + 0.038A^2 - 0.21B^2 - 12.06C^2 \quad [\text{Ec. 3.4}]$$

$$EI = 33.29 + 3.75A - 1.61B - 4.22C - 0.015AB - 0.16AC + 0.73BC - 0.14A^2 - 0.011B^2 - 0.051C^2 \quad [\text{Ec. 3.5}]$$

Adicionalmente, mediante análisis de varianza (ANOVA) se evaluó la idoneidad del modelo utilizado, el efecto de las variables, y de sus interacciones para la inmovilización sobre las microesferas de PGMA y PGMA-NH₂. Los coeficientes de determinación obtenidos para cada modelo aplicado fueron $R^2_{\text{PGMA}} = 0.90$ y $R^2_{\text{PGMA-NH}_2} = 0.89$, lo que significa que el 90 y 89 % de la variabilidad de la respuesta puede ser predicha por el modelo utilizado diseñado para la optimización de la inmovilización de la enzima TvL sobre microesferas de PGMA y PGMA-NH₂, respectivamente. Estos valores son considerablemente buenos cuando se trabaja con sistemas biológicos, y concuerda con valores previamente publicados sobre procesos de optimización de enzimas lacasa utilizando MSR, indicando una alta correlación entre las variables independientes y la respuesta^{104,109}. De este modo, el modelo permite predecir los resultados para la inmovilización enzimática sobre ambos soportes.

Los valores F obtenidos para PGMA (5.75) y PGMA-NH₂ (4.88) (Tablas S3.2 y S3.3, Información suplementaria) indican que los modelos fueron significativos en ambos casos. Adicionalmente, los valores de “probabilidad $> F$ ” menores a 0.05 indican que términos del modelo fueron significativos para la respuesta. En el caso de PGMA, los términos significativos fueron el tiempo y los coeficientes cuadráticos generados por concentración enzimática y el pH, siendo el tiempo el valor más influyente en la respuesta. Para PGMA-NH₂, los términos significativos fueron el tiempo, la concentración enzimática y el coeficiente cuadrático del tiempo, siendo la concentración enzimática el componente más influyente en la respuesta.

De acuerdo a estos resultados, el modelo puede ser usado para generar superficies de respuesta que permitan evaluar el efecto de las variables sobre la eficiencia de inmovilización. Tres de las superficies obtenidas para cada respuesta se muestran en la Fig. 3.9. El efecto del tiempo de contacto y el pH de la solución sobre la eficiencia de inmovilización (EI) a concentraciones enzimáticas constantes de 10.1 mg/mL y 20.0 mg/mL se muestran en las gráficas (A) y (B), respectivamente. Para PGMA (A), la EI muestra valores altos alrededor de pH 4.5 y decrece con el tiempo. Por su parte para PGMA-NH₂ (B), la EI aumenta a valores altos de pH y a un tiempo intermedio de alrededor de 12 h. Este comportamiento puede deberse a que a valores bajos de pH la amina del soporte se encuentra protonada y no está disponible para la inmovilización enzimática. En las Fig. 3.9 (C) y (D), se muestra la influencia de la interacción entre la concentración enzimática y el tiempo de contacto sobre la EI a valores de pH constante de 4.25 y 5.50, respectivamente. Para PGMA (C), la EI aumenta a tiempos bajos de contacto y a concentraciones enzimáticas de alrededor de 10.0 mg/mL. En la Fig. 3.9 (D) se observa que el incremento en EI se da al aumentar la concentración enzimática y a tiempos intermedios de alrededor de 8 h. En las Fig. 3.9 (E) y (F) revelan la interdependencia entre la concentración enzimática y el pH a tiempos fijos de 1.0 h y 12.5 h, respectivamente. La superficie generada en PGMA (E) demuestra que la EI incrementa cuando la concentración está alrededor de 10.0 mg/mL y el pH cerca de 4.20. Por su parte, para PGMA-NH₂ (F), el valor máximo de EI se obtiene a altos valores de pH y de concentraciones enzimáticas.

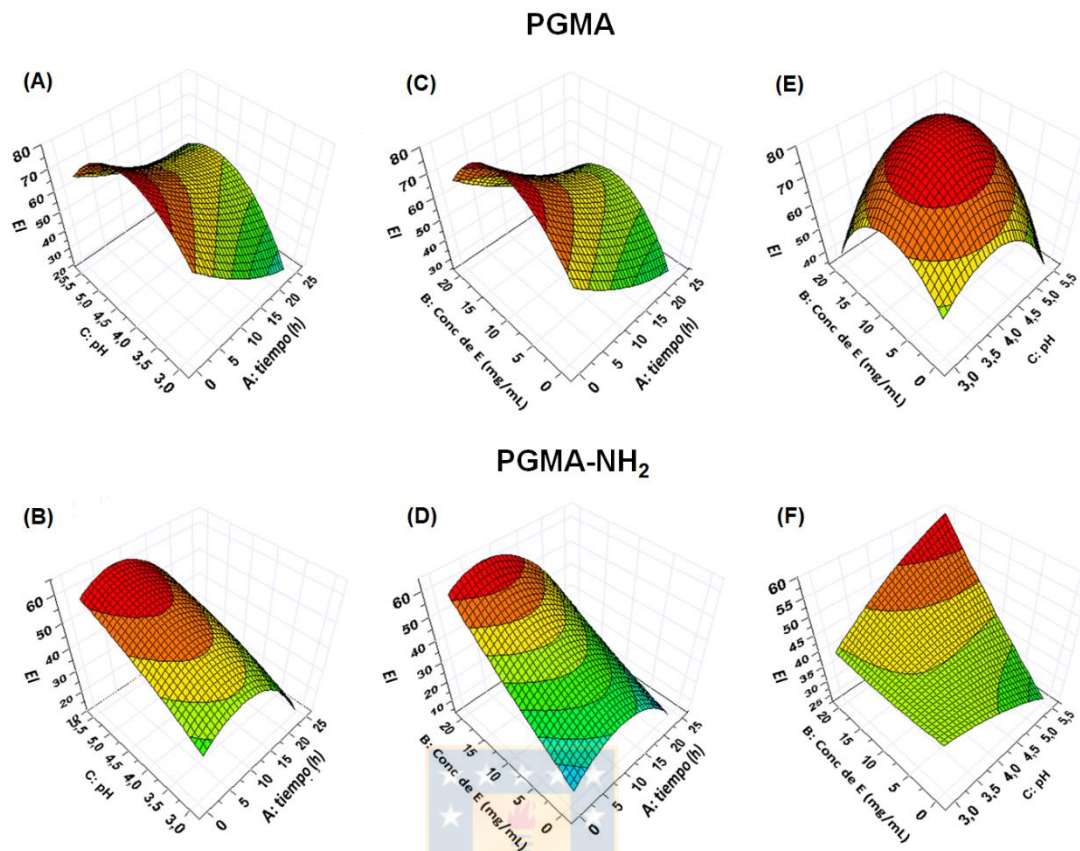


Fig. 3.9. Superficies de respuesta obtenidas al evaluar la EI de la enzima TvL sobre microesferas de PGMA (A, C y E) y PGMA-NH₂ (B, D y F). En (A) y (B) se evaluó la respuesta a diferentes tiempos de contacto y pH, manteniendo las concentraciones de enzima constantes en 10.1 mg/mL y 20 mg/mL, respectivamente. En (C) y (D) se evaluó el efecto de la concentración de enzima y el tiempo a valores de pH constantes de 4.25 y 5.50 respectivamente. En (E) y (F) se evaluó el efecto de la concentración de enzimas y el pH a tiempos constantes de 1.0 h y 12.5 h (Adaptado de M. Vera, *et al.*⁸⁴).

Después de la evaluación de las superficies de respuestas, se procedió a la optimización de la respuesta para cada tipo de microesfera. En el caso de PGMA, los valores de los factores para la optimización de la EI fueron 10.5 mg/mL, 1.0 h y 4.24 para la concentración enzimática, el tiempo de contacto y el pH, respectivamente. Al realizar la inmovilización a estas condiciones, se obtuvo una EI del 81.3 % para la enzima inmovilizada, la cual estuvo muy cerca del valor predicho por el modelo (85.3 %). En el caso de las microesferas de PGMA-NH₂, los valores de los factores que optimizan la EI

fueron 20.0 mg/mL, 8.6 h y 5.50 para la concentración enzimática, el tiempo de reacción y el pH, respectivamente. Los valores experimentales y teóricos al trabajar con las condiciones óptimas fueron de 64.4 % y 64.3 %, respectivamente. Aunque en este estudio ambos valores estuvieron muy cerca del valor predicho por el modelo, en el caso de la inmovilización sobre las microesferas de PGMA se observó una mayor actividad y eficiencia de inmovilización al trabajar con las condiciones óptimas, lo que indica que el modelo es ideal para predecir el efecto de cada factor estudiado sobre la EI.

Basado en este estudio, se realizó la inmovilización de la enzima TvL sobre ambos tipos de microesferas en las condiciones óptimas y se evaluaron las propiedades de la enzima libre e inmovilizada con el fin de establecer la influencia de la inmovilización y el tipo de soporte utilizado sobre la actividad y estabilidad de la enzima TvL.

3.3.3 Efecto del pH y la temperatura sobre la enzima lacasa libre e inmovilizada

El efecto del pH sobre la actividad de la enzima TvL libre e inmovilizada sobre ambos tipos de soportes se muestra en la Fig. 3.10. La comparación se realizó en términos de actividad relativa, la cual está determinada por la relación entre la actividad al pH de estudio y la actividad a pH 3.0. En todos los casos el pH óptimo fue 3.0 y la tendencia en los demás valores de pH fue similar. Sin embargo, para las enzimas inmovilizadas, la disminución en la actividad a valores de pH diferentes al óptimo fue menos marcada que para la enzima libre. En particular, la mayor tolerancia a los cambios de pH se observó en las enzimas inmovilizadas sobre microesferas de PGMA, ya que a pH 6.0, tanto las enzimas libres como las inmovilizadas sobre PGMA-NH₂ presentaron una pérdida total de la actividad. Sin embargo, las enzimas inmovilizadas sobre PGMA conservaron casi el 20 % de la actividad. Estos resultados indican que la inmovilización de enzimas lacasa mediante enlace covalente mejora la estabilidad de las enzimas a diferentes valores de pH, dándole más estabilidad y resistencia a la desnaturalización causada por cambios de pH, lo cual concuerda con resultados previamente publicados sobre inmovilización enzimática covalente^{85,110}. Sin embargo, es importante resaltar que aunque hay una estabilidad asociada al proceso de inmovilización, el grupo funcional por el cual se inmoviliza también afecta significativamente el comportamiento de la enzima, siendo en este caso la

inmovilización sobre microesferas de PGMA las que generaron mayor estabilidad en la enzima TvL a los diferentes valores de pH estudiados.

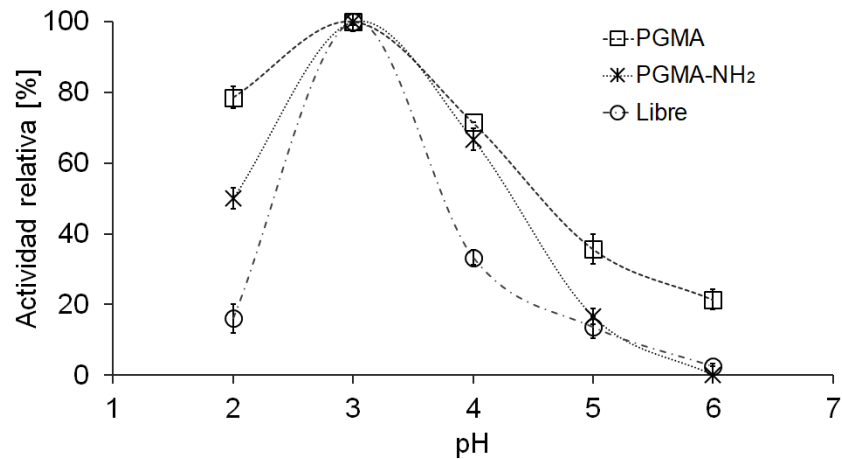


Fig. 3.10. Actividad relativa de la enzima TvL libre e inmovilizada sobre microesferas de PGMA y PGMA-NH₂ a diferentes valores de pH. Todos los experimentos se realizaron por triplicado a 25 °C y se muestran con la correspondiente desviación estándar (Adaptado de M. Vera, et al.⁸⁴).

La temperatura es otro factor que influye en la actividad enzimática. En este estudio, se evaluó el efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima TvL libre e inmovilizada, como se muestra en la Fig. 3.11. Los perfiles indican que tras la inmovilización, la temperatura óptima se encuentra en el intervalo de temperaturas entre 50-60 °C para las enzimas inmovilizadas sobre las microesferas de PGMA y es evidente que además de ampliarse el rango de máxima actividad, también aumentó la estabilidad de la enzima a temperaturas más altas. En el caso de la enzima inmovilizada sobre microesferas de PGMA-NH₂, no se presentó ninguna mejora en la estabilidad enzimática. En este último caso, así como para la enzima libre, la actividad máxima se alcanzó a 50 °C, sin embargo, a temperaturas diferentes, la pérdida de actividad fue mayor para las enzimas inmovilizadas sobre PGMA-NH₂ que para la enzima libre. De este estudio se puede concluir que la formación de enlaces covalentes entre los grupos oxirano en el soporte y los grupos amino en la superficie de la enzima (por residuos como lisina y arginina) generan mayor estabilidad conformacional de la enzima inmovilizada, que generalmente está relacionado con la unión multipunto de la enzima sobre el soporte, lo

que causa mayor resistencia a la desnaturalización de la enzima en las condiciones de trabajo y en este caso particular a las altas temperaturas^{74,111,112}.

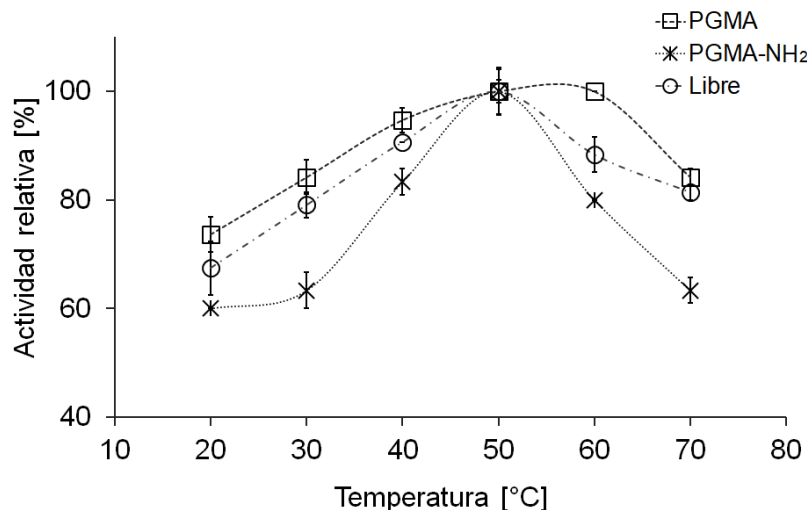


Fig. 3.11. Actividad relativa de la enzima TvL libre e inmovilizada sobre microesferas de PGMA y PGMA-NH₂ a diferentes valores de temperatura. Todos los experimentos se realizaron por triplicado a pH 3.0 y se muestran con la correspondiente desviación estándar (Adaptado de M. Vera, *et al.*⁸⁴).

3.3.4 Parámetros cinéticos

Utilizando ABTS como sustrato, se evaluaron los parámetros cinéticos tales como la constante de Michaelis (K_m), la velocidad máxima (V_{max}), el número de recambio (K_{cat}), y la eficiencia catalítica (K_{cat}/K_m) de la enzima TvL libre e inmovilizada, tal como se muestra en la Tabla 3.4. La constante K_m es la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima de reacción. El parámetro V_{max} , representa la velocidad máxima de reacción alcanzada cuando todas las enzimas se unen al sustrato. Por su parte, el número de recambio (K_{cat}) indica el número máximo de moléculas de sustrato convertidas en producto por unidad de tiempo por una molécula de la enzima¹¹³. La determinación de K_m y V_{max} se realizó a partir del ajuste gráfico lineal usando el método de Lineweaver–Burk, obteniéndose constantes de correlación por encima de 0.99 para los tres casos, lo que indica que los datos obtenidos se ajustan muy bien al método.

Tabla 3.4. Parámetros cinéticos de la enzima TvL libre e inmovilizada (Fuente: Elaboración propia).

Muestra	K_m (mmol/L)	V_{max} ($\mu\text{mol}/(\text{min}\times\text{mg})$)	K_{cat} (1/s)	K_{cat}/K_m (1/s \times mM)
Lacasa libre	13.9 ± 1.9	127.7 ± 23.4	170.3	12.3
Lacasa-PGMA	12.3 ± 1.7	49.1 ± 10.4	65.4	5.3
Lacasa-PGMA-NH ₂	53.3 ± 3.0	117.6 ± 17.8	156.8	2.9

Para analizar los valores mostrados en la Tabla 3.4 es importante indicar que el valor de la constante K_m da una idea de la afinidad que tiene la enzima por el sustrato, cuanto menor es este valor, mayor es la afinidad¹¹³. En el caso de la enzima libre y la inmovilizada sobre PGMA, los valores de K_m fueron más bajos que los obtenidos para la enzima inmovilizada sobre PGMA-NH₂, lo que indica que para los dos primeros casos la afinidad enzima-sustrato fue alta comparada con la inmovilización sobre PGMA-NH₂. Estas diferencias se pueden atribuir a cambios estructurales debido al proceso de inmovilización y al tipo de enlace enzima-soporte formado^{114,115}. Por otro lado, en el caso de V_{max} el principal cambio se dio en la inmovilización sobre PGMA, el cual se puede atribuir a una disminución en la velocidad para convertir sustratos cuando la inmovilización se realizó sobre ese soporte, esta disminución en la velocidad concuerda con valores previamente observados y es usualmente atribuida a la restricción de movilidad tras la inmovilización¹¹⁶. En cuanto al valor de K_{cat} , también se observa una disminución, en este caso para ambas inmovilizaciones, lo que indica que la actividad de la enzima se reduce al inmovilizarse sobre ambos tipos de soporte. Finalmente, mediante la relación K_{cat}/K_m se determinó la eficiencia catalítica, que demostró reducirse con las inmovilizaciones, siendo el menor valor para la inmovilización sobre PGMA-NH₂. Estos cambios en las variables son observados de manera frecuente en procesos de inmovilización enzimática y pueden atribuirse a diferentes factores tales como cambios conformacionales, disminución de la flexibilidad de la enzima o menor accesibilidad al sitio activo de la enzima debido a la rigidez causada por la inmovilización, disminuyendo como resultado la eficiencia catalítica^{85,117,118}.

3.3.5 Reusabilidad y estabilidad de almacenamiento

La reusabilidad de las enzimas es uno de los aspectos que más limita su uso a nivel industrial, ya que la enzima libre difícilmente se puede extraer del medio de reacción para su reutilización. La ventaja de la inmovilización enzimática es que facilita la reusabilidad, reduciendo los costos asociados a su uso. En este estudio, se evaluó la reusabilidad durante 5 ciclos, tal como se muestra en la Fig. 3.12. En ella se observa que la actividad relativa decreció hasta un 73.3 % y 66.7 % con respecto a los valores iniciales para PGMA y para PGMA-NH₂, respectivamente. En ambos casos, la mayor pérdida de actividad se dio del primer al segundo ciclo, lo cual se puede atribuir a presencia de enzima libre en el medio, que se removió con el primer lavado. Después del tercer lavado, la actividad se mantuvo casi constante para ambos soportes, esto indica que la inmovilización mediante enlace covalente permitió que la enzima se enlazara fuertemente sobre ambos tipos de soportes, generando además una baja pérdida de actividad de las enzimas inmovilizadas hasta el ciclo 5.

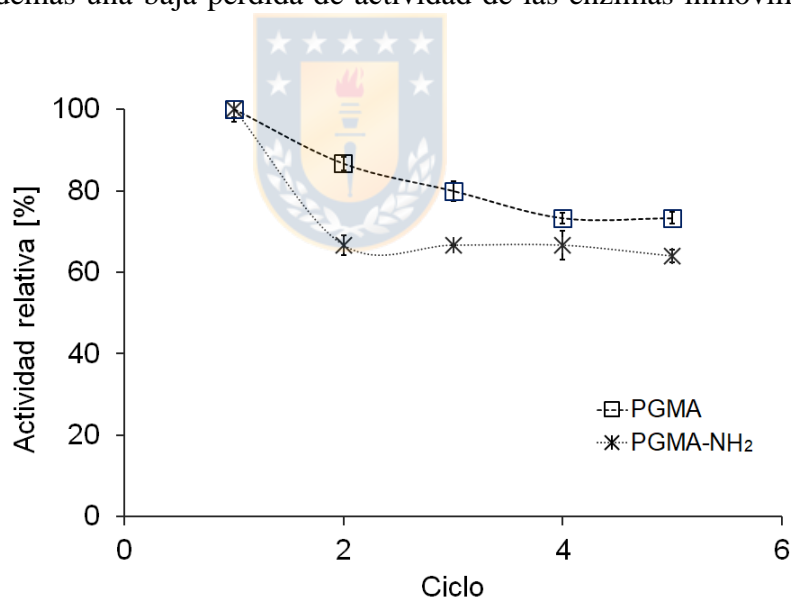


Fig. 3.12. Análisis de reusabilidad de la enzima TvL inmovilizada sobre microesferas de PGMA y PGMA-NH₂. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se muestran con la correspondiente desviación estándar (Adaptado de M. Vera, *et al.*⁸⁴).

En el estudio de la estabilidad de almacenamiento se determinó la actividad de la enzima libre e inmovilizada durante 20 días, tal como se muestra en la Fig. 3.13. Los resultados

muestran que la enzima inmovilizada sobre PGMA retuvo mayor actividad (81.8 %) que la enzima libre (60.0 %) y que la inmovilizada sobre PGMA-NH₂ (10.0 %), demostrando que la inmovilización sobre microesferas de PGMA genera una mayor estabilidad de almacenamiento, permitiendo conservar la actividad enzimática por un mayor periodo de tiempo. Estas diferencias se pueden atribuir a dos factores principales. (1) Probablemente la enzima se enlazó al soporte de PGMA mediante los grupos lisina de la superficie de la enzima (los cuales son altamente activos), por lo que no se generó un cambio significativo en el centro catalítico de la enzima. Adicionalmente, esta interacción con los aminoácidos lisina superficiales aumentan la probabilidad del anclaje multipunto entre la enzima y el soporte, lo que se refleja en una mayor estabilidad en comparación con la enzima libre o la inmovilizada sobre PGMA-NH₂¹¹⁹. (2) Debido a que la cantidad de grupos amina en la superficie de PGMA-NH₂ es menor que la cantidad de grupos epóxido en PGMA (Sección 3.3.1, el porcentaje de N es 5.77 %), para PGMA-NH₂ hay menos posibles puntos que generen el anclaje multipunto, disminuyéndose la rigidez y por ende la estabilidad de la enzima inmovilizada en este soporte, lo que resulta en menos estabilidad de almacenamiento.

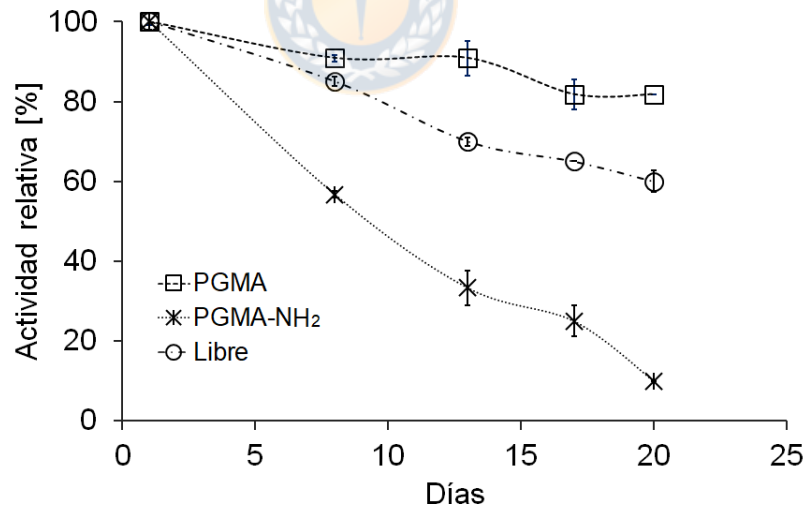


Fig. 3.13. Análisis de estabilidad de almacenamiento de la enzima TvL libre e inmovilizada sobre microesferas de PGMA y PGMA-NH₂. Todos los experimentos se realizaron por triplicado a 25 °C y se muestran con la correspondiente desviación estándar (Adaptado de M. Vera, *et al.*⁸⁴).

Como se mencionó anteriormente, la mayor estabilidad de la enzima al inmovilizarse sobre el soporte de PGMA se puede atribuir a la unión multipunto de ésta sobre el soporte. Al analizar la estructura tridimensional de la enzima TvL (Fig. 3.14) se observa que los aminoácidos de lisina (8 en total) están ubicados superficial y únicamente sobre un lado de la enzima. Debido a que los grupos amino pertenecientes a los aminoácidos lisina son altamente activos y se encuentran ubicados lejos del sitio activo de ésta (conformado por 4 átomos de cobre representado por esferas de color café), la unión multipunto de estos grupos sobre el soporte de oxirano no deformaría drásticamente la configuración del sitio activo, pero sí generarían una mayor estabilidad de la enzima, reduciendo cambios conformacionales asociados a su desnaturalización, como se observó en las caracterizaciones realizadas en las secciones anteriores¹¹². Otro aspecto que favorecería la unión multipunto entre la enzima y el soporte, es la diferencia de tamaño, ya que la enzima posee un tamaño aproximado 6.00 nm y el soporte de 2.85 μm . De este modo, aunque ambos posean formas esféricas, debido a la diferencia de tamaño, la enzima tendría una superficie ligeramente plana suficiente como para generar la unión de varias lisinas sobre el soporte, siendo en este caso favorecido por la presencia de gran densidad de grupos epóxido en la superficie, tal como se ha reportado anteriormente¹¹².

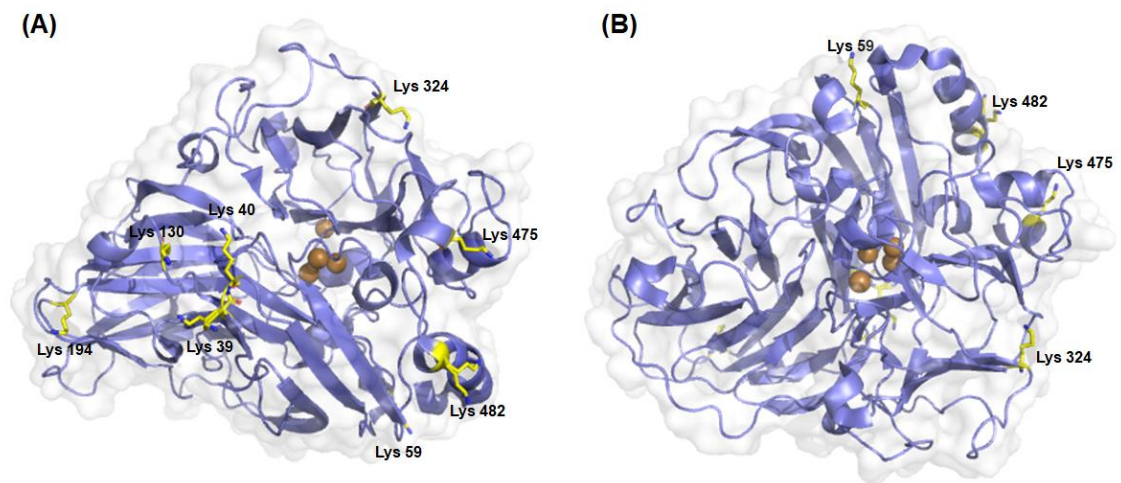


Fig. 3.14. Estructura tridimensional de la enzima TvL obtenida a partir de difracción de rayos X (RCSB Protein Data Bank: 1GYC¹²⁰) con los grupos lisina marcados (Fuente: Elaboración propia).

3.4 Conclusiones

De los resultados mostrados en este capítulo, se concluye que la síntesis de microesferas poliméricas de PGMA mediante el método de polimerización por dispersión y su dilución en grandes cantidades de metanol una vez finalizada la síntesis es una excelente alternativa para la obtención de microesferas poliméricas con una alta homogeneidad de tamaño y de forma. Posteriormente, mediante un tratamiento con hidrato de hidrazina, fue posible la modificación superficial de los grupos oxirano, lo que permitió obtener dos tipos de soportes poliméricos con diferentes grupos funcionales superficiales (hidrazida y oxirano); pero con el mismo polímero de base e iguales propiedades físicas.

En cuanto a la inmovilización enzimática, se observó que la combinación de DBB y MSR es una excelente alternativa para la optimización de las condiciones de inmovilización sobre microesferas poliméricas. Los valores de EI obtenidos usando las condiciones arrojadas por el modelo fueron de 81.3 % para PGMA y 64.4 % para PGMA-NH₂. Después de la inmovilización, la enzima TvL inmovilizada sobre PGMA mostró mayores rangos de trabajo de temperatura y pH, mejores valores de reusabilidad (conservando el 73.3 % de la actividad relativa después de 5 ciclos de reuso) y mayor estabilidad de almacenamiento (manteniendo 81.8 % de la actividad inicial después de 20 días), comparado con la enzima libre y la inmovilizada sobre PGMA-NH₂. La eficiencia catalítica disminuyó después de ambas inmovilizaciones (sobre PGMA y PGMA-NH₂). Sin embargo, a pesar de la disminución de la eficiencia catalítica, los resultados generales mostraron que las microesferas de PGMA podrían actuar como un soporte ideal para la inmovilización enzimática debido a que su inmovilización se realiza principalmente mediante grupos lisina superficiales en la enzima, lo que genera la unión multipunto y da como resultado un sistema con mayor estabilidad hacia la desnaturalización, cumpliendo con varios de los requisitos necesarios para aplicaciones biotecnológicas.

4. Co-inmovilización de dos enzimas lacasa y su aplicación en la degradación de diazinon

4.1 Introducción

En el capítulo anterior, se demostró que la inmovilización mejora diversas propiedades bioquímicas de las enzimas. Esta capacidad de mejorar la estabilidad a diferentes valores de pH o temperatura, el aumento en la estabilidad de almacenamiento y de reutilización, junto con la capacidad que poseen las enzimas lacasas para degradar diferentes compuestos altamente recalcitrantes como plaguicidas, colorantes y fármacos¹²¹⁻¹²³, se ha usado en varias investigaciones como una alternativa ambientalmente amigable y de bajo costo para la biorremediación^{45,68}.

Aunque hasta el momento nuestros resultados muestran que la inmovilización de una sola enzima es una excelente alternativa para mejorar algunas propiedades enzimáticas, la co-inmovilización de dos enzimas con dos rangos de pH de trabajo diferentes, podría tener diferentes ventajas sobre la inmovilización de una sola enzima, tales como la expansión del rango de trabajo de pH óptimo, el aumento de los posibles sustratos a degradar y el incremento de las aplicaciones que podrían tener los sistemas de enzima inmovilizada.

Basado en lo anterior, el objetivo de este capítulo fue dar un primer acercamiento a la construcción de un sistema de enzimas co-inmovilizadas sobre el mismo soporte polimérico, expandiendo el rango de pH de trabajo en la región ácida y de este modo ampliando en rango de pH de degradación del pesticida diazinon. La co-inmovilización se llevó a cabo inmovilizando simultáneamente enzimas lacasa provenientes de *Trametes versicolor* (TvL) y *Agaricus bisporus* (AbL) sobre las microesferas de PGMA sintetizadas previamente (informadas en el capítulo anterior) y utilizando las condiciones optimizadas en el capítulo 3. El sistema de enzimas co-inmovilizadas, llamado biocatalizador polimérico, se caracterizó comparándose con las enzimas libres y las inmovilizadas de forma individual. Finalmente, el biocatalizador polimérico se probó en la degradación del pesticida diazinon a los valores de pH de máxima actividad.

4.2 Metodología

4.2.1 Inmovilización de las enzimas lacasa

La inmovilización enzimática se realizó sobre las microesferas de PGMA previamente sintetizadas y caracterizadas (Secciones 3.2.1-3.2.2). Para esto, la cantidad óptima de proteína (a la cual toda la enzima aplicada es inmovilizada) se determinó experimentalmente mediante inmovilizaciones individuales de cada enzima sobre el soporte. Una vez realizada ésta determinación, 10 mg de soporte se pusieron en contacto con 1.0 mL de solución de enzimas a diferentes concentraciones (Tabla 4.1). Se realizaron experimentos de control inmovilizando ambas enzimas separadamente a las condiciones óptimas. Las enzimas de trabajo en esta Sección fueron adquiridas comercialmente en Sigma-Aldrich (Chile). Para la co-inmovilización, ambas enzimas (AbL y TvL) se mezclaron simultáneamente usando la mitad de la proteína usada en las inmovilizaciones individuales (Tabla 4.1). En todos los casos, el proceso de inmovilización se llevó a cabo por triplicado a pH 4.2 agitando a 140 rpm durante 24 h. Una vez transcurrida la inmovilización, las microesferas con enzima inmovilizada se lavaron tres veces con una solución buffer pH 4.2 (0.1 mol/L ácido cítrico/ 0.2 mol/L fosfato de sodio) con el fin de remover la enzima libre. Finalmente, se midió la cantidad de proteína en los lavados y la actividad de la enzima libre e inmovilizada. La medida de la concentración de proteína se realizó usando el protocolo previamente descrito en la Sección 3.2.3.

4.2.2 Determinación de la actividad enzimática

Para este capítulo y el siguiente, la medida de la actividad enzimática se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro TECAN Infinite M200 Pro para monitorear la oxidación de ABTS, debido a que la medida de la actividad se realiza de forma más eficiente y utilizando menos volumen, pero la tendencia estudiada es igual a la analizada por el método propuesto en la Sección 3.2.5. En este estudio la mezcla de reacción consistió de 50.0 μ L de ABTS (10 mmol/L) y 170.0 μ L de la muestra. El incremento de la absorbancia se midió a 420 nm y la actividad se expresó en unidades (U). Todas las medidas se realizaron por triplicado y los resultados se presentan con su correspondiente desviación

estándar. Adicionalmente, el cálculo de la actividad se realizó utilizando la siguiente ecuación:

$$A = \frac{\Delta A \cdot V \cdot f}{V_e \cdot \epsilon \cdot l} \quad [\text{Eq. 4.1}]$$

donde A es la actividad (U/mL), ΔA es el cambio en la absorbancia a 420 nm, V es el volumen total de la reacción (mL), f es el factor de dilución empleado, V_e es el volumen de solución de enzima adicionado, l es la longitud óptica (0.61 cm), ϵ es el coeficiente de extinción molar (mL/ $\mu\text{mol} \times \text{cm}^{-1}$) el cual varía dependiendo del pH de la solución como se detalla en la Tabla 3.3.

4.2.3 Caracterización de las enzimas libres e inmovilizadas

El comportamiento de las enzimas libres, inmovilizadas y co-inmovilizadas se estudió a diferentes valores de pH (2-6) y de temperatura (20-70 °C), tal como se detalló en las Secciones 3.2.6-3.2.7. Adicionalmente, se evaluó la reusabilidad del sistema de enzimas co-inmovilizadas durante 6 ciclos de reuso y se estudió la estabilidad de almacenamiento de las enzimas libres e inmovilizadas durante 20 días, almacenando las enzimas a 4 °C, de acuerdo a las especificaciones dadas en la Sección 3.2.9. Todos estos estudios se llevaron a cabo por triplicado y los resultados se reportaron con la desviación estándar correspondiente.

4.2.4 Análisis estadístico de los datos

Todas las medidas se realizaron por triplicado y se expresaron con la correspondiente desviación estándar, a menos que se indique otra especificación. Las diferencias significativas entre las medias de los datos obtenidos se evaluaron usando el software estadístico SPSS versión 25. El análisis de los datos se realizó mediante ANOVA de una cola y las diferencias estadísticas entre medias se estudiaron con la prueba de Duncan con un 5 % de significancia. Los valores se consideraron significantes cuando $p < 0.05$.

4.2.5 Degradación de diazinon usando el sistema de enzimas co-inmovilizadas

Los estudios de degradación del pesticida diazinon, se realizaron a los valores óptimos de pH de las enzimas co-inmovilizadas (pH 2.0 y 3.0) y a 25 °C con el fin de tener una alta actividad de las enzimas durante la degradación. Este proceso, se llevó a cabo en tubos Eppendorf que contenían 1 mL de solución a 120 µg/mL de diazinon y 0.2 U/mL de enzimas co-inmovilizadas en 1.0 mL de dispersión. El pH de las reacciones se mantuvo usando como solvente soluciones buffer de 0.1 mol/L ácido cítrico/0.2 mol/L fosfato de sodio y en los experimentos llevados a cabo usando mediador, se adicionó 1.0 mmol/L de ABTS. Todas las reacciones de degradación se llevaron a cabo en la oscuridad y agitando a una velocidad de 140 rpm y se colectaron muestras en diferentes intervalos de tiempo (0, 1, 6, 12, 24 y 48 h). Cada reacción se llevó a cabo por duplicado y se realizaron experimentos de control utilizando microesferas sin enzimas inmovilizadas, con el fin de verificar procesos de adsorción del pesticida sobre microesferas. Adicionalmente, se hicieron blancos de los experimentos de degradación con mediador. Para ello, se llevó a cabo la reacción de las enzimas inmovilizadas únicamente con el mediador (sin diazinon), con el fin de verificar que la oxidación del ABTS no generara bandas que interfirieran con la banda de absorción del diazinon.

4.2.6 Análisis de la degradación de diazinon

Después de la degradación, se llevó a cabo el método de precipitación de Carrez, el cual consiste en la adición de dos soluciones (Carrez I y II que contienen $K_4[Fe(CN)_6]$ y $ZnSO_4$, respectivamente), las cuales generan la aglomeración y precipitación de cualquier enzima libre o débilmente enlazada, para evitar que ésta interfiera en las medidas cromatográficas. Posterior a la adición de las soluciones de Carrez I y II, se procedió a centrifugar las muestras a 12000 rpm durante 10 min, se recolectó el sobrenadante y se filtró a través de filtros de jeringas de 0.2 µm que poseían una membrana de PTFE (Millipore Simplicity-Syringe Filters).

La degradación de diazinon en las muestras se siguió mediante cromatografía líquida de alta eficacia con detector de arreglo de diodos, HPLC-DAD (YL9100 HPLC System),

equipado con una columna C18 de fase reversa (RP-18, 150 x 4.6 mm, 5 μ m). Para ello, se inyectaron 20 μ L de la muestra y se eluyó a condiciones isocráticas utilizando como fase móvil acetonitrilo:agua (70:30) a un flujo de 1.0 mL/min. Durante el análisis la columna se mantuvo a 30 °C. La detección se llevó a cabo usando un detector de arreglo de diodos (YL9160 PDA Detector) a una longitud de onda de 254 nm. El grado de adsorción y degradación se calculó usando las siguientes ecuaciones^{72,124}.

$$C_{\text{ads}} = C_0 - C_1 \quad \text{Ec. 4.1}$$

$$C_{\text{deg}} = \frac{C_1 - C_2}{C_1} \times 100 \quad \text{Ec. 4.2}$$

donde C_{ads} es la concentración de diazinon adsorbido sobre las microesferas, C_0 es la concentración inicial de diazinon, C_1 es la concentración después de la adsorción, C_{deg} es la concentración de diazinon degradado y C_2 es la concentración final.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Inmovilización de las enzimas lacasa

El proceso de inmovilización de enzimas lacasa se llevó a cabo durante 24 h a temperatura ambiente y mediante las medidas de proteína y actividad antes y después de la inmovilización, se determinó la cantidad y actividad de las enzimas inmovilizadas (Tabla 4.1). Para las inmovilizaciones individuales, la cantidad de enzima presente en los lavados fue de alrededor del 11 %, lo que indica que se inmovilizó casi toda la enzima adicionada al inicio de la reacción. En cuanto a la co-inmovilización, la pérdida de proteína en la co-inmovilización estuvo por debajo del 5 %, este valor demuestra que ambas enzimas fueron co-inmovilizadas sobre el soporte. Lo anterior, evidencia que el protocolo propuesto en ésta tesis es ideal para alcanzar la co-inmovilización de dos tipos diferentes de enzimas lacasa.

Tabla 4.1. Lacasas inmovilizadas y co-inmovilizadas sobre microesferas de PGMA (Fuente: Elaboración propia).

Lacasa aplicada	Proteína inmovilizada [mg proteína g ⁻¹ soporte]	Actividad enzima inmovilizada [U g ⁻¹ soporte]
TvL	8.40 ± 0.60	6.82 ± 0.25
AbL	10.25 ± 1.05	7.78 ± 1.02
TvL (4.20 mg proteína g ⁻¹ soporte) y AbL (5.10 mg proteína g ⁻¹ soporte)	9.13 ± 0.17	6.75 ± 0.57

4.3.2 Efecto del pH y la temperatura en las enzimas libres e inmovilizadas

En este estudio, se analizó el efecto del pH sobre la actividad de las enzimas libres e inmovilizadas en el rango de pH de 2.0 – 6.0, tal como se muestra en la Fig. 4.1. Se observó que tanto para TvL libre e inmovilizada, como para AbL libre, el pH de máxima actividad es pH 3.0. Sin embargo, tal como se observó en la Sección 3.3.3 la pérdida de actividad a valores de pH diferentes del óptimo es mayor para las enzimas libres, conservándose una mayor actividad a valores diferentes del óptimo en TvL inmovilizada. Por otro lado, para AbL inmovilizada, el pH de máxima actividad en el rango estudiado se desplaza a pH 2.0. Este tipo de desplazamientos después de la inmovilización, son comunes en las inmovilizaciones en las que se forman enlaces covalentes y comúnmente se atribuye a pequeños cambios en la estructura terciaria de la enzima a causa de la interacción con el soporte¹¹². Por esta razón, es que siempre después de cualquier proceso de inmovilización es necesario el estudio de las propiedades enzimáticas, ya que debido a los cambios estructurales asociados a la inmovilización, se pueden presentar cambios en las condiciones óptimas de operación de las enzimas, tal como se observó en este caso. Para el sistema de enzimas co-inmovilizadas o biocatalizador polimérico, se presentaron dos valores de actividad máxima (pH 2.0 y 3.0) que coincidieron con los valores óptimos de pH de ambas enzimas inmovilizadas separadamente. Esta propiedad demuestra que al realizarse la co-inmovilización, es posible ampliar el pH de trabajo de máxima actividad. En este caso, el rango de trabajo óptimo es ideal para estudiar procesos de degradación de

sustancias recalcitrantes que poseen estabilidad en este rango de pH, como el pesticida diazinon y otros compuestos organofosforados¹²⁵.

Respecto al análisis estadístico de los resultados realizado con el test de Duncan, se observó que a pH 2.0 existe una diferencia significativa entre los valores arrojados para el sistema de enzimas co-inmovilizadas y tanto las enzimas libres como con TvL inmovilizada. Para pH 3.0, la diferencia significativa para las enzimas co-inmovilizadas se generó con respecto a la enzima AbL inmovilizada. En cuanto a la estabilidad en el rango de pH de 4.0-5.0 se encontró que el biocatalizador polimérico presentó una mayor estabilidad, generando una diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a las inmovilizaciones individuales y las enzimas libres. De acuerdo a estos resultados, se comprobó que la inmovilización es una excelente estrategia para combinar las propiedades de dos tipos de enzimas inmovilizadas separadamente, creando nuevas características en el biocatalizador polimérico obtenido.

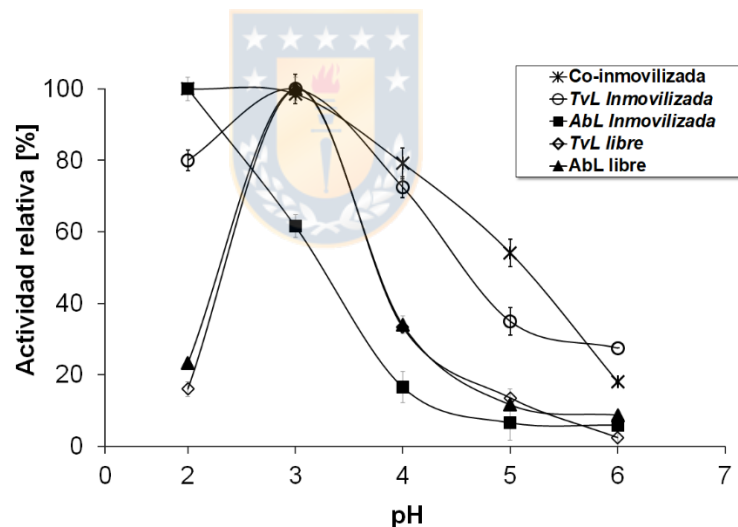


Fig. 4.1. Efecto del pH sobre las enzimas libres, inmovilizadas y co-inmovilizadas. Se muestra el valor promedio de tres medidas con la correspondiente desviación estándar en cada caso (Fuente: Elaboración propia).

El efecto de la temperatura sobre la actividad de las enzimas lacasa libres e inmovilizadas se estudió en el rango de 20-70 °C, tal como se muestra en la Fig. 4.2. En general la tendencia de todas las enzimas fue a aumentar la actividad al incrementar la temperatura. Sin embargo, a excepción de las temperaturas óptimas y de los 70 °C, las actividades de

las enzimas inmovilizadas individualmente fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) que las de sus contrapartes libres, observándose el mismo comportamiento que el presentado en la Sección 3.3.3 en las enzimas inmovilizadas sobre el soporte oxirano, el cual se atribuyó a la unión multipunto de la enzima sobre el soporte¹²⁶.

En la Fig. 4.2, también se observa que el sistema de enzimas co-inmovilizadas tiene un comportamiento intermedio entre el de TvL inmovilizada y ApL inmovilizada, presentando una máxima actividad en el rango de 50-60 °C, lo que evidencia una vez más la posibilidad de combinar propiedades de dos enzimas lacasa para generar un nuevo sistema con propiedades expandidas. Además, estos resultados demuestran que para trabajar con la máxima actividad no se requiere elevar demasiado la temperatura (como se debería hacer en caso de trabajar con las enzimas libres), generándose una disminución en costos en caso de trabajarse en procesos industriales.

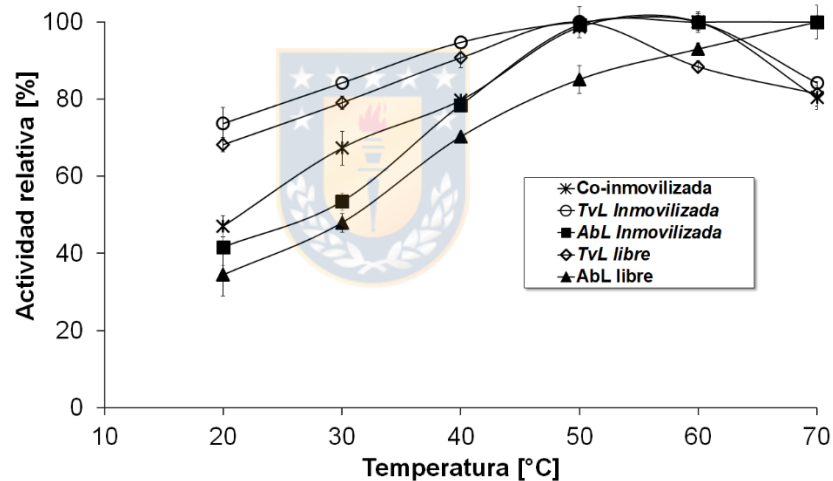


Fig. 4.2. Efecto de la temperatura sobre las enzimas libres, inmovilizadas y co-inmovilizadas. Se muestra el valor promedio de tres medidas con la correspondiente desviación estándar en cada caso (Fuente: Elaboración propia).

4.3.3 Estudios de reusabilidad y estabilidad de almacenamiento

Como se mencionó anteriormente, la reusabilidad es uno de las propiedades más requeridas para el escalamiento a sistemas industriales. En este caso, se estudió la reusabilidad de las enzimas co-inmovilizadas durante 6 ciclos consecutivos de oxidación de ABTS y los resultados se muestran en la Fig. 4.3. En ésta gráfica se observa que

después de 6 ciclos de reuso aún se conserva cerca del 80 % de la actividad inicial y que al igual que en la Sección 3.3.5, la pérdida de actividad más significativa se presenta del primer a segundo ciclo y se puede atribuir a la posible presencia de pequeñas trazas de enzima libre en el sistema, la cual fue eliminada en el primer ciclo de lavado de enzimas. De acuerdo a los datos dados por el ANOVA (con un nivel de significancia del 95 %), no hay diferencias significativas entre los valores obtenidos para cada ciclo ($p = 0.07$). Estos resultados son muy buenos, ya que demuestran que la inmovilización covalente es una buena estrategia para la producción de sistemas de enzimas co-inmovilizadas, que además de permitir la mezcla de las propiedades de cada enzima, ayuda a la preservación de la actividad debido a las fuerzas de interacción fuertes entre las enzimas y el soporte. Estos resultados son coherentes con los observados para la inmovilización individual en la Sección 3.3.5 y con otros previamente obtenidos en procesos de inmovilización mediante formación de enlaces covalentes^{88,127}. Este estudio demuestra que el biocatalizador polimérico conformado por enzimas co-inmovilizadas obtenido por este medio puede ser usado para aplicaciones industriales debido a que se reducen los costos en los procesos que requieren operaciones en lote repetidas y debido a la capacidad de detener las reacciones por simple filtración y empezarlás nuevamente sin presentar pérdidas significativas de actividad enzimática.

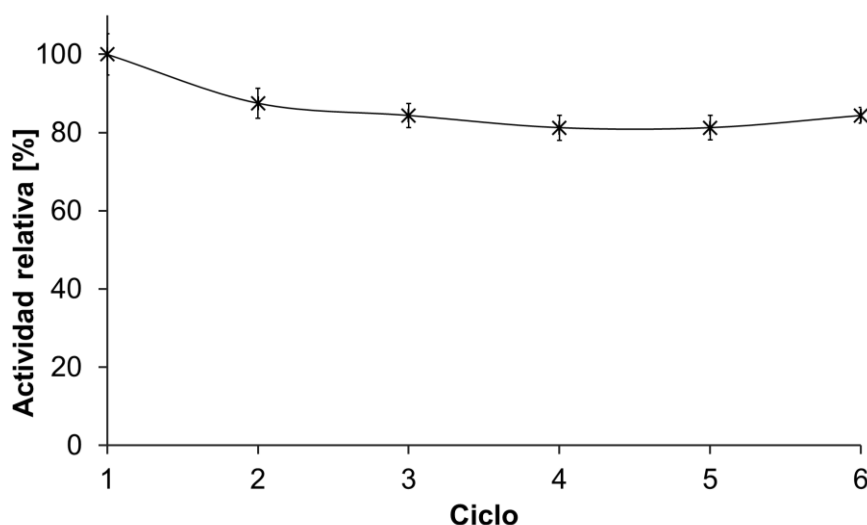


Fig. 4.3. Estudios de reusabilidad del sistema de enzimas co-inmovilizadas sobre microesferas de PGMA. Las medidas se realizaron por triplicado y se muestran con la correspondiente desviación estándar en cada caso (Fuente: Elaboración propia).

Para estudiar la estabilidad de almacenamiento de las enzimas libres e inmovilizadas, todas las enzimas se conservaron a 4 °C y la actividad inicial se seleccionó como el 100 % en cada caso, siguiéndose la pérdida de la actividad durante 20 días, como se observa en la Fig. 4.4. De acuerdo a los datos mostrados en ésta figura, la mayor pérdida de actividad después de los 20 días la presentaron las enzimas libres, las cuales retuvieron el 48 % y el 60 % de actividad inicial para TvL y AbL, respectivamente. A las mismas condiciones de almacenamiento, las enzimas inmovilizadas de TvL y AbL conservaron el 81 % y el 92 % de su actividad inicial, respectivamente. En cuanto al biocatalizador polimérico, la actividad residual fue del 93 %. El incremento significativo ($p < 0.05$) de la estabilidad de almacenamiento tras la inmovilización es una evidencia del potencial que tienen la inmovilización y la co-inmovilización en la prevención de la inactivación enzimática. Adicionalmente, de acuerdo a estos resultados, la co-inmovilización aparentemente genera una sinergia en la estabilidad de las enzimas, protegiéndolas de la desnaturalización¹²⁸. Este aumento en la estabilidad de almacenamiento debido a la inmovilización covalente, concuerda con lo observado y analizado en la Sección 3.3.5. Esta capacidad de retener una alta eficiencia catalítica por más tiempo es una propiedad de los sistemas de enzimas inmovilizadas que los hace idóneos para aplicaciones biotecnológicas que requieran el almacenamiento por largos periodos.

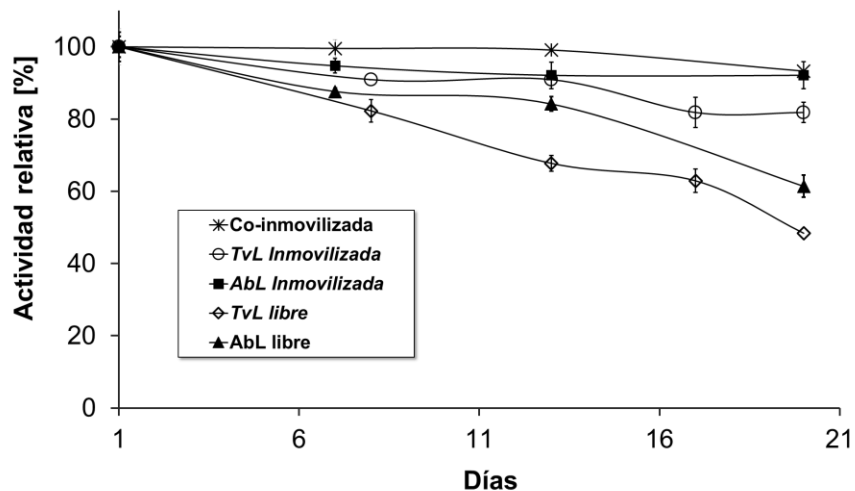


Fig. 4.4. Estabilidad de almacenamiento de las enzimas libres e inmovilizadas almacenadas a 4 °C. Las medidas se realizaron por triplicado y se muestran con la correspondiente desviación estándar (Fuente: Elaboración propia).

4.3.4 Degradación enzimática de diazinon

La degradación del pesticida diazinon se realizó usando el sistema de enzimas co-inmovilizadas (con una actividad inicial de 0.2 U/mL). La evolución en la degradación se siguió mediante HPLC-DAD siguiendo la señal alrededor de 4.47 min (ver Fig. 4.5). La curva de calibración se realizó en el rango de 1.0-20.0 $\mu\text{g/mL}$ y se alcanzó un límite de detección de 0.92 $\mu\text{g/mL}$. La concentración de diazinon inicial adicionada fue de 120.0 $\mu\text{g/mL}$ (en un volumen de 1 mL) y se seleccionó porque aunque los límites permisibles de diazinon en agua potable en diferentes países están alrededor de 0.5-20.0 $\mu\text{g/L}$ ¹²⁹ (para Chile es de 9.0 $\mu\text{g/L}$ ¹³⁰), recientes estudios en los que se investigó la toxicidad del diazinon para peces de agua dulce encontraron que el diazinon se está entre moderadamente y altamente tóxico en forma aguda con valores de LC_{50} que varían de 90 a 7800 $\mu\text{g/L}$ ⁶. Adicionalmente, debido a que se conoce que dentro de las prácticas utilizadas por granjeros en muchos países se encuentra la adición no controlada de plaguicidas para mejorar los rendimientos de los cultivos, por lo que es posible encontrar altas concentraciones de pesticida en diversas fuentes de agua y es por ello que se seleccionó la cantidad inicial utilizada⁶.

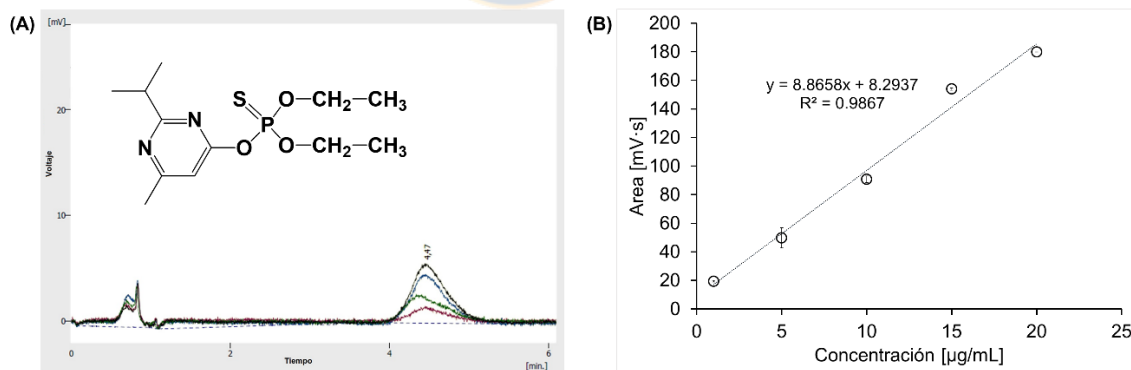


Fig. 4.5. Análisis de diazinon por HPLC-DAD: (A) cromatogramas del estándar y (B) curva de calibración (Fuente: Elaboración propia).

Lo primero que se observó al poner en contacto las microesferas con el pesticida fue que la concentración inicial medida por HPLC-DAD fue mucho menor a la adicionada inicialmente (~30 % de la concentración adicionada), lo cual indica que el biocatalizador

polimérico genera en primer lugar la adsorción del pesticida, probablemente debido a interacciones de tipo Van der Waals y enlaces de hidrógeno entre el diazinon y el soporte, tal como se ha reportado previamente con otros polímeros utilizados en la adsorción de plaguicidas¹³¹, dando como resultado la disminución de la cantidad neta medida por el HPLC-DAD. Por esta razón, para todas las muestras, la medida inicial se tomó después de 5 min de contacto, con el fin de evitar confundir la adsorción con la degradación de diazinon. Sin embargo, también se realizaron medidas del blanco en la que el diazinon se puso en contacto con microesferas sin enzimas inmovilizadas, y se observó que después de las 48 h de reacción se presentó una adsorción de alrededor del 20 %. Estos resultados indican que inicialmente las microesferas de PGMA se pueden utilizar para la adsorción de diazinon en las condiciones de trabajo estudiadas.

Para los estudios de degradación, se realizaron medidas durante 48 h mediante experimentos en lote a dos valores de pH (2.0 y 3.0) y manteniendo la temperatura constante a 25 °C. En los experimentos de degradación en los que únicamente interactuó la enzima inmovilizada con el diazinon, a las 48 h de reacción se observaron degradaciones del 88 % y 100 % a pH 3.0 (Lac-pH 3) y 2.0 (Lac-pH 2), respectivamente. Por su parte, cuando se utilizó el mediador ABTS (1.0 mmol/L), los porcentajes de degradación al finalizar las 48 h fueron de 100 % para ambos valores de pH (Lac-ABTS-pH 2 para pH 2.0 y Lac-ABTS-pH 3 para pH 3.0). El efecto del mediador sobre la velocidad de degradación se debe a que el ABTS actúa como transportador de electrones entre la enzima y el sustrato, lo que aumenta la velocidad de reacción. Estos resultados indican que el uso de un mediador en procesos de biodegradación acelera el proceso de degradación, pero no es indispensable para que éste ocurra.

De acuerdo a la Fig. 4.6, las degradaciones realizadas a pH 2.0 fueron más efectivas que las realizadas a pH 3.0 (ambas en ausencia de mediador), lo que podría deberse a una mayor actividad por gramo de soporte de la enzima AbL, como se evidenció en la Tabla 4.1. Sin embargo, en múltiples estudios se ha reportado que los procesos de degradación de diazinon se favorecen al disminuir el pH de la solución, lo que estaría de acuerdo con lo observado en este estudio^{6,132}.

Otro aspecto importante que se muestra en la Fig. 4.6 es el decremento de la velocidad de reacción después de las 12 h. Este efecto se puede atribuir posiblemente al aumento de la

concentración de los productos de la degradación, el cual estaría causando inhibición en el proceso de degradación. Otra posible explicación, es la disminución en el gradiente de la concentración de diazinon en el medio, lo que hace más lento el proceso de degradación conforme avanza la reacción⁸⁵.

Hasta el momento, se han reportado diferentes métodos de degradación del pesticida diazinon entre los que se encuentran procesos de oxidación electroquímica, fotocátalisis, tratamientos de ultrasonido, foto-Fenton y oxidación con persulfato activado^{23,34,133}. Sin embargo, la biodegradación utilizando enzimas inmovilizadas es una alternativa más amigable ambientalmente, eficiente y rápida para la eliminación de este tipo de compuestos.

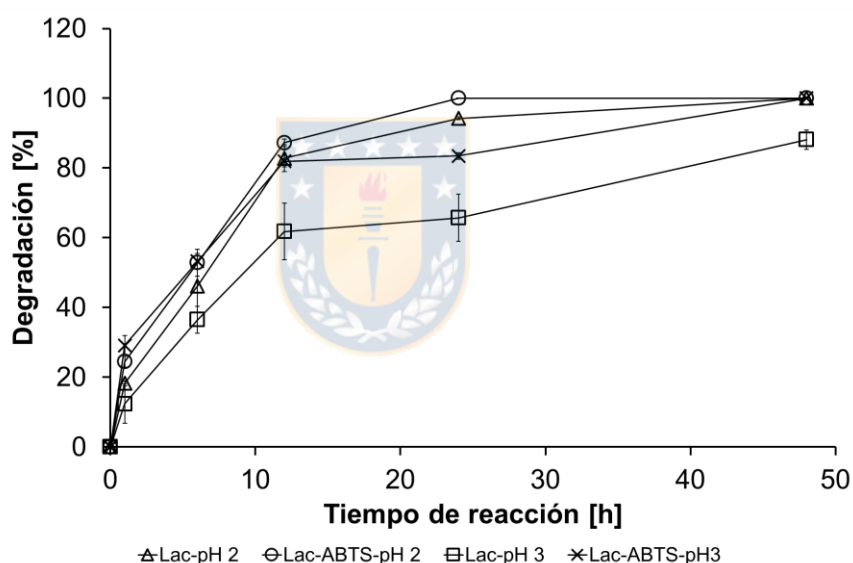


Fig. 4.6. Degradación de diazinon usando el sistema de enzimas co-inmovilizadas con TvL y AbL. Todos los experimentos se realizaron por duplicado y son reportados con la correspondiente desviación estándar (Fuente: Elaboración propia).

4.4 Conclusiones

En este capítulo, se demostró que las enzimas de TvL y AbL se co-inmovilizaron covalentemente sobre microesferas de PGMA para formar un nuevo sistema de enzimas co-inmovilizadas denominado biocatalizador polimérico, el cual tenía una actividad de

$6.75 \pm 0.57 \text{ U g}^{-1}$ de soporte, y presentaba propiedades combinadas de las que tenían ambas enzimas separadamente. Adicionalmente, se observó que después de la co-inmovilización, los rangos de pH y temperatura de trabajo se expandieron, la estabilidad de almacenamiento a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ mejoró y el sistema presentó buenas propiedades de reusabilidad. Una vez caracterizado el sistema, se estudió la degradación del pesticida diazinon por parte del biocatalizador polimérico obtenido. El estudio se realizó a los dos valores de pH de máxima actividad y adicionando el mediador ABTS (1.0 mmol/L), como resultado se logró una degradación total del pesticida en ambos valores de pH después de 48 h de reacción. Los resultados obtenidos evidencian la importancia de la co-inmovilización enzimática en la construcción de un biocatalizador polimérico capaz de degradar diazinon en la región ácida, siendo un aporte de suma importancia para los procesos que requieren degradaciones a valores bajos de pH.



5. Co-inmovilización de tres enzimas lacasa y su aplicación en la degradación de azinfos-metil

5.1 Introducción

Hasta el momento, se ha mostrado el trabajo realizado en la síntesis del soporte idóneo (microesferas de PGMA) para la inmovilización de la enzima TvL. Posteriormente se desarrolló el primer biocatalizador polimérico compuesto por dos enzimas lacasa co-inmovilizadas covalentemente. Este biocatalizador, capaz de trabajar en el rango ácido, se probó en la degradación del pesticida diazinon, la cual se realizó a los dos valores de pH de máxima eficiencia (2.0 y 3.0), obteniéndose la completa degradación a ambos valores.

De acuerdo a los resultados obtenidos hasta el momento, es evidente que la co-inmovilización de enzimas con propiedades diferentes genera un nuevo sistema con propiedades combinadas que permite trabajar a amplios rangos, sin perder eficiencia. En esta misma línea de ideas, si se trabajase con enzimas lacasa que tengan máxima eficiencia a diferentes valores de pH que abarquen un mayor rango de trabajo, se podría construir un nuevo biocatalizador que permita la degradación de compuestos recalcitrantes, en este caso plaguicidas, en un amplio rango de pH, acercándose más a las diversas condiciones que se pueden encontrar en los efluentes con aguas contaminadas.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue co-inmovilizar tres tipos de enzimas lacasa capaces de trabajar a diferentes rangos de pH cuando estén inmovilizadas, de modo tal que mediante la co-inmovilización sea posible combinar sus propiedades y obtener un biocatalizador que permita degradar plaguicidas a diferentes condiciones. Para ello, lo primero que se realizó fue establecer las condiciones de inmovilización que generaran mayor actividad en la enzima inmovilizada, ya que estas enzimas trabajan a valores de pH mayores. Una vez establecidas estas condiciones, se realizó la co-inmovilización de las enzimas lacasa mezclando simultáneamente las enzimas lacasas de *Myceliophthora thermophila* (MtL), *Aspergillus sp* (ApL) y TvL, siguiendo el mismo protocolo planteado en el Capítulo 4. Posteriormente, se llevó a cabo la caracterización del biocatalizador polimérico y se evaluó en la degradación del pesticida azinfos-metil.

5.2 Metodología

5.2.1 Purificación de la enzima MtL y determinación del peso molecular de todas las enzimas de trabajo

La purificación de la enzima MtL se llevó a cabo mediante cuatro pasos consecutivos de ultrafiltración (adicionando agua destilada en cada paso, hasta que el permeado perdiera el color). Esta filtración se realizó utilizando membranas de viva spin de 30 kDa HY y 100 kDa PES. Todas las centrifugaciones se llevaron a cabo a 4 °C y se determinó la actividad y la cantidad de proteína antes y después de la purificación, de acuerdo a los protocolos descritos en las Secciones 4.2.2 y 5.2.3, respectivamente. La pureza y el peso molecular tanto de la enzima MtL como de ApL y TvL se verificaron mediante electroforesis utilizando un gel de poliacrilamida dodecil sulfonato de sodio (SDS-PAGE) y usando un marcador de proteína en el rango de 10 – 170 kDa.

5.2.2 Optimización de la inmovilización de la enzima MtL

Debido a que la enzima MtL tiene un pH óptimo más cercano a la neutralidad, esta se utilizó para optimizar la inmovilización con el fin de obtener la máxima actividad posible en la enzima inmovilizada. El proceso de inmovilización se realizó mediante metodología de superficie de respuesta (MSR) y el diseño estadístico de Box-Behnken (DBB), basado en los excelentes resultados obtenidos aplicando este modelo en el Capítulo 3. Las variables independientes estudiadas fueron el pH (A), la molaridad de la solución (B) y la concentración de la enzima (C), las cuales se estudiaron a tres niveles diferentes seleccionados como bajo, medio y alto y numerados como -1, 0 y 1, respectivamente. La variable independiente seleccionada fue la actividad de la enzima inmovilizada, debido a que esta es uno de los parámetros más importantes en la enzima inmovilizada. La respuesta se expresó en términos de actividad relativa (%), la cual se definió como la relación de la actividad enzimática en cada experimento y la máxima actividad obtenida en todos los experimentos. El valor de 100 % correspondió a 511.0 U/g de proteína inmovilizada. Para estas inmovilizaciones el tiempo de reacción se fijó a 24 h de acuerdo a los excelentes resultados obtenidos antes para la inmovilización de esta enzima, los cuales reportaron que es el tiempo necesario para que la proteína reaccione con los grupos

epoxi en el soporte¹¹⁰. Adicionalmente, con el fin de reducir la agregación entre moléculas o bloqueo del sitio activo debido a la inmovilización, se fijó la concentración máxima de la enzima a 1.0 mg/mL, la cual corresponde al 10 % de la cantidad de soporte utilizado. Para este estudio se realizó un total de 15 experimentos, incluyendo 3 puntos centrales y los datos se analizaron utilizando el software estadístico MODDE 7.0. Las variables y sus valores experimentales se muestran a continuación en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Variables y niveles establecidos en el DBB para la inmovilización de la enzima MtL (Fuente: Elaboración propia).

Variables independientes		Niveles		
		-1	0	+1
A	pH	3.0	5.50	8.0
B	Molaridad del buffer (mol/L)	0.050	0.525	1.0
C	Concentración de enzima (%)	1.0	5.50	10.0

Variable Independiente	Condición
Actividad relativa (%)	Maximizar

La ecuación cuadrática polinomial de segundo orden que relaciona las variables independientes A, B y C (pH, molaridad del buffer y concentración de la enzima, respectivamente) con la actividad de la enzima inmovilizada (α_i) en términos de factores codificados se expresó mediante la siguiente ecuación:

$$\alpha_i = 24.0486 + 18.9513A - 125.154B + 0.232124C - 1.72347A^2 + 3.05684AB - 0.088AC + 48.1921B^2 + 1.97661BC + 0.326337C^2 \quad [\text{Ec. 5.1}]$$

Todos los experimentos de optimización se llevaron a cabo usando 10.0 mg de microesferas suspendidas en 1.0 mL de solución de enzima y buffer fosfato (a la respectiva concentración y molaridad). Las reacciones se realizaron usando un agitador rotatorio VWR a 21 °C durante 24 h. Después de la inmovilización, las muestras se lavaron 3 veces con el respectivo buffer fosfato, centrifugando después de cada lavado, con el fin de remover la enzima sin inmovilizar. Adicionalmente, se determinó la concentración de proteína y la actividad enzimática antes y después de la inmovilización, siguiendo los protocolos descritos en las Secciones 3.2.3 y 4.2.2, respectivamente.

Finalmente, con el propósito de validar el modelo, los experimentos se realizaron por triplicado a las condiciones óptimas.

Tras haber establecido las condiciones óptimas de inmovilización que presentan mayor actividad en la enzima MtL inmovilizada, se co-inmovilizaron las tres enzimas (TvL, MtL y ApL) a las condiciones propuestas en esta sección y los resultados se compararon con la actividad obtenida inmovilizando estas mismas enzimas a las condiciones propuestas en el Capítulo 3, con el fin de establecer condiciones generales de inmovilización para las tres enzimas de trabajo.

5.2.3 Inmovilización y co-inmovilización de las enzimas TvL, MtL y ApL

Una vez se establecieron las condiciones óptimas de inmovilización en las cuales se obtiene mayor actividad en la enzima inmovilizada, se realizaron inmovilizaciones individuales y co-inmovilización de las enzimas, tal como se detalla a continuación.

– Inmovilización individual de las enzimas

El primer estudio realizado en la inmovilización individual de las enzimas fue la determinación de la cantidad óptima de proteína, en la cual toda la proteína puesta en la reacción se inmoviliza sobre el soporte. Para ello, se determinó la cantidad de proteína presente antes y después de la inmovilización a las condiciones establecidas en la Sección 5.2.3.

Una vez determinada esta cantidad, la inmovilización se llevó a cabo mezclando separadamente 10.0 mg de microesferas de PGMA con 1.0 mL de solución 0.070 mg/mL de proteína de cada enzima (TvL, MtL, y ApL). El proceso de inmovilización se llevó a cabo agitando la mezcla de reacción con un agitador rotatorio Thermo Scientific Heraeus Heidolph durante 24 h a 21 °C y pH 5.30. Después de la inmovilización, todos los sistemas se lavaron tres veces mediante pasos sucesivos de centrifugación y adición de buffer fosfato a pH 5.30 con el fin de eliminar la enzima no-enlazada. Finalmente, se midió la cantidad de proteína y la actividad de las enzimas inmovilizadas, siguiendo los protocolos descritos en las Secciones 3.2.3 y 4.2.2, respectivamente. Todas las inmovilizaciones se realizaron por triplicado y posteriormente, las enzimas se caracterizaron y compararon con las enzimas libres y co-inmovilizadas.

– *Co-inmovilización de las enzimas TvL, MtL y ApL*

La co-inmovilización de las enzimas se realizó mediante dos estrategias diferentes: (1) co-inmovilización de la misma cantidad de proteína de cada enzima y (2) co-inmovilización de diferentes cantidades de proteína de acuerdo a la actividad de cada enzima inmovilizada individualmente (ver Tabla 5.2). En ambos casos la co-inmovilización se realizó por triplicado utilizando 10.0 mg de microesferas de PGMA en 1.0 mL de solución y mezclando simultáneamente todas las enzimas en las cantidades señaladas en la Tabla 5.2. Las condiciones de inmovilización se obtuvieron de la optimización realizada en la Sección 5.2.3. Finalmente, los sistemas de enzimas co-inmovilizadas se caracterizaron (con el fin de seleccionar la mejor estrategia de co-inmovilización) y se compararon con las enzimas libre y las inmovilizadas de forma individual.

Tabla 5.2. Actividad de las enzimas inmovilizadas individualmente y cantidad de proteína usada en las estrategias de co-inmovilización (Fuente: Elaboración propia).

Tipo de lacasa	Actividad de las enzimas inmovilizadas individualmente [U/g soporte]	Cantidad de proteína usada en la estrategia 1 [mg proteína/g soporte]	Cantidad de proteína usada en la estrategia 2 [mg proteína/g soporte]
TvL	1.15 ± 0.05	2.3	5.25
MtL	1.91 ± 0.08	2.3	1.05
ApL	4.63 ± 0.16	2.3	0.70

5.2.4 Caracterización enzimática

Tanto las enzimas libres, las inmovilizadas individualmente como las co-inmovilizadas se caracterizaron con el fin de evaluar la influencia de la inmovilización y co-inmovilización sobre la actividad a diferentes valores de pH y temperatura, además de evaluar el efecto sobre su estabilidad de almacenamiento y reusabilidad. Adicionalmente, se hicieron comparaciones con SEM y DRX para ver si existían diferencias morfológicas y de composición elemental ligadas a la inmovilización enzimática.

El estudio del pH se realizó en el rango de 2.0 – 8.0 utilizando soluciones de buffer citrato (0.1 mol/L)/fosfato (0.2 mol/L) (para el rango de 2.0 – 6.0) y buffer fosfato de potasio

(para el rango de pH de 7.0 – 8.0). Los resultados se expresaron en términos de actividad relativa, siguiendo un protocolo similar al descrito previamente en la Sección 3.2.6.

La estabilidad térmica se evaluó en el rango de temperatura de 20 – 65 °C. Las medidas se realizaron utilizando buffer precalentado al pH óptimo de cada enzima (libre e inmovilizada). En el caso del sistema de enzimas co-inmovilizadas, la estabilidad térmica se evaluó a los tres pH de máxima actividad del sistema (3.0, 4.0 y 6.0). Las medidas se realizaron siguiendo el protocolo descrito en la Sección 3.2.7.

La reusabilidad del biocatalizador polimérico se evaluó mediante 6 ciclos de reuso y la estabilidad de almacenamiento se evaluó durante 25 días de almacenamiento a dos temperaturas (25 y 4 °C), siguiendo el protocolo previamente descrito en la Sección 3.2.9. Finalmente, se evaluaron las propiedades cinéticas de las enzimas libres y las inmovilizadas individualmente, determinándose parámetros como K_M , V_{max} , K_{cat} y K_{cat}/K_M , siguiendo el protocolo descrito en la Sección 3.2.8. Sin embargo, el rango de concentraciones de ABTS estudiadas en esta sección fue de 1.0 – 20.0 mmol/L y los cálculos se realizaron con el programa Sigma Plot 12.0, a partir de la ecuación de Michaelis-Menten.

Todas las medidas de esta sección se realizaron por triplicado y los resultados se analizaron estadísticamente con el fin de evaluar diferencias significativas entre las medias de cada medida. Los análisis se realizaron siguiendo el procedimiento descrito previamente en la Sección 4.2.3. Adicionalmente, para comparar medias entre pares de datos, se realizó la prueba T para muestras independientes con un intervalo de confianza del 95 %.

5.2.5 Degradación de azinfos-metil

La degradación del pesticida azinfos-metil, AZPM, se llevó a cabo en primer lugar utilizando únicamente la enzima MtL libre e inmovilizada, con el fin de establecer las condiciones de degradación, las cantidades de enzima necesarias para este proceso y las diferencias entre el uso de enzimas libres e inmovilizadas. Posteriormente, empleando el mismo montaje pero con el biocatalizador polimérico constituido por las 3 enzimas co-inmovilizadas, se llevó a cabo la degradación de AZPM a los tres valores de pH de máxima eficiencia.

Para el estudio de degradación utilizando únicamente MtL, los experimentos se llevaron a cabo utilizando tubos Eppendorf que contenían 1 mL de dispersión constituido por 3.5 U de enzima libre e inmovilizada (correspondiente a 35 U/g de soporte) en soluciones buffer (0.1 mol/L citrato/0.2 mol/L fosfato) a pH 4.0 y pH 7.0 para las lacasas inmovilizadas y libres, respectivamente. La cantidad de AZPM inicial se estableció en 3.5 mg/mL (para MtL inmovilizada) y 0.030 mg/mL (para MtL libre), basándose en la cantidad de AZPM adsorbido por las microesferas (los análisis de hicieron con 100 mg de microesferas con y sin enzimas inmovilizadas). Todas las degradaciones se realizaron a 25 °C agitando en la oscuridad, y el seguimiento se hizo analizando cromatográficamente muestras a diferentes intervalos de tiempo; 0, 1, 6, 12 y 24 h.

Una vez realizado este estudio, se llevó a cabo la degradación con el sistema de enzimas co-inmovilizadas. En este caso las reacciones también se llevaron a cabo en tubos Eppendorf a tres valores de pH diferentes (3.0, 4.0 y 6.0), utilizando soluciones buffer 0.1 mol/L citrato/0.2 mol/L fosfato. Para este sistema, la cantidad inicial de AZPM establecida fue de 0.2 mg/mL y se utilizaron 50 mg de microesferas con y sin enzimas inmovilizadas para los análisis. Todas las degradaciones se realizaron a 25 °C en la oscuridad, el seguimiento de estas se hizo tomando y analizando cromatográficamente muestras a 0, 1, 2, 4, 5 y 8 días.

En los experimentos de degradación de AZPM llevados a cabo adicionando mediador se utilizó ABTS 1.0 mM. Todos los experimentos se hicieron por duplicado y se usaron controles utilizando microesferas sin enzimas inmovilizadas, los cuales se llamaron “blancos”. Adicionalmente, se realizaron experimentos de control en los que sólo se adicionaron las enzimas inmovilizadas y el mediador ABTS, con el fin de verificar la aparición de señales correspondientes al ABTS oxidado.

5.2.6 Análisis de la degradación de AZPM

Para analizar la degradación de AZPM, las enzimas se precipitaron de acuerdo al método de Carrez, el cual se detalló previamente en la Sección 4.2.5. Después de ello, las muestras se filtraron a través de filtros de jeringas de 0.2 µm que poseían una membrana de PTFE (Millipore Simplicity-Syringe Filters). La concentración de AZPM en cada muestra se determinó mediante cromatografía líquida utilizando un equipo YL9100 HPLC System.

Para la separación se utilizó una columna de fase reversa C-18 (5 μm , 150 x 4.6 mm), la cual se mantuvo a una temperatura de 35 °C. Las medidas se realizaron en condiciones isocráticas usando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo: agua (60:40) a un flujo de 1 mL/min, en el análisis se utilizó un volumen de muestra de 20 μL . La detección del analito se realizó con un detector de arreglo de diodos (YL9160 PDA Detector) a una longitud de onda de 224 nm. Finalmente, el grado de adsorción y de degradación de AZPM se determinó utilizando las ecuaciones 4.1 y 4.2, pero en este caso, aplicadas al AZPM.

5.3 Resultados y discusión

Para la construcción del biocatalizador polimérico desarrollado en este capítulo, se realizó una preselección de varias enzimas lacasa en las que se evaluó el pH óptimo de actividad, el peso molecular y el costo de las mismas. Como resultado, se seleccionaron las enzimas MtL, ApL y TvL para su inmovilización y posterior co-inmovilización e incorporación en el biocatalizador polimérico. El trabajo realizado con estas tres enzimas se muestra a continuación.

5.3.1 Purificación de MtL y determinación del peso molecular de las enzimas de trabajo

Antes de realizar la optimización de la inmovilización, la enzima MtL (que era la única que no se encontraba totalmente pura) se purificó mediante pasos sucesivos de ultrafiltración, las enzimas TvL y ApL fueron adquiridas en Sigma-Aldrich, Chile. Como resultado de este proceso se obtuvo una solución de color azul clara y altamente activa, como se observa en la Fig. 5.1-A (A-1 antes y A-2 después de la purificación). Lo que demuestra que la ultrafiltración removió compuestos de bajo peso molecular (agentes estabilizantes) y compuestos no proteínicos que generaban color, ya que en ambos casos (antes y después de la purificación) se observó únicamente una banda en ~ 100 kDa (Fig. 5.1-B)^{47,134}. La actividad de la enzima purificada fue de 64 U/mg y no se encontró actividad en el permeado. La fracción de enzimas en el retenido se almacenó a 4 °C y se utilizó en los procesos de inmovilización.

Adicionalmente, el peso molecular de las otras dos enzimas de trabajo se verificó con el fin de asegurar que la co-inmovilización ocurriera con enzimas que tuviesen un peso molecular más o menos similar y que TvL y ApL presentaran una única banda en el peso molecular. Como se observa en la Fig. 5.1-C, los pesos moleculares de las tres enzimas son bastantes similares y están en el intervalo de 75 – 110 kDa, siendo ideales para la co-inmovilización.

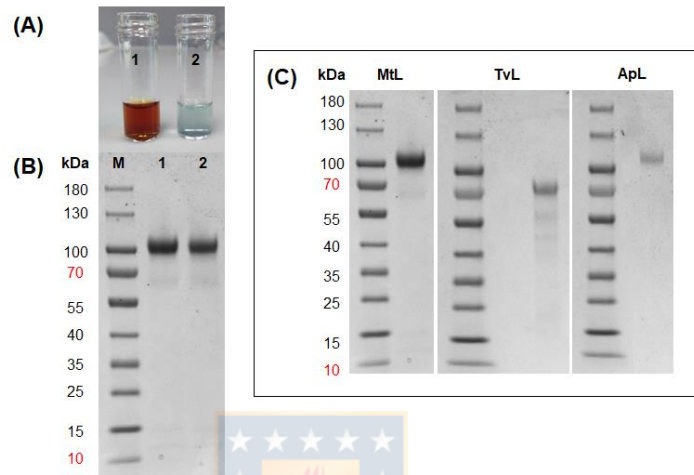


Fig. 5.1. Muestras de (A) MtlL y (B) SDS-PAGE de MtlL antes y después de la purificación y (C) SDS-PAGE de MtlL, TvL y ApL (Adaptado de M. Vera, *et al.*⁴⁷).

5.3.2 Inmovilización enzimática

Con el fin de optimizar la actividad de la enzima inmovilizada, se realizaron 15 experimentos teniendo en cuenta los valores sugeridos por el DBB y MSR. Estos estudios mostraron que los parámetros que más afectan la respuesta (actividad de la enzima inmovilizada) son la molaridad del buffer y la concentración de la enzima, la cual al realizar la inmovilización con los valores optimizados arrojó un valor de actividad máxima en la enzima inmovilizada de 35.0 U/g de soporte.

Parámetros como el porcentaje de inmovilización y la actividad de recuperación son los más usados como respuesta en los diseños de experimento asociados a los estudios de inmovilización enzimática^{135,136}. Sin embargo, estos valores por lo regular sólo aumentan con la disminución de la concentración enzimática y no se relacionan con la actividad de la enzima inmovilizada, que es probablemente el parámetro más importante en la inmovilización enzimática¹³⁷. Por ello, en este trabajo se estableció como parámetro de

respuesta la actividad de la enzima inmovilizada y la optimización se enfocó en maximizar su valor.

Los resultados obtenidos, así como las condiciones experimentales de cada parámetro se muestran en la Información Suplementaria (Tabla S5.1). Para este estudio, el modelo cuadrático polinomial dado en la Ec. 5.1 se usó para explicar la relación entre la variable independiente y las dependientes. El análisis de varianza (ANOVA) se usó para analizar la significancia del modelo, el efecto de las variables y de sus interacciones (ver Tabla S5.2 en Información Suplementaria). El valor de probabilidad (valor- p) y el valor- F obtenidos en este estudio confirmaron la significancia del modelo, debido a que el valor- p fue menor a 0.05 (valor- p de 0.0003) y el valor- F fue de 15.02. El coeficiente de determinación (R^2) calculado por el modelo fue 0.94, lo que significa que el modelo es capaz de explicar el 94 % de la variabilidad de la respuesta. Es por ello, que los resultados obtenidos indican que el modelo es ideal para predecir los datos obtenidos.

De acuerdo a los datos mostrados en la Tabla S5.2, los términos C (concentración de enzima) y B (molaridad del buffer) son los que más afectan la actividad de la enzima inmovilizada. El bajo valor- p de B, indica que probablemente este valor puede ser el que más influye en la respuesta. Esta influencia de la fuerza iónica en el proceso de inmovilización está de acuerdo con trabajos publicados previamente, en los cuales se reporta que la reacción de las aminos externas de la enzima se favorece en soluciones buffer con baja fuerza iónica, favoreciéndose de este modo la inmovilización enzimática y mejorando la actividad de la enzima inmovilizada, así como su reusabilidad^{74,138,139}.

Una representación gráfica del modelo de regresión que muestra la influencia de las variables sobre la respuesta obtenida se resume en la Fig. 5.2. Esta gráfica describe el efecto de dos variables independientes sobre la respuesta, manteniendo la tercera variable constante.

La Fig. 5.2-A muestra la influencia del pH y la molaridad del buffer sobre la actividad de la enzima inmovilizada, manteniendo la concentración de enzima constante (1.0 mg/mL, 10 %). En esta figura es evidente el incremento en la actividad de la enzima inmovilizada a bajos valores de molaridad del buffer y a valores de pH en el rango de 5.0 – 6.0.

La Fig. 5.2-B muestra la influencia combinada del pH y la concentración de enzima sobre la actividad de la enzima inmovilizada a un valor de molaridad fija (0.05 mol/L). En este

caso, se observa que el incremento en la concentración de enzima es lo que genera el mayor aumento en la actividad relativa, siendo mayor en el rango de pH de 5.0 – 6.0. Por su parte, la Fig. 5.2-C revela la influencia en la respuesta de la interacción entre la concentración de enzima y la molaridad del buffer, mientras el pH se mantiene constante (5.5). La gráfica de superficie de respuesta claramente muestra que a mayor concentración de enzima y menor molaridad del buffer se obtiene la mayor actividad de la enzima inmovilizada.

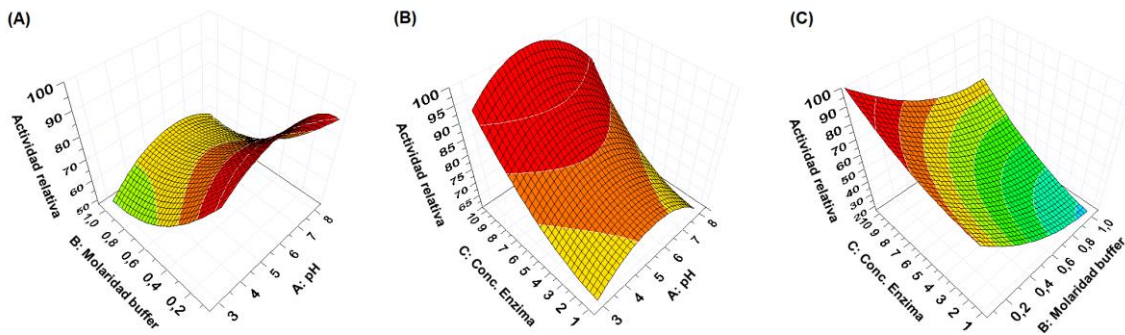


Fig. 5.2. Gráficas de contorno de superficie respuesta para (A) molaridad de buffer y pH manteniendo la concentración de enzima constante (1.0 mg/mL, 10 %), (B) concentración de enzima y pH a molaridad de buffer constante (0.05 mol/L), y (C) concentración de enzima y molaridad de buffer a pH constante (5.5) (Adaptado de M. Vera, *et al.*⁴⁷).

Basado en los resultados obtenidos, se llevó a cabo la optimización con el fin de maximizar la actividad en la enzima inmovilizada. Los valores de los factores predichos por el modelo fueron 5.3, 0.05 mol/L y 1.0 mg/mL para el pH, la molaridad del buffer y la concentración de la enzima óptima, respectivamente. Al realizar la inmovilización bajo estas condiciones se obtuvo una actividad específica de 0.537 U/mg (101.95 %) en la enzima inmovilizada, lo cual fue muy cercano a lo predicho por el modelo (102.3 %). Estos valores de actividad relativa son mayores que 100 % únicamente porque el valor de referencia fue el mayor valor obtenido durante los experimentos del diseño. Con las condiciones optimizadas se logró obtener una cantidad de enzima inmovilizada de 2.5 mg proteína/g soporte, lo que correspondió a 35.0 U/g soporte.

Una vez realizada esta optimización, se realizaron inmovilizaciones individuales a las condiciones dadas por este método y a las dadas por el protocolo propuesto en el Capítulo

3, realizando en ambos casos la inmovilización de 0.070 mg de proteína para todas las enzimas (con el fin de asegurar que toda la enzima adicionada se inmovilizara). Como resultado se observó que en los valores de máxima actividad de las enzimas inmovilizadas, hubo una mayor actividad cuando la inmovilización se realizó en las condiciones establecidas en este capítulo, siendo la diferencia de un 30.6, 10.6 y 7.6 % para TvL, MtL y ApL, respectivamente. Por ello, todos los procesos de inmovilización dados aquí se realizaron usando las condiciones obtenidas por la optimización realizada en esta sesión y únicamente se varió la cantidad de proteína que reaccionó con el fin de lograr la completa inmovilización enzimática, de acuerdo a los valores reportados en la Tabla 5.2.

Una vez realizadas las inmovilizaciones, se hicieron nuevamente medidas de SEM y se compararon con las micrografías obtenidas antes de la inmovilización, tal como se muestra en la Fig. 5.3. Observándose, al igual que en el capítulo anterior, una delgada capa rugosa en la superficie de la enzima, la cual se atribuye a la presencia de las enzimas TvL, MtL y ApL inmovilizadas^{114,140}. Con el fin de confirmar si las rugosidades en la superficie se debían a presencia de enzima, se realizaron medidas de EDX. La idea inicial fue monitorear la presencia de cobre (el cual se encuentra en el sitio activo de la enzima) sin embargo, debido a que sólo hay 4 átomos de cobre por enzima y se encuentran internos en el sitio activo, el porcentaje de cobre no fue significativo. Sin embargo, durante las medidas se determinó la presencia de un 6.68 % de N en las superficies rugosas (Fig. 5.3), la cual estaba ausente en las microesferas antes de la inmovilización. Esta cantidad de nitrógeno en la superficie de las microesferas confirma la presencia de las enzimas, las cuales poseen nitrógeno proveniente de aminoácidos como lisina y alanina en su estructura¹²².

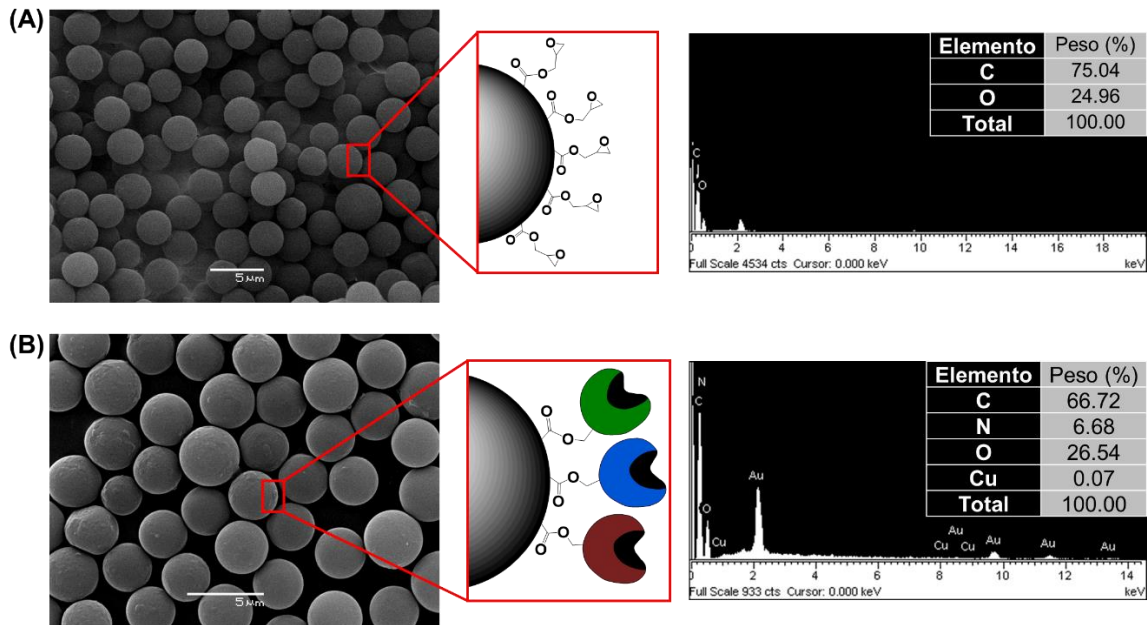


Fig. 5.3. Micrografía SEM representativa de las microsferas de PGMA antes (A) y después de la co-inmovilización (B) de las enzimas TvL, ApL, y MtL (Fuente: Elaboración propia).

5.3.3 Efecto del pH sobre la actividad de las enzimas

Una vez realizadas las inmobilizaciones individuales y la co-inmovilización, se procedió a la caracterización, evaluando como primer parámetro el efecto del pH sobre la actividad de las enzimas libres, inmobilizadas y las co-inmovilizadas mediante las dos estrategias planteadas, tal como se muestra en la Fig. 5.4. Para las enzimas libres de TvL, ApL y MtL (Fig. 5.4-A) se observa que a pH 3.0, 6.0 y 7.0 se obtienen los máximos valores de actividad, respectivamente. Al realizarse las inmobilizaciones individuales (Fig. 5.4-B), se observa que la actividad óptima de TvL y ApL se mantiene en pH 3.0 y 6.0, respectivamente. Sin embargo, el pH óptimo de MtL se desplazó después de la inmobilización, teniendo un nuevo valor óptimo de pH 4.0. Cabe resaltar que en todos los casos, al igual que lo observado en las Secciones 3.3.3 y 4.3.2, la pérdida de la actividad en los valores de pH diferentes al óptimo fue menor que la pérdida mostrada para las enzimas libres.

Para la co-inmovilización (Fig. 5.4-C) realizada utilizando la estrategia de co-inmovilización 1 (TvL-MtL-ApL-PGMA-1) que consistió en adicionar partes iguales de

proteína en el proceso de co-inmovilización, se observó que el sistema presenta dos máximos de actividad, el primero a pH alrededor de 4.0 y el segundo a 7.0. Si bien, para este sistema se está expandiendo el rango de trabajo de pH, aparentemente la contribución de TvL a la actividad total del biocatalizador polimérico es muy baja. Por su parte, cuando se utilizó la estrategia de inmovilización 2 (TvL-MtL-ApL-PGMA-2) en la cual la adición de proteína se hizo basándose en la actividad específica de cada enzima inmovilizada individualmente, se observó que el nuevo sistema poseía tres máximos de actividad alrededor de pH 3.0, 4.0 y 6.0. Para esta estrategia, los valores máximos de actividad obtenidos para el sistema de enzimas inmovilizadas fueron de 41.90 ± 1.75 U/g de soporte (pH 3.0), 40.89 ± 1.17 U/g de soporte (pH 4.0) y 39.54 ± 1.65 U/g de soporte (pH 6.0). Adicionalmente, en los valores de pH diferentes a los óptimos (y exceptuando a pH 5.0), la reducción en la actividad fue significativamente menor que los presentados para la estrategia de inmovilización 1 ($p < 0.05$ al comparar las medias a pH 2.0, 3.0, 6.0 y 8.0). Es por ello que todos los procesos de co-inmovilización realizados para este capítulo se realizaron usando la estrategia de co-inmovilización 2, utilizando las cantidades de proteína indicadas en la Tabla 5.2.

Si bien, recientes publicaciones han comenzado a reportar la co-inmovilización como una innovadora estrategia en la que se pueden combinar las propiedades de varias enzimas para generar un nuevo sistema con mayores rangos de trabajo óptimo. Hasta ahora, estudios como el realizado por Ammann E. M. *et al*¹²² sólo han considerado la co-inmovilización de cantidades iguales de proteína, lo cual, como se demostró en la estrategia de co-inmovilización 1 aunque amplía el rango de trabajo del sistema, al no considerar la actividad específica que cada enzima aporta al nuevo biocatalizador polimérico, no optimizan su rango de acción, lo que resulta en un sistema incompleto y poco eficiente comparado con el sistema optimizado presentado en este trabajo.

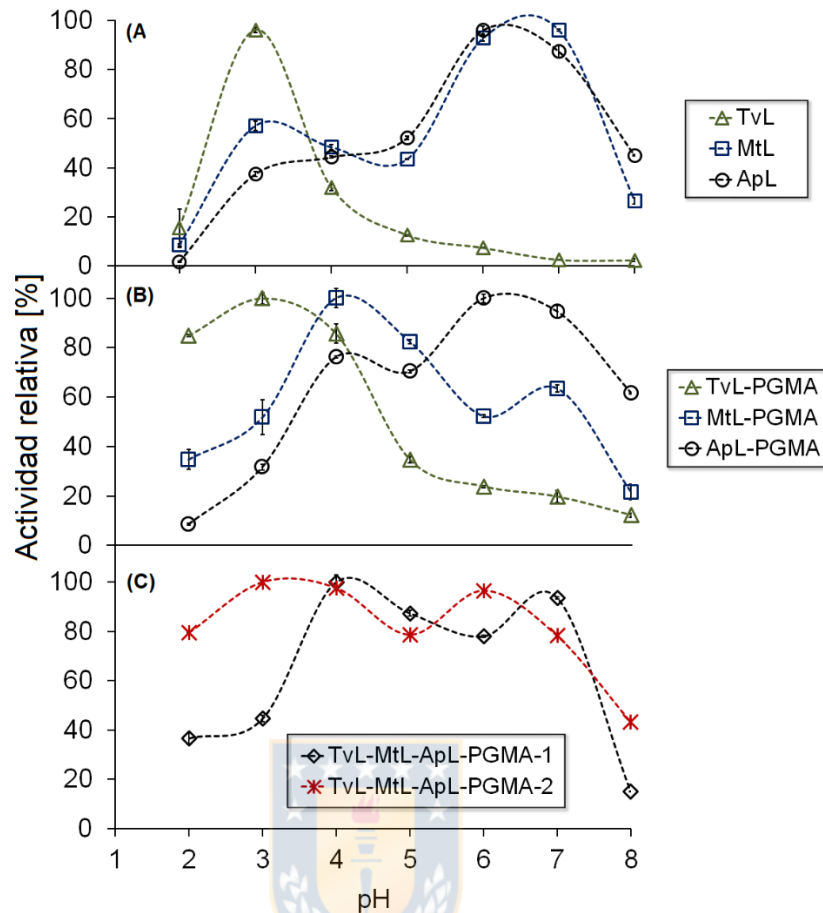


Fig. 5.4. Actividad a diferentes valores de pH para las enzimas TvL, MtL y ApL (A) libres, (B) inmovilizadas individualmente y (C) biocatalizador polimérico. Todas las medidas se realizaron por triplicado y se representan con su correspondiente desviación estándar (Fuente: Elaboración propia).

5.3.4 Estabilidad térmica

Para evaluar el efecto de la inmovilización sobre la estabilidad térmica de las enzimas, se evaluó la actividad en el rango de temperatura de 20 – 65 °C, tal como se muestra en la Fig. 5.5. En la Fig. 5.5-A, B y C se comparan los valores de actividad obtenidos para las enzimas libres y las inmovilizadas individualmente de TvL, MtL y ApL, respectivamente. En este caso, al igual que se observó en los capítulos anteriores, se presenta un incremento de la actividad conforme aumenta la temperatura y en las temperaturas diferentes a 65 °C (valor de máxima actividad en estas tres gráficas) las enzimas inmovilizadas individualmente poseen una mayor actividad que su contraparte libre, lo cual como se

mencionó anteriormente, indica un aumento en la resistencia a la desnaturalización como producto de la inmovilización^{141,142}. En la Fig. 5.5-D se compara la actividad de las enzimas co-inmovilizadas con respecto a las inmovilizadas individualmente y se observa que para el sistema de enzimas co-inmovilizadas es posible alcanzar una mayor actividad a una menor temperatura, lo cual como se mencionó anteriormente, en caso de un proceso industrial, implicaría la reducción de costos en aumentar la temperatura para trabajar a las condiciones óptimas. Adicionalmente, se observa que mediante la co-inmovilización hay una mayor actividad relativa tanto a 20 como a 40 °C (valor-*p* igual a 0.003 y 0.007, respectivamente). Estos resultados demuestran que la mayor estabilidad de la enzima hacia la desnaturalización tras realizarse procesos de inmovilización, siguen siendo eficientes en la co-inmovilización y que además, gracias a que la cantidad de enzima adicionada no superó el 10 % con respecto al soporte, no se presentaron interacciones desfavorables que disminuyeran la estabilidad tras la inmovilización, permitiendo de igual modo generar una unión multipunto entre la enzima y el soporte.

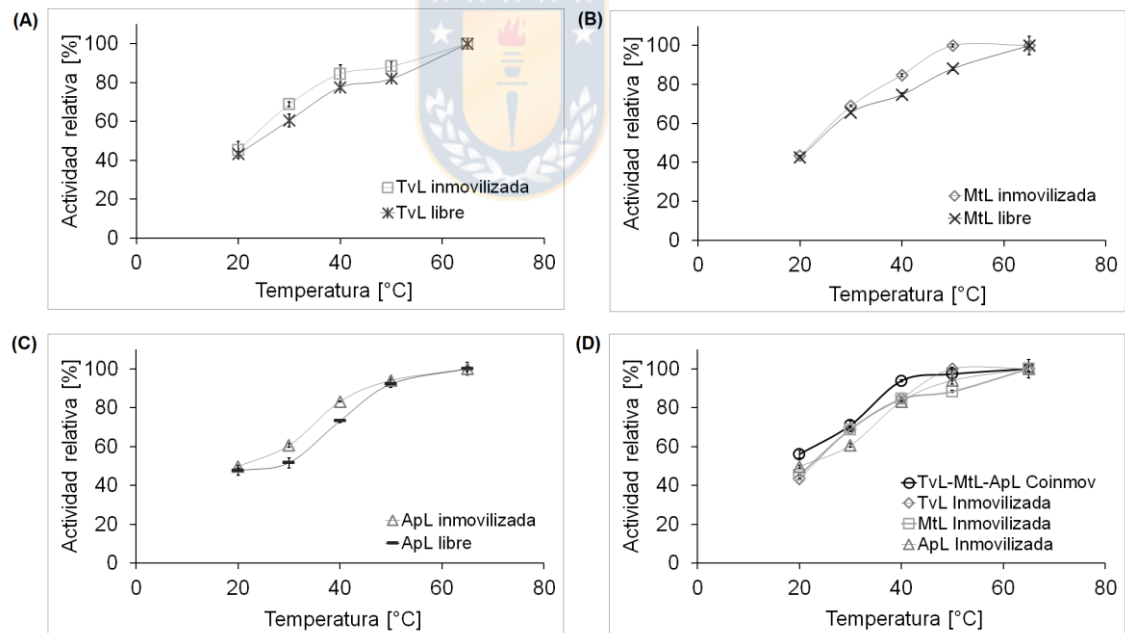


Fig. 5.5. Efecto de la temperatura sobre la actividad de (A) TvL libre e inmovilizada, (B) MtL libre e inmovilizada, (C) ApL libre e inmovilizada, y (D) enzimas co-inmovilizadas y las inmovilizadas individualmente. Todas las medidas se realizaron por triplicado y están reportadas con su correspondiente desviación estándar (Fuente: Elaboración propia).

5.3.5 Reusabilidad y estabilidad de almacenamiento

Como se mencionó anteriormente, la reusabilidad es un aspecto muy importante para procesos industriales, y por ello se evaluó este aspecto en el sistema de enzimas co-inmovilizadas a los tres valores de pH de máxima actividad, tal como se muestra en la Fig. 5.6. En esta figura se observa que después de 6 ciclos se mantiene más del 60 % de la actividad inicial y el comportamiento para los tres valores de pH analizados es similar (en el ciclo 6 no se presentaron diferencias significativas entre las tres medidas, valor- $p = 0.577$), lo que indica que no hay pérdida de la actividad de alguna enzima en particular con respecto a las otras y que en general el sistema podría presentar buena conservación de la actividad en cualquier proceso que implique la reusabilidad del sistema. Este aspecto es uno de los que generan la mayor diferencia entre el uso de enzimas libres o inmovilizadas, ya que si simplemente se mezclaran las enzimas libres, el sistema generado sólo se podría utilizar una vez. En contraste, el sistema de enzimas co-inmovilizadas desarrollado demostró que conserva más del 60 % de la actividad inicial durante 6 ciclos de reacción, siendo éste un valor de actividad superior a muchos de los reportados en la literatura^{123,137,143}.

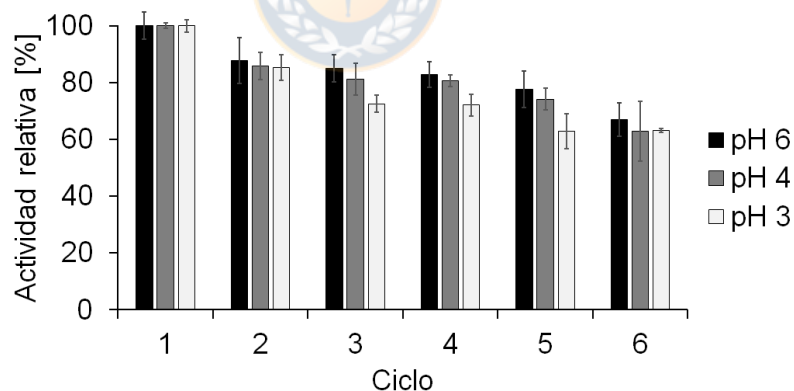


Fig. 5.6. Estudios de reusabilidad del sistema de enzimas co-inmovilizadas sobre microesferas de PGMA a los 3 valores de pH de máxima actividad. Las medidas se realizaron por triplicado y se muestran con su correspondiente desviación estándar (Fuente: Elaboración propia).

Como se discutió en capítulos anteriores, la estabilidad de almacenamiento es otro de los aspectos claves en los procesos de inmovilización enzimática y es lo que genera ventajas

entre el uso del biocatalizador sólido y el uso de las enzimas libres, en este caso, la estabilidad se midió a 25 y 4 °C durante 25 días, con el fin de evaluar la preservación de la actividad a temperatura ambiente (como podría encontrarse durante su aplicación) y a la temperatura a la cual se recomienda su conservación. Los resultados para las enzimas libres, inmovilizadas y co-inmovilizadas se muestran en la Fig. 5.7. En general, al compararse las enzimas libres e inmovilizadas, se observa que al inmovilizarse adquieren mayor estabilidad a ambas temperaturas de almacenamiento. En la Fig. 5.7-A, se observó que después de 25 días de almacenamiento el aumento en la estabilidad fue de 13 % (a 25 °C) y 8 % (a 4 °C) para la enzima de MtL inmovilizada comparada con su contraparte libre. En el caso de TvL, la mejora en la estabilidad de la inmovilizada con respecto a la libre fue de 22 % (a 25 °C) y 16 % (a 4 °C), como se muestra en la Fig. 5.7-B. Por otro lado, para ApL la diferencia entre la estabilidad de la enzima libre y la inmovilizada fue de 14 % (a 25 °C) y 1 % (a 4 °C), como se observa en la Fig. 5.7-C. De acuerdo a los análisis estadísticos, las enzimas MtL, TvL y ApL presentan valores significativamente mayores de estabilidad de almacenamiento a ambas temperaturas. Finalmente, al compararse la estabilidad de las enzimas inmovilizadas con el sistema de enzimas co-inmovilizadas (a 4 °C, ver Fig. 5.7-D), no se observan diferencias marcadas y en la mayoría de los puntos (1, 3, 9, y 25 días) no hay diferencias significativas entre los valores (valores-*p* iguales a 1.00, 0.964, 0.439, 0.101 para 1, 3, 9 y 25 días, respectivamente), lo que indica que, al igual que en el capítulo anterior, tanto la inmovilización como la co-inmovilización generan una mayor estabilidad de almacenamiento de la enzima inmovilizada. Este incremento, tal como se mencionó en los capítulos anteriores, usualmente es atribuido a limitaciones en la libertad de cambios conformacionales debido a la unión multipunto entre la enzima y el soporte, lo que genera mayor estabilidad de la estructura de la enzima, protegiéndola de la desnaturalización^{123,128}. De este modo, la inmovilización enzimática resulta ser una excelente alternativa para conservar una alta actividad enzimática por un tiempo más prolongado⁸⁸.

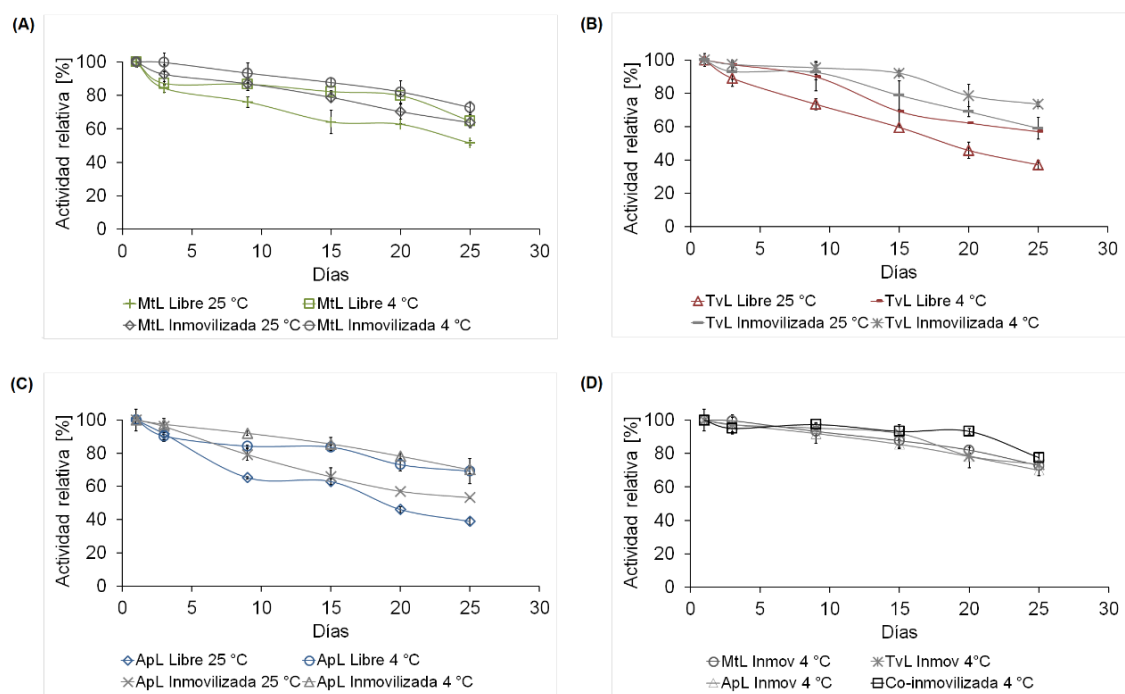


Fig. 5.7. Estudios de estabilidad de almacenamiento a 25 y 4 °C de las enzimas libres e inmovilizadas provenientes de (A) MtL, (B) TvL, (C) ApL. Comparación de las enzimas inmovilizadas y el sistema de enzimas co-inmovilizadas a 4 °C (D). Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se muestran con su respectiva desviación estándar (Fuente: Elaboración propia).

5.3.6 Parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos K_M , V_{max} , K_{cat} y la eficiencia catalítica (K_{cat}/K_M) se determinaron para las enzimas libres y las inmovilizadas individualmente, obteniéndose los valores mostrados en la Tabla 5.3. Para la determinación de estas constantes los experimentos se realizaron a 25 °C y al pH óptimo de cada enzima, de acuerdo a los valores determinados previamente en la Sección 5.3.3. Las gráficas de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk con las cuales se determinaron los parámetros graficados se muestran en las Fig. S5.1-Fig. S5.3.

Como se mencionó en la Sección 3.3.4, el valor de K_M se relaciona con la afinidad de la enzima hacia el sustrato y entre menor es este valor, mayor es la afinidad. En el caso de MtL y TvL, este valor aumentó al inmovilizarseles, indicando que la afinidad de ambas

enzimas hacia el ABTS disminuyó tras la inmovilización. En el caso de ApL, el valor de K_M disminuyó, lo cual podría indicar que aumentó la afinidad de la enzima hacia el sustrato. En el caso de la V_{max} , se observó que para todas las enzimas, el valor de V_{max} decreció tras la inmovilización, lo cual indica una disminución en la velocidad de conversión del sustrato. Para K_{cat} , que como se mencionó anteriormente, indica el número máximo de moléculas de sustrato convertidas en producto por unidad de tiempo por una molécula de enzima, se observa que también disminuye en todos los casos tras la inmovilización. Finalmente, se observó que la eficiencia catalítica (K_{cat}/K_M) también disminuye tras la inmovilización en todos los casos. Como se mencionó anteriormente, este tipo de comportamientos son comunes en los procesos de inmovilización debido a la interacción enzima–soporte^{144,145}.

Tabla 5.3. Parámetros cinéticos de enzimas libres e inmovilizadas individualmente (Fuente: Elaboración propia).

Enzima	K_M (mmol/L)	V_{max} ($\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$)	K_{cat} (1/s)	K_{cat}/K_M (1/(s*mmol))
MtL libre	5.7 ± 0.4	676.4 ± 16.5	1127.33	197.78
MtL Inmovilizada	7.3 ± 1.2	395.1 ± 25.6	658.51	90.21
TvL Libre	2.3 ± 0.4	355.6 ± 15.9	474.11	204.75
TvL Inmovilizada	2.5 ± 0.5	110.2 ± 5.3	146.95	58.15
ApL Libre	8.3 ± 1.0	614.1 ± 31.2	1125.70	134.85
ApL Inmovilizada	5.4 ± 0.8	165.1 ± 9.2	302.64	55.59

5.3.7 Degradación de azinfos-metil

El biocatalizador obtenido tras la co-inmovilización de tres enzimas se evaluó en la degradación del pesticida azinfos-metil (AZPM). La degradación del pesticida AZPM se siguió mediante HPLC-DAD a un tiempo de retención de 3.07 min, tal como se muestra en la Fig. 5.8-A. Para este pesticida, la curva de calibración se realizó en el intervalo de concentraciones de 0.05 – 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ver Fig. 5.8-B) presentando un coeficiente de determinación de 0.9986 y alcanzando un límite de detección de 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

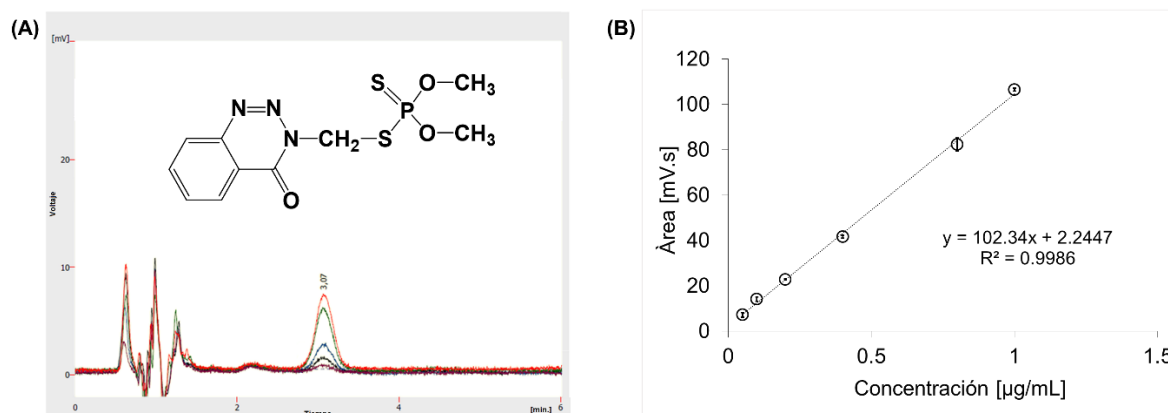


Fig. 5.8. Análisis de AZPM por HPLC-DAD: (A) cromatogramas de los estándares y (B) curva de calibración. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se muestran con su respectiva desviación estándar (Fuente: Elaboración propia).

Los resultados correspondientes a la degradación de AZPM utilizando únicamente MtL se muestran en la Fig. 5.9. Sin embargo, antes de la degradación se hicieron experimentos de adsorción, encontrándose que la cantidad de AZPM adsorbido por las microesferas sin enzimas inmovilizadas fue de 3.47 ± 0.08 mg/mL después de 5 min de contacto. Por lo que las medidas iniciales se realizaron para todos los casos después de este tiempo de reacción, además se monitoreó la adsorción durante las 24 h del experimento, sin encontrarse una adsorción significativa de pesticida en función del tiempo (< 20 %), lo cual puede atribuirse a la ausencia de poros del soporte utilizado.

En cuanto a los experimentos de degradación sin utilizar mediador, se observó que al utilizar 35 U de MtL, en tan solo una hora de reacción se alcanzó una degradación del 84 % de la concentración inicial de AZPM (22.12 ± 0.07 µg/mL) y que el porcentaje de degradación se incrementó hasta el 97 % después de 24 h de reacción. En el caso de las enzimas libres, después de 24 h de reacción la degradación fue alrededor del 55 %. Para los experimentos utilizando mediador, en ambos casos se observó una mejora en la degradación. Para el caso de la enzima inmovilizada, se alcanzó el 100 % de la degradación después de una hora de reacción y para la enzima libre el porcentaje de degradación se incrementó a 65 %.

De estos resultados, es evidente que el uso de enzima inmovilizada es más eficiente para la degradación, además que las degradaciones son favorecidas por el uso del mediador

ABTS, lo cual se puede atribuir a que este compuesto de bajo peso molecular trabaja como intermediario en la oxidación realizada por las lacasa, haciendo más fácil, rápida y completa la degradación de la molécula objetivo¹⁴⁶. Estos resultados, concuerdan con los observados en el capítulo anterior en la degradación de diazinon y con resultados previamente reportados en los que mediante la adición de un mediador se logran degradaciones completas de contaminantes orgánicos mediante el uso de enzimas inmovilizadas^{47,146}. S. Zeng, *et al.*¹²⁴ reportaron la degradación completa del herbicida isoproturon después de 24 h de reacción al utilizarse ABTS a la misma concentración utilizada en este ensayo (1.0 mM). Adicionalmente, las diferencias entre el uso de enzimas libres e inmovilizadas también se ha reportado en la degradación de otro tipo de contaminantes orgánicos. Por ejemplo, M. Asgher, *et al.*¹¹⁴ reportaron degradaciones de diversos colorantes entre 89 – 100 % cuando se utilizaron enzimas inmovilizadas y degradaciones alrededor del 60 % al usarse la enzima TvL libre. Además en ambos casos, las degradaciones mejoraron con el uso de mediador. Por su parte, Z. Bagewadi, *et al.*¹⁴⁷ reportaron 100 % de degradación de colorantes sintéticos al usar una enzima inmovilizada además de mediador y 54 % de degradación cuando la reacción se llevó a cabo con la enzima inmovilizada, también en presencia de mediador. Este tipo de comportamientos se pueden atribuir a la estabilidad generada por la inmovilización, la cual protege a la enzima de la posible desnaturalización asociada a procesos de agitación y al hecho de que las reacciones se lleven a cabo a temperatura ambiente.

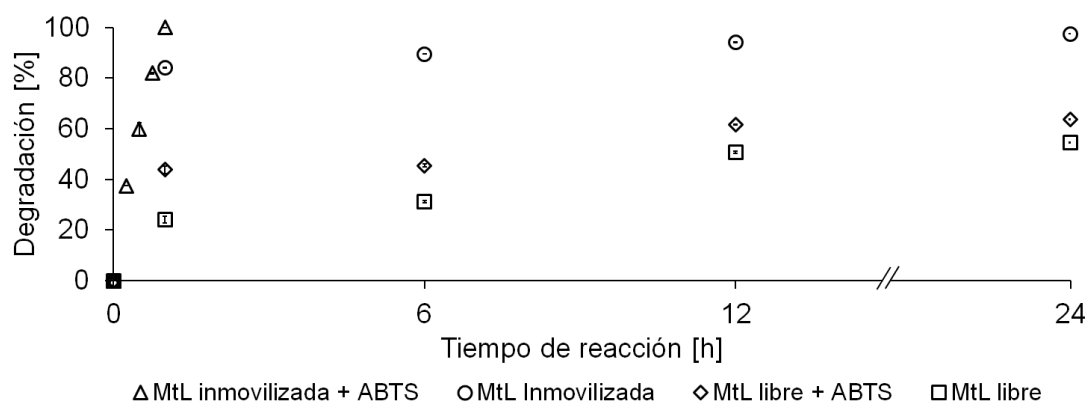


Fig. 5.9. Porcentaje de degradación de AZPM con y sin ABTS utilizando la enzima MtL libre e inmovilizada. Los experimentos se realizaron por duplicado y se muestran con sus respectivas desviaciones estándar (Fuente: Elaboración propia).

De los experimentos realizados con la enzima MtL, se encontró que tanto la inmovilización como el uso de ABTS mejoran la degradación de AZPM. Así que, una vez realizados los experimentos de degradación de con MtL, se procedió a realizar los mismos experimentos con el sistema de enzimas inmovilizadas. Sin embargo, debido al tiempo que se requirió para obtener este último biocatalizador polimérico y emplearlo en la degradación del pesticida, las enzimas utilizadas perdieron mucha actividad enzimática (alrededor del 93 % comparado con los valores reportados en la Sección 5.3.3). Esto indica que los resultados mostrados a continuación no son comparables en cuanto a la eficiencia de degradación del pesticida, sin embargo, son útiles para demostrar que el pH no influye en la degradación al utilizarse enzimas co-inmovilizadas.

Antes de realizar los estudios de degradación con este sistema, se evaluó la adsorción del pesticida sobre las microesferas de PGMA durante 5 min y se determinó que la cantidad de pesticida adsorbido fue de $195.20 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$. Basados en este valor, y teniendo en cuenta que los límites permisibles de AZPM en agua potable varían en el rango de $0.05 - 20 \mu\text{g/L}$ a nivel mundial¹²⁹, y como se discutió previamente, es posible encontrar concentraciones superiores a causa de la adición no controlada de pesticida por parte de los agricultores⁶, se seleccionó como concentración inicial de pesticida adicionado 0.2 mg/mL . De este modo la concentración analizada en la degradación fue de $4.59 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$. Adicionalmente, la adsorción de AZPM sobre microesferas sin enzimas inmovilizadas se analizó durante todo el tiempo de reacción, presentándose una adsorción inferior al 20 %, lo cual puede deberse a que se trata de esferas no porosas⁴⁷. Sin embargo, el valor adsorbido sigue siendo alto al compararse con los límites permitidos de pesticida en agua potable.

Una vez determinada la adsorción de AZPM se realizaron los estudios de degradación a los tres valores de pH de máxima actividad con y sin el uso del mediador ABTS, tal como se muestra en la Fig. 5.10. Para estos experimentos se observó que la degradación del pesticida fue total después de 8 días cuando se utilizó ABTS como mediador, en todos los valores de pH analizados. Por su parte, en los experimentos sin ABTS aunque se alcanzaron degradaciones por encima del 80 %, no se logró la degradación total en ninguno de los valores de pH estudiados (pH 3-ABTS, pH 4-ABTS y pH 6-ABTS) y

además, al igual que en los experimentos con mediador, tampoco se observaron diferencias significativas en las degradaciones a los valores de pH estudiados (valores- $p < 0.05$).

De estos resultados, se destaca la importancia de la inmovilización no sólo en la degradación sino también en la conservación de la actividad de las enzimas, con el fin de reducir los costos que conlleva la desnaturalización de la misma. Adicionalmente, se observó que no hay una influencia marcada del pH sobre la degradación del AZPM, lo que indica que al utilizar el biocatalizador polimérico es posible degradar el pesticida en un amplio rango de pH (3.0 – 6.0), generándose una gran ventaja en la degradación incluso al compararse con métodos de biorremediación en los que sólo se emplea una enzima inmovilizada.

Hasta el momento se ha reportado la degradación de este pesticida mediante métodos como electro-Fenton, fotodegradación, y ultrasonido^{148,149}. Sin embargo, estos trabajos además de requerir de reactivos tóxicos, y generar subproductos de degradación altamente contaminantes, también han demostrado trabajar en rangos de trabajo muy estrechos. En este trabajo, se demostró que la biorremediación es una herramienta competente y que mediante el uso del biocatalizador obtenido mediante la co-inmovilización de tres enzimas lacasa, es posible obtener degradaciones que no se vean afectadas por el pH y obtener la degradación total del pesticida analizado en el rango de pH de 3.0 – 6.0. Siendo de este modo, una herramienta ambientalmente amigable, eficiente, y competitiva para la degradación de AZPM en medio acuoso.

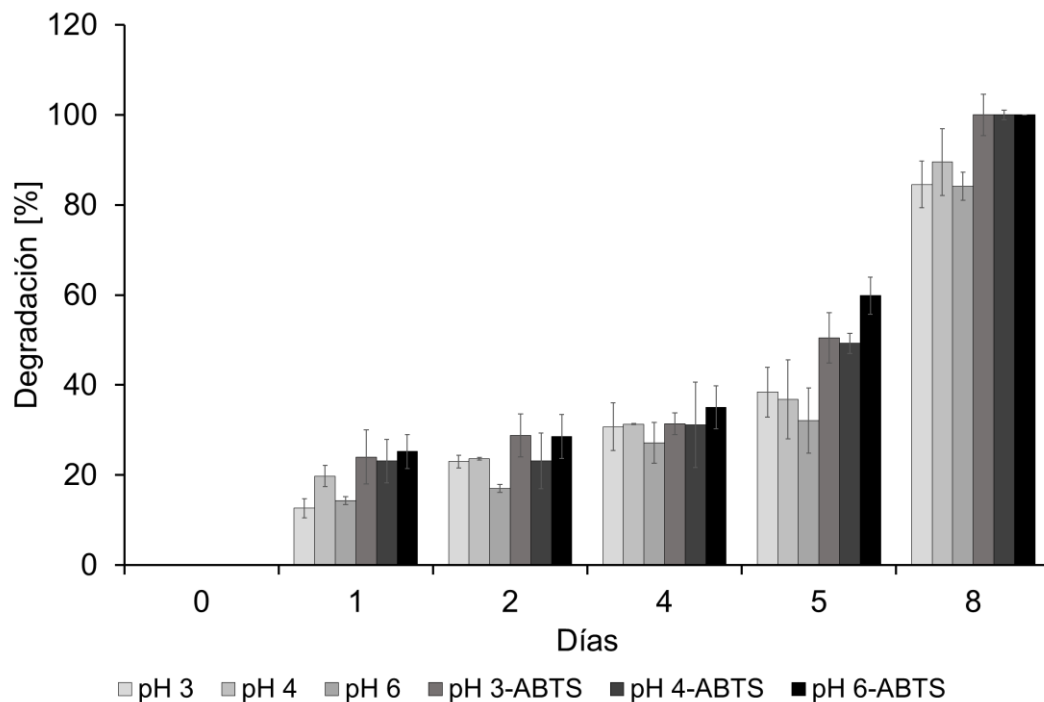


Fig. 5.10. Porcentaje de degradación de AZPM con y sin ABTS a los valores de pH óptimos del sistema de enzimas inmovilizadas. Los experimentos se realizaron por duplicado y se muestran con las respectivas desviaciones estándar (Fuente: Elaboración propia).

5.4 Conclusiones

En este capítulo se realizó la síntesis del segundo biocatalizador polimérico, esta vez conformado por la co-inmovilización de 3 tipos de enzimas lacasa, el cual presentó amplio rango de pH de trabajo óptimo (3.0 – 6.0). Para ello, inicialmente se optimizaron las condiciones de inmovilización que permitieron maximizar la actividad de las enzimas inmovilizadas, y los valores obtenidos se contrastaron con los obtenidos en el Capítulo 3. Posteriormente, mediante la selección de la estrategia de co-inmovilización adecuada, se obtuvo el sistema de enzimas inmovilizadas capaz de trabajar en un amplio rango de pH. El sistema obtenido se comparó en cuanto a estabilidad térmica con las enzimas libres y las individualmente inmovilizadas, y se observó que tras la inmovilización, se reducía la temperatura necesaria para alcanzar la máxima actividad relativa. En cuanto a la reusabilidad, se encontró que el sistema de enzimas co-inmovilizadas era capaz de

conservar más del 60 % de la actividad inicial después de 6 ciclos de reuso, siendo este valor superior a muchos de los reportados en la literatura para inmobilizaciones individuales. Para la estabilidad de almacenamiento, se encontró que tanto las enzimas inmobilizadas individualmente, como las co-inmobilizadas fueron capaces de conservar mayores estabilidades tanto a 25 como a 4 °C. Adicionalmente, se evaluó la eficiencia catalítica y se observó que para todas las inmobilizaciones este valor disminuía, lo cual se atribuye a las interacciones de las enzimas con el soporte. Finalmente, se evaluó la degradación de AZPM, inicialmente mediante el uso de MtL libre e inmobilizada, encontrándose una notoria mejora en la degradación al utilizarse la enzima inmobilizada y ABTS 1.0 mmol/L como mediador, lo que resultó en la degradación del 100 % del pesticida en tan sólo una hora de reacción. Por su parte, cuando el sistema de enzimas co-inmobilizadas se probó en la degradación de AZPM, no se observó la misma eficiencia que con el uso de MtL, debido a que las enzimas habían perdido mucho de su actividad a causa del tiempo de almacenamiento. Lo que de nuevo refleja la importancia de la inmobilización en la mejora de la estabilidad de almacenamiento. Sin embargo, el sistema de enzimas co-inmobilizadas sirvió para evidenciar que el pH no influye en la degradación de AZPM, siendo posible degradar el 100 % del pesticida después de 8 días de contacto, esto a todos los valores de pH estudiados (3.0, 4.0, y 6.0).

Los resultados obtenidos demuestran que mediante la selección de las enzimas adecuadas, es posible obtener un sistema que trabaje en el rango de acción deseado de forma eficiente, y que las enzimas lacasa inmobilizadas sobre microesferas de PGMA pueden ser empleadas en la remoción y degradación del pesticida organofosforado AZPM.

6. Conclusiones generales y perspectivas

6.1 Conclusiones

Se lograron sintetizar microesferas poliméricas de poli(glicidil metacrilato) altamente homogéneas mediante polimerización por dispersión, para ser usadas como soporte polimérico en la inmovilización covalente de enzimas lacasa provenientes de diferentes hongos. Posteriormente, mediante modificación superficial de las microesferas poliméricas se reemplazaron los grupos epóxido superficiales de la mitad de las microesferas por grupos hidrazida y se hizo un análisis comparativo entre las propiedades bioquímicas de la enzima *Trametes versicolor* inmovilizada (en las condiciones óptimas establecidas por diseño de experimento) sobre cada tipo de soporte. Como resultado de este estudio, se estableció que las propiedades bioquímicas de las enzimas tales como su estabilidad a diferentes valores de pH, temperatura y de almacenamiento son altamente dependientes del tipo de grupo funcional presente en el soporte sobre el que se realiza la inmovilización y que todos los parámetros se ven mejorados cuando la inmovilización se lleva a cabo sobre un soporte con grupos oxirano. Adicionalmente, mediante el estudio de los parámetros cinéticos antes y después de ambas inmovilizaciones, se determinó que como producto de la inmovilización disminuyó la eficiencia catalítica de las enzimas, lo cual se atribuye a la pérdida de libertad de movimientos que genera la interacción covalente de la enzima con el soporte, siendo este aspecto característico de las inmovilizaciones covalentes, pero que se ve compensado por la mejora de la estabilidad de la enzima y de las propiedades bioquímicas anteriormente mencionadas.

Posteriormente, se sintetizó un primer biocatalizador polimérico compuesto por dos enzimas lacasa covalentemente inmovilizadas; *Trametes versicolor* y *Agaricus bisporus*. La síntesis de este sistema de enzimas inmovilizadas demostró que es posible la incorporación de dos enzimas con propiedades diferentes en el mismo soporte, generando como resultado propiedades combinadas que resultan en la ampliación del rango de pH de trabajo, además del aumento en la estabilidad térmica, de almacenamiento y la reusabilidad, comprobándose de este modo la primera hipótesis propuesta en esta tesis doctoral.

Una vez caracterizado este biocatalizador, se llevó a cabo su aplicación en la degradación del pesticida diazinon, observándose la total degradación de este compuesto en los dos valores de máxima eficiencia catalítica (2.0 y 3.0) al utilizarse ABTS (1.0 mmol/L) como mediador.

Posteriormente, se llevó a cabo la construcción del segundo biocatalizador polimérico, el cual fue capaz de trabajar en un intervalo óptimo de pH de 3.0 – 6.0. Esta síntesis se realizó a partir de la co-inmovilización de las enzimas lacasas de *Trametes versicolor*, *Myceliophthora thermophila* y *Aspergillus sp*, las cuales fueron cuidadosamente seleccionadas con el fin de que el sistema de enzimas inmovilizadas trabajara en un rango más amplio de pH que el obtenido para el biocatalizador polimérico desarrollado en el Capítulo 4.

En la construcción del biocatalizador polimérico se propusieron dos técnicas de co-inmovilización y se encontró que con el fin de ampliar el rango de pH de trabajo es necesario que la cantidad de enzimas co-inmovilizadas esté relacionada con la actividad de éstas cuando se encuentran inmovilizadas separadamente y que la inmovilización de cantidades iguales de enzima no necesariamente genera los mejores resultados.

En cuanto a las demás propiedades bioquímicas del biocatalizador polimérico, se establecieron mejoras en la estabilidad térmica, de almacenamiento (a 4 y 25 °C) y la reusabilidad, tras la inmovilización de las tres enzimas.

Por su parte, al comparar los parámetros cinéticos de las 3 enzimas analizadas antes y después de las inmovilizaciones individuales, se encontró la disminución de la eficiencia catalítica como producto de la inmovilización, lo cual concordó con los resultados obtenidos en el Capítulo 3.

El biocatalizador polimérico obtenido en el Capítulo 5 se aplicó y evaluó en la degradación del pesticida azinfos-metil. En un principio el estudio se realizó con la enzima lacasa de *Myceliophthora thermophila* libre e inmovilizada, con el fin de establecer diferencias en la degradación y las condiciones necesarias para esta. Se encontró una notable mejora cuando la degradación se llevó a cabo con la enzima inmovilizada, obteniéndose como resultado la total degradación del pesticida en tan sólo una hora de reacción en presencia del mediador ABTS.

Adicionalmente, se evaluó la capacidad de degradación del pesticida AZPM a diferentes valores de pH con el biocatalizador polimérico compuesto por tres enzimas y aunque debido a la pérdida de actividad de las enzimas, no fue posible evaluarse en términos cinéticos, el sistema sirvió para evidenciar que el pH no influye en la degradación de este compuesto en los tres valores de pH analizados. Con estos resultados, fue posible terminar de comprobar la segunda hipótesis planteada en este trabajo de investigación.

Finalmente, se puede concluir que la inmovilización covalente de 1, 2 y 3 enzimas lacasa sobre microesferas poliméricas con grupos oxirano superficiales, es una excelente alternativa para la mejora de las propiedades bioquímicas de las enzimas, generando además la posibilidad de reúso de estas enzimas mediante filtración simple, lo que genera como resultado, biocatalizadores poliméricos robustos con potenciales aplicaciones industriales y con alta eficiencia en la degradación de plaguicidas organofosforados.

6.2 Perspectivas



A continuación se listan algunos de los aspectos susceptibles de estudio en el marco de esta tesis:

- Estudiar la co-inmovilización de enzimas no solamente lacasas, sino también de diferentes tipos con el fin de ampliar el rango de posibles aplicaciones tanto en la degradación de compuestos recalcitrantes, como en la síntesis orgánica y la polimerización.
- Estudiar la co-inmovilización mediante otras técnicas de inmovilización enzimática como el entrecruzamiento de enzimas, de modo tal que se reduzcan las pérdidas de la eficiencia catalítica y se pueda aumentar la cantidad de enzima inmovilizada en la solución sin que se aumente la cantidad de soporte polimérico susceptible de adsorber al sustrato.
- Estudiar la co-inmovilización enzimática sobre soportes con características magnéticas, de modo tal que se puedan reutilizar las enzimas cuando se trabajan en medios viscosos como en procesos de polimerización.

7. Publicaciones y presentaciones a congresos

Publicaciones

- **Myleidi Vera**, Bernabé L. Rivas. Immobilization of *Trametes versicolor* laccase on different PGMA-based polymeric microspheres using response surface methodology: Optimization of conditions. *J. Appl. Polym. Sci.* 2017, 134, 45249.
- **Myleidi Vera**, Gibson S. Nyanhongo, Alessandro Pellis, Bernabé L. Rivas, Georg M. Guebitz. Immobilization of *Myceliophthora thermophila* Laccase on poly(glycidyl methacrylate) microspheres enhances the degradation of azinphos methyl. *J. Appl. Polym. Sci.* 2018, 136, 47417.
- **Myleidi Vera**, Gibson S. Nyanhongo, Georg M. Guebitz, Bernabé L. Rivas. Co-immobilized *Agaricus bisporus* and *Trametes versicolor* laccases on polymeric microspheres and their application in diazinon degradation. Estado: enviado a la revista *European Polymer Journal*.
- Bruno F. Urbano, Saúl Bustamante, Daniel Palacio, **Myleidi Vera**, Bernabé L. Rivas. Polymers for sensing, removal, and degradation of hazardous organic pollutants. Estado: enviado a la revista *Polymer Reviews*.
- **Myleidi Vera**, Csaba Fodor, Eduardo Pereira, Katja Loos, Bernabé L. Rivas. Co-immobilization of multiples laccases improves and expand the range of benzophenone-3 degradation. Estado: en preparación.
- **Myleidi Vera**, Bernabé L. Rivas, Gibson S. Nyanhongo, Karina Stadler, Georg M. Guebitz. Biobased lignosulfonates–starch films: enzymatic synthesis and characterization. Estado: en preparación.
- **Myleidi Vera**, Bernabé L. Rivas. Laccase: Synthesis, polymerization and biodegradation applications. Estado: en preparación.

Contribuciones en eventos internacionales

- Myleidi Vera, Bernabé L. Rivas. **Co-immobilization of different laccase enzymes on poly(glycidyl methacrylate) microspheres for carbofuran degradation.** Danube Vltava Sava Polymer Meeting. Viena – Austria (2017).
- Myleidi Vera, Alessandro Pellis, Simone Weinberger, Gibson S. Nyanhongo, Georg M. Guebitz, Bernabé L. Rivas. **Development of a robust and recyclable laccase preparation via covalent immobilization on poly(glycidyl methacrylate) microspheres.** International Conference on Polymers and Advanced Materials POLYMAT. Huatulco – México (2017).
- Myleidi Vera, Bernabé L. Rivas. **The optimization of laccase immobilization conditions onto two different polymeric microspheres by response surface methodology.** XV Simposio Latinoamericano de Polímeros. Cancún – México (2016).
- Myleidi Vera, Bernabé L. Rivas. **Monodisperse microspheres of glycidyl methacrylate as polymeric support for laccase immobilization.** XV Simposio Latinoamericano de Polímeros. Cancún – México (2016).

Contribuciones en eventos nacionales

- Myleidi Vera, Bernabé L. Rivas. **Synthesis of a new polymeric multi-enzymatic biocatalyst based on the co-immobilization of laccase for pesticides degradation.** IX Coloquio de Macromoléculas. Parral – Chile (2018).
- Myleidi Vera, Bernabé L. Rivas. **Improving of laccases enzymatic properties by immobilization on polymeric microspheres.** VIII Coloquio de Macromoléculas. Parral – Chile (2016).
- Myleidi Vera, Bernabé L. Rivas. **Soportes poliméricos para inmovilización enzimática: obtención de microesferas mediante polimerización por dispersión.**

32° congreso latinoamericano de química XXXI Jornadas Chilenas de Química.
Concepción – Chile (2016).



8. Referencias

- (1) Banco Central de Chile. Base de Datos Estadísticos https://si3.bcentral.cl/Siete/secure/cuadros/arboles.aspx?idCuadro=CCNN2013_P0_V2 (accessed Jan 7, 2019).
- (2) Verma, J. P.; Jaiswal, D. K.; Sagar, R. Pesticide Relevance and Their Microbial Degradation: A-State-of-Art. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology* **2014**, *13* (4), 429–466.
- (3) Deknock, A.; De Troyer, N.; Houbraken, M.; Dominguez-Granda, L.; Nolivos, I.; Van Echelpoel, W.; Forio, M. A. E.; Spanoghe, P.; Goethals, P. Distribution of Agricultural Pesticides in the Freshwater Environment of the Guayas River Basin (Ecuador). *Sci. Total Environ.* **2019**, *646*, 996–1008.
- (4) Valenzuela, E. F.; Menezes, H. C.; Cardeal, Z. L. New Passive Sampling Device for Effective Monitoring of Pesticides in Water. *Anal. Chim. Acta* **2018**.
- (5) Derbalah, A.; Chidya, R.; Jadoon, W.; Sakugawa, H. Temporal Trends in Organophosphorus Pesticides Use and Concentrations in River Water in Japan, and Risk Assessment. *J. Environ. Sci.* **2018**.
- (6) Tabasideh, S.; Maleki, A.; Shahmoradi, B.; Ghahremani, E.; McKay, G. Sonophotocatalytic Degradation of Diazinon in Aqueous Solution Using Iron-Doped TiO₂ Nanoparticles. *Sep. Purif. Technol.* **2017**, *189*, 186–192.
- (7) Shabtai, I. A.; Mishael, Y. G. Catalytic Polymer-Clay Composite for Enhanced Removal and Degradation of Diazinon. *J. Hazard. Mater.* **2017**, *335*, 135–142.
- (8) Zhang, X.; Gao, Y.; Zang, P.; Zhao, Y.; He, Z.; Zhu, H.; Song, S.; Zhang, L. Study on the Simultaneous Degradation of Five Pesticides by *Paenibacillus Polymyxa* from *Panax Ginseng* and the Characteristics of Their Products. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2019**, *168*, 415–422.
- (9) Wei, J.; Chen, Y.; Tiemur, A.; Wang, J.; Wu, B. Degradation of Pesticide Residues by Gaseous Chlorine Dioxide on Table Grapes. *Postharvest Biol. Technol.* **2018**, *137*, 142–148.
- (10) Rangasamy, K.; Athiappan, M.; Devarajan, N.; Samykannu, G.; Parray, J. A.; Aruljothi, K. N.; Shameem, N.; Alqarawi, A. A.; Hashem, A.; Abd_Allah, E. F.

- Pesticide Degrading Natural Multidrug Resistance Bacterial Flora. *Microb. Pathog.* **2018**, *114*, 304–310.
- (11) Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura-FAO. Definiciones para los fines del codex alimentarius <http://www.fao.org/docrep/w5975s/w5975s08.htm> (accessed Jan 10, 2019).
 - (12) Departamento de epidemiología. Ministerio de Salud. *Boletín Epidemiológico Trimestral Intoxicaciones Agudas Por Plaguicidas (IAP) - REVEP. Vol 114. N° 1. 2018*; 2018.
 - (13) Kumar, S.; Kaushik, G.; Dar, M. A.; Nimesh, S.; López-Chuken, U. J.; Villareal-Chiu, J. F. Microbial Degradation of Organophosphate Pesticides: A Review. *Pedosphere* **2018**, *28* (2), 190–208.
 - (14) Vitola, G.; Mazzei, R.; Poerio, T.; Porzio, E.; Manco, G.; Perrotta, I.; Militano, F.; Giorno, L. Biocatalytic Membrane Reactor Development for Organophosphates Degradation. *J. Hazard. Mater.* **2019**, *365*, 789–795.
 - (15) Epa, U.; of Pesticide Programs, O. *Recognition and Management of Pesticide Poisonings: Sixth Edition: 2013: Chapter 5 Organophosphates*.
 - (16) Punitha, M.; Rose, J. C. Biodegradation of Organophosphorous Pesticide Using Immobilized Esterase and Toxicity Assessment. *J. Glob. Biosci.* **2018**, *7* (1), 5331–5341.
 - (17) Mirmasoomi, S. R.; Mehdipour Ghazi, M.; Galedari, M. Photocatalytic Degradation of Diazinon under Visible Light Using TiO₂/Fe₂O₃ Nanocomposite Synthesized by Ultrasonic-Assisted Impregnation Method. *Sep. Purif. Technol.* **2017**, *175*, 418–427.
 - (18) The Agriculture & Environment Research Unit (AERU). PPDB - Pesticides Properties DataBase <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/index.htm> (accessed Dec 26, 2018).
 - (19) Flocco, C. G.; Carranza, M. P.; Carvajal, L. G.; Loewy, R. M.; Pechén De D'Angelo, A. M.; Giuliatti, A. M. Removal of Azinphos Methyl by Alfalfa Plants (*Medicago Sativa L.*) in a Soil-Free System. *Sci. Total Environ.* **2004**, *327* (1–3), 31–39.
 - (20) *The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to*

Classification 2009; 2010.

- (21) Montemurro, M.; Siano, G. G.; Culzoni, M. J.; Goicoechea, H. C. Automatic Generation of Photochemically Induced Excitation-Emission-Kinetic Four-Way Data for the Highly Selective Determination of Azinphos-Methyl in Fruit Juices. *Sensors Actuators, B Chem.* **2017**, *239*, 397–404.
- (22) Ménager, M.; Pan, X.; Wong-Wah-Chung, P.; Sarakha, M. Photochemistry of the Pesticide Azinphos Methyl and Its Model Molecule 1,2,3-Benzotriazin-4(3H)-One in Aqueous Solutions: Kinetic and Analytical Studies. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2007**, *192* (1), 41–48.
- (23) Wang, C. K.; Shih, Y. H. Facilitated Ultrasonic Irradiation in the Degradation of Diazinon Insecticide. *Sustain. Environ. Res.* **2016**, *26* (3), 110–116.
- (24) Shayeghi, M.; Dehghani, M.; Mahvi, A.; Azam, K. Application of Acoustical Processor Reactors for Degradation of Diazinon from Surface Water. *Iran. J. Arthropod. Borne. Dis.* **2010**, *4* (2), 11–18.
- (25) Köck-Schulmeyer, M.; Ginebreda, A.; Postigo, C.; Garrido, T.; Fraile, J.; López de Alda, M.; Barceló, D. Four-Year Advanced Monitoring Program of Polar Pesticides in Groundwater of Catalonia (NE-Spain). *Sci. Total Environ.* **2014**, *470–471*, 1087–1098.
- (26) Ryberg, K. R.; Gilliom, R. J. Trends in Pesticide Concentrations and Use for Major Rivers of the United States. *Sci. Total Environ.* **2015**, *538*, 431–444.
- (27) Mirsoleimani-azizi, S. M.; Setoodeh, P.; Samimi, F.; Shadmehr, J.; Hamed, N.; Rahimpour, M. R. Diazinon Removal from Aqueous Media by Mesoporous MIL-101(Cr) in a Continuous Fixed-Bed System. *J. Environ. Chem. Eng.* **2018**, *6* (4), 4653–4664.
- (28) Zhang, X.; Starner, K.; Goh, K. S.; Gill, S. Analysis of Diazinon Agricultural Use in Regions of Frequent Surface Water Detections in California, USA. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2012**, *88* (3), 333–337.
- (29) Agrelo, M.; Rivadeneira, P. R.; Cossi, P. F.; Cacciatore, L. C.; Kristoff, G. Azinphos-Methyl Causes in *Planorbarius Corneus* Toxic Effects on Reproduction, Offspring Survival and B-Esterases Depending on the Exposure Time. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2019**, *217*, 114–121.

- (30) Loewy, M.; Kirs, V.; Carvajal, G.; Venturino, A.; Pechen De D'Angelo, A. M. Groundwater Contamination by Azinphos Methyl in the Northern Patagonic Region (Argentina). *Sci. Total Environ.* **1999**, *225* (3), 211–218.
- (31) Quintana, M. M.; Vera, B.; Magnarelli, G.; Guiñazú, N.; Rovedatti, M. G. Neonatal, Placental, and Umbilical Cord Blood Parameters in Pregnant Women Residing in Areas with Intensive Pesticide Application. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2017**, *24* (25), 20736–20746.
- (32) Cecchi, A.; Rovedatti, M. G.; Sabino, G.; Magnarelli, G. G. Environmental Exposure to Organophosphate Pesticides: Assessment of Endocrine Disruption and Hepatotoxicity in Pregnant Women. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2012**, *80*, 280–287.
- (33) Ferrari, A.; Anguiano, O. L.; Soleño, J.; Venturino, A.; Pechen de D'Angelo, A. M. Different Susceptibility of Two Aquatic Vertebrates (*Oncorhynchus Mykiss* and *Bufo Arenarum*) to Azinphos Methyl and Carbaryl. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2004**, *139* (4), 239–243.
- (34) Rasoulifard, M. H.; Akrami, M.; Eskandarian, M. R. Degradation of Organophosphorus Pesticide Diazinon Using Activated Persulfate: Optimization of Operational Parameters and Comparative Study by Taguchi's Method. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2014**, *000*, 1–14.
- (35) Wang, C.; Shih, Y. Degradation and Detoxification of Diazinon by Sono-Fenton and Sono-Fenton-like Processes. *Sep. Purif. Technol.* **2015**, *140*, 6–12.
- (36) Ayoubi-Feiz, B.; Mashhadizadeh, M. H.; Sheydaei, M. Degradation of Diazinon by New Hybrid Nanocomposites N-TiO₂/Graphene/Au and N-TiO₂/Graphene/Ag Using Visible Light Photo-Electro Catalysis and Photo-Electro Catalytic Ozonation: Optimization and Comparative Study by Taguchi Method. *Sep. Purif. Technol.* **2019**, *211*, 704–714.
- (37) Zhao, J.; Jiang, Y.; Kong, M.; Liu, G.; Dionysiou, D. D. Fe(III)-Oxalate Complex Mediated Phosphate Released from Diazinon Photodegradation: Pathway Signatures Based on Oxygen Isotopes. *J. Hazard. Mater.* **2018**, *358*, 319–326.
- (38) Fang, H.; Zhang, H.; Han, L.; Mei, J.; Ge, Q.; Long, Z.; Yu, Y. Exploring Bacterial Communities and Biodegradation Genes in Activated Sludge from Pesticide Wastewater Treatment Plants via Metagenomic Analysis. *Environ. Pollut.* **2018**,

243, 1206–1216.

- (39) Kurade, M. B.; Kim, J. R.; Govindwar, S. P.; Jeon, B.-H. Insights into Microalgae Mediated Biodegradation of Diazinon by *Chlorella Vulgaris*: Microalgal Tolerance to Xenobiotic Pollutants and Metabolism. *Algal Res.* **2016**, *20*, 126–134.
- (40) Lofthus, S.; Netzer, R.; Lewin, A. S.; Heggeset, T. M. B.; Haugen, T.; Brakstad, O. G. Biodegradation of N-Alkanes on Oil–seawater Interfaces at Different Temperatures and Microbial Communities Associated with the Degradation. *Biodegradation* **2018**, *29* (2), 141–157.
- (41) Chen, X.; He, S.; Liang, Z.; Li, Q. X.; Yan, H.; Hu, J.; Liu, X. Biodegradation of Pyraclostrobin by Two Microbial Communities from Hawaiian Soils and Metabolic Mechanism. *J. Hazard. Mater.* **2018**, *354*, 225–230.
- (42) Wang, X.; Hou, X.; Liang, S.; Lu, Z.; Hou, Z.; Zhao, X.; Sun, F.; Zhang, H. Biodegradation of Fungicide Tebuconazole by *Serratia Marcescens* Strain B1 and Its Application in Bioremediation of Contaminated Soil. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **2018**, *127*, 185–191.
- (43) Ahuactzin-Pérez, M.; Tlecuítl-Beristain, S.; García-Dávila, J.; Santacruz-Juárez, E.; González-Pérez, M.; Gutiérrez-Ruíz, M. C.; Sánchez, C. A Novel Biodegradation Pathway of the Endocrine-Disruptor Di(2-Ethyl Hexyl) Phthalate by *Pleurotus Ostreatus* Based on Quantum Chemical Investigation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2018**, *147*, 494–499.
- (44) Ahmad, F.; Anwar, S.; Firdous, S.; Da-Chuan, Y.; Iqbal, S. Biodegradation of Bispyribac Sodium by a Novel Bacterial Consortium BDAM: Optimization of Degradation Conditions Using Response Surface Methodology. *J. Hazard. Mater.* **2018**, *349*, 272–281.
- (45) Sharma, B.; Dangi, A. K.; Shukla, P. Contemporary Enzyme Based Technologies for Bioremediation: A Review. *J. Environ. Manage.* **2018**, *210*, 10–22.
- (46) Chakraborty, J.; Jana, T.; Saha, S.; Dutta, T. K. Ring-Hydroxylating Oxygenase Database: A Database of Bacterial Aromatic Ring-Hydroxylating Oxygenases in the Management of Bioremediation and Biocatalysis of Aromatic Compounds. *Environ. Microbiol. Rep.* **2014**, *6* (5), 519–523.
- (47) Vera, M.; Nyanhongo, G. S.; Guebitz, G. M.; Pellis, A.; Rivas, B. L.

- Immobilization of Myceliophthora Thermophila Laccase on Poly(Glycidyl Methacrylate) Microspheres Enhances the Degradation of Azinphos- Methyl. *J. Appl. Polym. Sci.* **2018**, *136*, 1–10.
- (48) Bansal, N.; Kanwar, S. S. Peroxidase(s) in Environment Protection. *ScientificWorldJournal.* **2013**, *2013*, 714639.
- (49) Narwal, S. K.; Gupta, R. Biodiesel Production by Transesterification Using Immobilized Lipase. *Biotechnol. Lett.* **2013**, *35* (4), 479–490.
- (50) Bhardwaj, V.; Degrassi, G.; Kumar Bhardwaj, R. Bioconversion of Cellulosic Materials by the Action of Microbial Cellulases. *Int. Res. J. Eng. Technol.* **2008**, *9001*.
- (51) Wang, D.; Zou, L.; Jin, Q.; Hou, J.; Ge, G.; Yang, L. Human Carboxylesterases: A Comprehensive Review. *Acta Pharm. Sin. B* **2018**, *8* (5), 699–712.
- (52) Nagata, Y.; Ohtsubo, Y.; Tsuda, M. Properties and Biotechnological Applications of Natural and Engineered Haloalkane Dehalogenases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99* (23), 9865–9881.
- (53) Kupski, L.; Salcedo, G. M.; Caldas, S. S.; de Souza, T. D.; Furlong, E. B.; Primel, E. G. Optimization of a Laccase-Mediator System with Natural Redox-Mediating Compounds for Pesticide Removal. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2019**, 1–9.
- (54) Vidal, A.; García-Suárez, P. C.; Arellano-García, E.; Contreras, O. E.; Aguila, S. Enhanced Degradation of Pesticide Dichlorophen by Laccase Immobilized on Nanoporous Materials: A Cytotoxic and Molecular Simulation Investigation. *Bioconjug. Chem.* **2018**, acs.bioconjchem.7b00739.
- (55) Yoshida, H. LXIII.—Chemistry of Lacquer (Urushi). Part I. Communication from the Chemical Society of Tokio. *J. Chem. Soc., Trans.* **1883**, *43* (0), 472–486.
- (56) Liu, Q.; Luo, L.; Wang, X.; Shen, Z.; Zheng, L.; Liu, Q.; Luo, L.; Wang, X.; Shen, Z.; Zheng, L. Comprehensive Analysis of Rice Laccase Gene (OsLAC) Family and Ectopic Expression of OsLAC10 Enhances Tolerance to Copper Stress in Arabidopsis. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18* (2), 209.
- (57) Claus, H. Laccases of Botrytis Cinerea. In *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*; Springer International Publishing: Cham, 2017; pp 339–356.
- (58) Kaur, K.; Singh, G.; Gupta, V.; Capalash, N.; Sharma, P. Impact of Phosphate and

- Other Medium Components on Physiological Regulation of Bacterial Laccase Production. *Biotechnol. Prog.* **2017**, *33* (2), 541–548.
- (59) Shi, L.; Chan, S.; Li, C.; Zhang, S. Identification and Characterization of a Laccase from *Litopenaeus Vannamei* Involved in Anti-Bacterial Host Defense. *Fish Shellfish Immunol.* **2017**, *66*, 1–10.
- (60) Lozano Camargo, M. L.; Galicia, L.; Granados Rodriguez, J. M.; Cañeda Guzmán, E. Electrochemical Degradation of the Recalcitrant Compound 4-Nitrophenol, Using Lacasa Enzyme. *ECS Trans.* **2018**, *84* (1), 29–34.
- (61) Yesilada, O.; Birhanli, E.; Geckil, H. Bioremediation and Decolorization of Textile Dyes by White Rot Fungi and Laccase Enzymes; Springer, Cham, 2018; pp 121–153.
- (62) Kunamneni, A. Laccases—properties and Applications. *Enzym. Hum. Anim. Nutr.* **2018**, 133–161.
- (63) Mayer, A. M.; Staples, R. C. Laccase: New Functions for an Old Enzyme. *Phytochemistry* **2002**, *60* (6), 551–565.
- (64) Wahleithner, J. A.; Xu, F.; Brown, K. M.; Brown, S. H.; Golightly, E. J.; Halkier, T.; Kauppinen, S.; Pederson, A.; Schneider, P. The Identification and Characterization of Four Laccases from the Plant Pathogenic Fungus *Rhizoctonia Solani*. *Curr. Genet.* **1996**, *29* (4), 395–403.
- (65) Barrios-Estrada, C.; de Jesús Rostro-Alanis, M.; Muñoz-Gutiérrez, B. D.; Iqbal, H. M. N.; Kannan, S.; Parra-Saldívar, R. Emergent Contaminants: Endocrine Disruptors and Their Laccase-Assisted Degradation – A Review. *Sci. Total Environ.* **2018**, *612*, 1516–1531.
- (66) Madhavi, V.; Lele, S. S. Laccase: Properties and Applications. *BioResources* **2009**, *4* (4), 1694–1717.
- (67) Chaurasia, P. K.; Shanker, R.; Yadav, S.; Yadava, S. A Review on Mechanism of Laccase Action. *RRBS* **2013**, *7* (2), 66–71.
- (68) Kunamneni, A.; Plou, F. J.; Ballesteros, A.; Alcalde, M. Laccases and Their Applications: A Patent Review. *Recent Pat. Biotechnol.* **2008**, *2* (1), 10–24.
- (69) Leonowicz, A.; Cho, N.; Luterek, J.; Wilkolazka, A.; Wojtas-Wasilewska, M.; Matuszewska, A.; Hofrichter, M.; Wesenberg, D.; Rogalski, J. Fungal Laccase:

- Properties and Activity on Lignin. *J. Basic Microbiol.* **2001**, *41* (3–4), 185–227.
- (70) Moilanen, U.; Kellock, M.; Várnai, A.; Andberg, M.; Viikari, L. Mechanisms of Laccase-Mediator Treatments Improving the Enzymatic Hydrolysis of Pre-Treated Spruce. *Biotechnol. Biofuels* **2014**, *7* (1), 177.
- (71) Kunamneni, A.; Ballesteros, A.; Plou, F. J.; Alcalde, M. Fungal Laccase – a Versatile Enzyme for Biotechnological Applications. *Appl. Microbiol.* **2007**, 233–245.
- (72) Sarma, R.; Islam, M. S.; Miller, A. F.; Bhattacharyya, D. Layer-by-Layer-Assembled Laccase Enzyme on Stimuli-Responsive Membranes for Chloro-Organics Degradation. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (17), 14858–14867.
- (73) Zhang, D.; Deng, M.; Cao, H.; Zhang, S.; Zhao, H. Laccase Immobilized on Magnetic Nanoparticles by Dopamine Polymerization for 4-Chlorophenol Removal. *Green Energy Environ.* **2017**.
- (74) Datta, S.; Christena, L. R.; Rajaram, Y. R. S. Enzyme Immobilization: An Overview on Techniques and Support Materials. *3 Biotech* **2013**, *3* (1), 1–9.
- (75) Bezerra, C. S.; De Farias Lemos, C. M. G.; De Sousa, M.; Goncalves, L. R. B. Enzyme Immobilization onto Renewable Polymeric Matrixes: Past, Present, and Future Trends. *J. Appl. Polym. Sci.* **2015**, *132* (26), 1–15.
- (76) Ali, M.; Husain, Q. Guar Gum Blended Alginate/Agarose Hydrogel as a Promising Support for the Entrapment of Peroxidase: Stability and Reusability Studies for the Treatment of Textile Effluent. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *116*, 463–471.
- (77) Strakosas, X.; Huerta, M.; Donahue, M. J.; Hama, A.; Pappa, A.-M.; Ferro, M.; Ramuz, M.; Rivnay, J.; Owens, R. M. Catalytically Enhanced Organic Transistors for *in Vitro* Toxicology Monitoring through Hydrogel Entrapment of Enzymes. *J. Appl. Polym. Sci.* **2017**, *134* (7).
- (78) Samoylova, Y.; Sorokina, K.; Piligaev, A.; Parmon, V. Preparation of Stable Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs) of a *Ureibacillus Thermosphaericus* Esterase for Application in Malathion Removal from Wastewater. *Catalysts* **2018**, *8* (4), 154.
- (79) Cao, L. *Carrier-Bound Immobilized Enzymes: Principles, Applications and Design*; Wiley-VCH, 2005.

- (80) Xiang, X.; Suo, H.; Xu, C.; Hu, Y. Covalent Immobilization of Lipase onto Chitosan-Mesoporous Silica Hybrid Nanomaterials by Carboxyl Functionalized Ionic Liquids as the Coupling Agent. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2018**, *165*, 262–269.
- (81) Sirisha, V. L.; Jain, A.; Jain, A. Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes. *Adv. Food Nutr. Res.* **2016**, *79*, 179–211.
- (82) Mohamad, N. R.; Marzuki, N. H. C.; Buang, N. A.; Huyop, F.; Wahab, R. A. An Overview of Technologies for Immobilization of Enzymes and Surface Analysis Techniques for Immobilized Enzymes. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2015**, *29* (2), 205–220.
- (83) Lou, L.-L.; Qu, H.; Yu, W.; Wang, B.; Ouyang, L.; Liu, S.; Zhou, W. Covalently Immobilized Lipase on a Thermoresponsive Polymer with an Upper Critical Solution Temperature as an Efficient and Recyclable Asymmetric Catalyst in Aqueous Media. *ChemCatChem* **2018**, *10* (5), 1166–1172.
- (84) Vera, M.; Rivas, B. L. Immobilization of *Trametes Versicolor* Laccase on Different PGMA-Based Polymeric Microspheres Using Response Surface Methodology: Optimization of Conditions. *J. Appl. Polym. Sci.* **2017**, *134* (36), 45249.
- (85) Bayramoğlu, G.; Yakup Arica, M. Immobilization of Laccase onto Poly(Glycidylmethacrylate) Brush Grafted Poly(Hydroxyethylmethacrylate) Films: Enzymatic Oxidation of Phenolic Compounds. *Mater. Sci. Eng. C* **2009**, *29* (6), 1990–1997.
- (86) Méndez, M. B.; Rivero, C. W.; López-Gallego, F.; Guisán, J. M.; Trelles, J. A. Development of a High Efficient Biocatalyst by Oriented Covalent Immobilization of a Novel Recombinant 2'-N-Deoxyribosyltransferase from *Lactobacillus Animalis*. *J. Biotechnol.* **2018**, *270*, 39–43.
- (87) de Oliveira, S. M.; Moreno-Perez, S.; Terrasan, C. R. F.; Romero-Fernández, M.; Vieira, M. F.; Guisan, J. M.; Rocha-Martin, J. Covalent Immobilization-Stabilization of β -1,4-Endoxylanases from *Trichoderma Reesei*: Production of Xylooligosaccharides. *Process Biochem.* **2018**, *64*, 170–176.
- (88) Asgher, M.; Noreen, S.; Bilal, M. Enhancing Catalytic Functionality of *Trametes*

- Versicolor IBL-04 Laccase by Immobilization on Chitosan Microspheres. *Chem. Eng. Res. Des.* **2017**, *119*, 1–11.
- (89) Kumari, A.; Kayastha, A. M. Immobilization of Soybean (Glycine Max) α -Amylase onto Chitosan and Amberlite MB-150 Beads: Optimization and Characterization. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2011**, *69* (1–2), 8–14.
- (90) Jia, F.; Narasimhan, B.; Mallapragada, S. Materials-Based Strategies for Multi-Enzyme Immobilization and Co-Localization: A Review. *Biotechnol. Bioeng.* **2014**, *111* (2), 209–222.
- (91) Toole, G.; Toole, S. *Essential A2 Biology for OCR*; Nelson Thornes, 2004.
- (92) Chern, C. S. Emulsion Polymerization Mechanisms and Kinetics. *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31* (5), 443–486.
- (93) Kawaguchi, S.; Ito, K. Dispersion Polymerization. *Adv. Polym. Sci.* **2005**, *175*, 299–328.
- (94) Ober, C. K. Dispersion Copolymerization in Non-aqueous Media. *Makromol. Chemie. Macromol. Symp.* **1990**, *35–36* (1), 87–104.
- (95) Takahashi, K.; Uyama, H.; Kobayashi, S. Preparation of Reactive Monodisperse Particles in the Micron Range by Dispersion Polymerization of Glycidyl Methacrylate. *Polymer Journal*. 1998, pp 684–686.
- (96) Gonçalves, M. C. P.; Kieckbusch, T. G.; Perna, R. F.; Fujimoto, J. T.; Morales, S. A. V.; Romanelli, J. P. Trends on Enzyme Immobilization Researches Based on Bibliometric Analysis. *Process Biochem.* **2019**, *76*, 95–110.
- (97) Fortes, C. C. S.; Luísa, A.; -Silva, D.-D.; Xavier, A. M. R. B.; Tavares, A. P. M. Optimization of Enzyme Immobilization on Functionalized Magnetic Nanoparticles for Laccase Biocatalytic Reactions. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* **2017**, *117*, 1–8.
- (98) Horák, D.; Karpíšek, M.; Turková, J.; Beneš, M. Hydrazide-Functionalized Poly(2-Hydroxyethyl Methacrylate) Microspheres for Immobilization of Horseradish Peroxidase. *Biotechnol. Prog.* **1999**, *15* (2), 208–215.
- (99) Bai, F.; Yang, X.; Li, R.; Huang, B.; Huang, W. Monodisperse Hydrophilic Polymer Microspheres Having Carboxylic Acid Groups Prepared by Distillation Precipitation Polymerization. *Polymer (Guildf)*. **2006**, *47* (16), 5775–5784.

- (100) Vecchiato, S.; Ahrens, J.; Pellis, A.; Scaini, D.; Mueller, B.; Herrero Acero, E.; Guebitz, G. M. Enzymatic Functionalization of HMLS-Polyethylene Terephthalate Fabrics Improves the Adhesion to Rubber. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2017**, acssuschemeng.7b00475.
- (101) Qin, L.; He, X. W.; Zhang, W.; Li, W. Y.; Zhang, Y. K. Surface-Modified Polystyrene Beads as Photografting Imprinted Polymer Matrix for Chromatographic Separation of Proteins. *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216 (5), 807–814.
- (102) Jolivalt, C.; Brenon, S.; Caminade, E.; Mougin, C.; Pontié, M. Immobilization of Laccase from *Trametes Versicolor* on a Modified PVDF Microfiltration Membrane: Characterization of the Grafted Support and Application in Removing a Phenylurea Pesticide in Wastewater. *J. Memb. Sci.* **2000**, 180 (1), 103–113.
- (103) Xu, S.; Peng, B.; Han, X. Hydrazide-Functionalized Hollow Porous Poly(2-Hydroxyethyl Methacrylate-Co-Ethylene Dimethacrylate) Spheres for Immobilization of Enzyme. *Eur. Polym. J.* **2006**, 42 (10), 2801–2806.
- (104) Mansor, A. F.; Mohidem, N. A.; Wan Mohd Zawawi, W. N. I.; Othman, N. S.; Endud, S.; Mat, H. The Optimization of Synthesis Conditions for Laccase Entrapment in Mesoporous Silica Microparticles by Response Surface Methodology. *Microporous Mesoporous Mater.* **2016**, 220, 308–314.
- (105) Imperiyka, M.; Ahmad, A.; Hanifah, S. a; Rahman, M. Y. a. Potential of UV-Curable Poly (Glycidyl Methacrylate-Co-Ethyl Methacrylate) - Based Solid Polymer Electrolyte For Lithium Ion Battery Application. *Int. J. Electrochem. Sci* **2013**, 8 (9), 10932–10945.
- (106) Fei, B. W. C.; Hanifah, S. A.; Ahmad, A.; Hassan, N. H. Polymer Electrolyte Based on Crosslinked Poly(Glycidyl Methacrylate) and 1-Butyl-3-Methylimidazolium Bis (Trifluoromethylsulfonyl)Imide. *AIP Conf. Proc.* **2015**, 1678, 1–7.
- (107) Mazlan, S. Z.; Rahim, F.; Abu Hanifah, S. Facile Synthesis of Magnetic Copolymer Microspheres Based on Poly(Glycidyl Methacrylate-Co- N - Isopropylacrylamide)/Fe₃O₄by Suspension Photopolymerization. *Int. J. Polym. Sci.* **2014**, 2014 (February 2016).
- (108) Radzir, N. N. M.; Anuar, F. H.; Hanifah, S. A.; Ahmad, A.; Hassan, N. H. An

- Investigation Ofpolymer Electrolyte Based on Poly (Glycidylmethacrylate) Doped with Imidazolium Ionic Liquid. *J. Mater. Environ. Sci* **2015**, 6 (5), 1436–1443.
- (109) Bezerra, M. A.; Santelli, R. E.; Oliveira, E. P.; Villar, L. S.; Escaleira, L. A. Response Surface Methodology (RSM) as a Tool for Optimization in Analytical Chemistry. *Talanta* **2008**, 76 (5), 965–977.
- (110) Doğan, T.; Bayram, E.; Uzun, L.; Şenel, S.; Denizli, A. Trametes Versicolor Laccase Immobilized Poly(Glycidyl Methacrylate) Based Cryogels for Phenol Degradation from Aqueous Media. *J. Appl. Polym. Sci.* **2015**, 132 (20), 1–9.
- (111) Vera, M.; Rivas, B. L. Immobilization of Trametes Versicolor Laccase on Different PGMA-Based Polymeric Microspheres Using Response Surface Methodology: Optimization of Conditions. *J. Appl. Polym. Sci.* **2017**, 134 (36).
- (112) Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. Improvement of Enzyme Activity, Stability and Selectivity via Immobilization Techniques. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, 40, 1451–1463.
- (113) Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. *Bioquímica*, 6ta Ed.; 2007.
- (114) Asgher, M.; Noreen, S.; Bilal, M. Enhancing Catalytic Functionality of Trametes Versicolor IBL-04 Laccase by Immobilization on Chitosan Microspheres. *Chem. Eng. Res. Des.* **2017**, 119, 1–11.
- (115) Pang, S.; Wu, Y.; Zhang, X.; Li, B.; Ouyang, J.; Ding, M. Immobilization of Laccase via Adsorption onto Bimodal Mesoporous Zr-MOF. *Process Biochem.* **2016**, 51 (2), 229–239.
- (116) Prasetyo, E. N.; Semlitsch, S.; Nyanhongo, G. S.; Lemmouchi, Y.; Guebitz, G. M. Laccase Functionalized Cellulose Acetate for the Removal of Toxic Combustion Products. *React. Funct. Polym.* **2015**, 97, 12–18.
- (117) Sun, H.; Huang, W.; Yang, H.; Zhang, S. Journal of Colloid and Interface Science Co-Immobilization of Laccase and Mediator through a Self-Initiated One-Pot Process for Enhanced Conversion of Malachite Green. **2016**, 471, 20–28.
- (118) Fortes, C. C. S.; Daniel-da-Silva, A. L.; Xavier, A. M. R. B.; Tavares, A. P. M. Optimization of Enzyme Immobilization on Functionalized Magnetic Nanoparticles for Laccase Biocatalytic Reactions. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* **2016**.

- (119) Ji, C.; Nguyen, L. N.; Hou, J.; Hai, F. I.; Chen, V. Direct Immobilization of Laccase on Titania Nanoparticles from Crude Enzyme Extracts of *P. Ostreatus* Culture for Micro-Pollutant Degradation. *Sep. Purif. Technol.* **2017**, *178*, 215–223.
- (120) Piontek, K.; Antorini, M.; Choinowski, T. Crystal Structure of a Laccase from the Fungus *Trametes Versicolor* at 1.90-?? Resolution Containing a Full Complement of Coppers. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (40), 37663–37669.
- (121) Pezzella, C.; Russo, M. E.; Marzocchella, A.; Salatino, P.; Sannia, G. Immobilization of a *Pleurotus Ostreatus* Laccase Mixture on Perlite and Its Application to Dye Decolourisation. *Biomed Res. Int.* **2014**, *2014*.
- (122) Ammann, E. M.; Gasser, C. A.; Hommes, G.; Corvini, P. F. X. Immobilization of Defined Laccase Combinations for Enhanced Oxidation of Phenolic Contaminants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98* (3), 1397–1406.
- (123) Naghdi, M.; Taheran, M.; Brar, S. K.; Kermanshahi-Pour, A.; Verma, M.; Surampalli, R. Y. Immobilized Laccase on Oxygen Functionalized Nanobiochars through Mineral Acids Treatment for Removal of Carbamazepine. *Sci. Total Environ.* **2017**, *584–585*, 393–401.
- (124) Zeng, S.; Qin, X.; Xia, L. Degradation of the Herbicide Isoproturon by Laccase-Mediator Systems. *Biochem. Eng. J.* **2017**, *119*, 92–100.
- (125) Gomaa, H. M.; Suffet, I. H.; Faust, S. D. Kinetics of Hydrolysis of Diazinon and Diazoxon. In *Decontamination of Pesticide Residues in the Environmental*; Springer New York: New York, NY, 1969; pp 171–190.
- (126) Chen, L.; Zou, M.; Hong, F. F. Evaluation of Fungal Laccase Immobilized on Natural Nanostructured Bacterial Cellulose. *Front. Microbiol.* **2015**, *6* (NOV), 1–10.
- (127) Zhang, D.; Deng, M.; Cao, H.; Zhang, S.; Zhao, H. Laccase Immobilized on Magnetic Nanoparticles by Dopamine Polymerization for 4-Chlorophenol Removal. *Green Energy Environ.* **2017**, *2* (4), 393–400.
- (128) Feng, Q.; Wei, Q.; Hou, D.; Bi, S.; Wei, A.; Xu, X. Preparation of Amidoxime Polyacrylonitrile Nanofibrous Membranes and Their Applications in Enzymatic Membrane Reactor. *J. Eng. Fiber. Fabr.* **2014**, *9* (2), 146.
- (129) Hamilton, D. J.; Ambrus, Á.; Dieterle, R. M.; Felsot, A. S.; Harris, C. A.; Holland,

- P. T.; Katayama, A.; Kurihara, N.; Linders, J.; Unsworth, J.; et al. *International Union of Pure and Applied Chemistry and the Environment Division Commission on Agrochemicals and the Environment* Regulatory Limits for Pesticide Residues in Water (IUPAC Technical Report)*; Japan, 2003; Vol. 75.
- (130) Ministerio de Salud. *Decreto Supremo No.594*.
- (131) Pinto, M. de C. E.; Gonçalves, R. G. L.; dos Santos, R. M. M.; Araújo, E. A.; Perotti, G. F.; Macedo, R. dos S.; Bizeto, M. A.; Constantino, V. R. L.; Pinto, F. G.; Tronto, J. Mesoporous Carbon Derived from a Biopolymer and a Clay: Preparation, Characterization and Application for an Organochlorine Pesticide Adsorption. *Microporous Mesoporous Mater.* **2016**, *225*, 342–354.
- (132) Dehghani, M. H.; Kamalian, S.; Shayeghi, M.; Yousefi, M.; Heidarinejad, Z.; Agarwal, S.; Gupta, V. K. High-Performance Removal of Diazinon Pesticide from Water Using Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Microchem. J.* **2019**, *145*, 486–491.
- (133) Lazarević-Pašti, T. D.; Bondžić, A. M.; Pašti, I. A.; Vasić, V. M. Indirect Electrochemical Oxidation of Organophosphorous Pesticides for Efficient Detection via Acetylcholinesterase Test. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2012**, *104* (3), 236–242.
- (134) Rodrigues, É. F.; Ficanha, A. M. M.; Dallago, R. M.; Treichel, H.; Reinehr, C. O.; Machado, T. P.; Nunes, G. B.; Colla, L. M. Production and Purification of Amylolytic Enzymes for Saccharification of Microalgal Biomass. *Bioresour. Technol.* **2017**, *225*, 134–141.
- (135) Frazão, C. J. R.; Silva, N. H. C.; Freire, C. S. R.; Silvestre, A. J. D.; Xavier, A. M. R. B.; Tavares, A. P. M. Bacterial Cellulose as Carrier for Immobilization of Laccase: Optimization and Characterization. *Eng. Life Sci.* **2014**, *14* (5), 500–508.
- (136) Prasetyo, E. N.; Semlitsch, S.; Nyanhongo, G. S.; Lemmouchi, Y.; Guebitz, G. M. Laccase Oxidation and Removal of Toxicants Released during Combustion Processes. *Chemosphere* **2016**, *144*, 652–660.
- (137) Fernández-Fernández, M.; Sanromán, M. Á.; Moldes, D. Recent Developments and Applications of Immobilized Laccase. *Biotechnol. Adv.* **2013**, *31* (8), 1808–1825.
- (138) Durán, N.; Rosa, M. A.; D'Annibale, A.; Gianfreda, L. Applications of Laccases

- and Tyrosinases (Phenoloxidasas) Immobilized on Different Supports: A Review. *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *31* (7), 907–931.
- (139) Gioia, L.; Rodríguez-Couto, S.; Menéndez, M. D. P.; Manta, C.; Ovsejevi, K. Reversible Covalent Immobilization of *Trametes Villosa* Laccase onto Thiolsulfinate-Agarose: An Insoluble Biocatalyst with Potential for Decoloring Recalcitrant Dyes. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2015**, *62* (4), 502–513.
- (140) Misra, N.; Kumar, V.; Goel, N. K.; Varshney, L. Laccase Immobilization on Radiation Synthesized Epoxy Functionalized Polyethersulfone Beads and Their Application for Degradation of Acid Dye. *Polym. (United Kingdom)* **2014**, *55* (23), 6017–6024.
- (141) Costa, S. A.; Tzanov, T.; Paar, A.; Gudelj, M.; G??bitz, G. M.; Cavaco-Paulo, A. Immobilization of Catalases from *Bacillus SF* on Alumina for the Treatment of Textile Bleaching Effluents. *Enzyme Microb. Technol.* **2001**, *28* (9–10), 815–819.
- (142) Taheran, M.; Naghdi, M.; Brar, S. K.; Knystautas, E. J.; Verma, M.; Surampalli, R. Y. Degradation of Chlortetracycline Using Immobilized Laccase on Polyacrylonitrile-Biochar Composite Nanofibrous Membrane. *Sci. Total Environ.* **2017**, *605*, 315–321.
- (143) Naghdi, M.; Taheran, M.; Brar, S. K.; Kermanshahi-Pour, A.; Verma, M.; Surampalli, R. Y. Immobilized Laccase on Oxygen Functionalized Nanobiochars through Mineral Acids Treatment for Removal of Carbamazepine. *Sci. Total Environ.* **2017**, *584585*, 393–401.
- (144) Wu, Y.; Jiang, Y.; Jiao, J.; Liu, M.; Hu, F.; Griffiths, B. S.; Li, H. Adsorption of *Trametes Versicolor* Laccase to Soil Iron and Aluminum Minerals: Enzyme Activity, Kinetics and Stability Studies. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2014**, *114*, 342–348.
- (145) Sampaio, L. M. P.; Padrão, J.; Faria, J.; Silva, J. P.; Silva, C. J.; Dourado, F.; Zille, A. Laccase Immobilization on Bacterial Nanocellulose Membranes: Antimicrobial, Kinetic and Stability Properties. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *145*, 1–12.
- (146) Ji, C.; Hou, J.; Wang, K.; Zhang, Y.; Chen, V. Biocatalytic Degradation of Carbamazepine with Immobilized Laccase-Mediator Membrane Hybrid Reactor. *J. Memb. Sci.* **2016**, *502*, 11–20.

- (147) Bagewadi, Z. K.; Mulla, S. I.; Ninnekar, H. Z. Purification and Immobilization of Laccase from *Trichoderma Harzianum* Strain HZN10 and Its Application in Dye Decolorization. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* **2017**, *15* (1), 139–150.
- (148) Agarwal, S.; Tyagi, I.; Gupta, V. K.; Dehghani, M. H.; Bagheri, A.; Yetilmezsoy, K.; Amrane, A.; Heibati, B.; Rodriguez-Couto, S. Degradation of Azinphos-Methyl and Chlorpyrifos from Aqueous Solutions by Ultrasound Treatment. *J. Mol. Liq.* **2016**, *221*, 1237–1242.
- (149) Ménager, M.; Pan, X.; Wong-Wah-Chung, P.; Sarakha, M. Photochemistry of the Pesticide Azinphos Methyl and Its Model Molecule 1,2,3-Benzotriazin-4(3H)-One in Aqueous Solutions: Kinetic and Analytical Studies. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2007**, *192* (1), 41–48.



9. Información suplementaria

Tabla S3.1. Valores de variables independientes generados tras evaluar las condiciones experimentales propuestas por el diseño de Box-Behnken (Fuente: Elaboración propia).

No. corrida	Variables independientes			Variable dependiente	
	A (h)	B (mg/L)	C	EI PGMA (%)	EI PGMA-NH ₂ (%)
1	1	0.2	4.25	67.9	21.4
2	24	0.2	4.25	32.1	12.0
3	1	20	4.25	58.4	34.6
4	24	20	4.25	34.5	18.2
5	1	10.1	3	73.2	33.8
6	24	10.1	3	22.8	15.6
7	1	10.1	5.5	61.3	34.2
8	24	10.1	5.5	43.7	6.5
9	12.5	0.2	3	8.3	28.6
10	12.5	20	3	14.8	45.1
11	12.5	0.2	5.5	16.7	18.4
12	12.5	20	5.5	59.1	71.5
13*	12.5	10.1	4.25	61.8	41.8
14*	12.5	10.1	4.25	63.7	39.1
15*	12.5	10.1	4.25	6.5	15.2

*Indica los tres puntos centrales del diseño de Box-Behnken

Tabla S3.2. Análisis de varianza para el modelo cuadrático de superficie respuesta para la inmovilización de la enzima TvL sobre las microesferas de PGMA (Fuente: Elaboración propia).

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Valor- <i>F</i>	Valor- <i>p</i>
*Modelo	5654.75	6	942.46	5.75	0.0136
*A: Tiempo	2096.28	1	2096.28	15.58	0.0109
B: Concentración de enzima	200.0	1	200.0	1.49	0.2772
C:pH	475.86	1	475.86	3.54	0.1188
AA	96.04	1	96.04	0.71	0.4368
AB	46.92	1	46.92	0.35	0.5805
AC	268.96	1	268.96	2.00	0.2165
*BB	1540.36	1	1540.36	11.45	0.0196
BC	322.20	1	322.20	2.39	0.1824
*CC	1311.96	1	1311.96	9.75	0.0262

*La fuente es significativa de acuerdo al valor-*p* ($p < 0.05$)

Tabla S3.3. Análisis de varianza para el modelo cuadrático de superficie respuesta para la inmovilización de la enzima TvL sobre las microesferas de PGMA-NH₂ (Fuente: Elaboración propia).

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Valor-F	Valor-p
*Modelo	3037.35	5	607.47	4.88	0.0219
*A: Tiempo	642.61	1	642.61	6.96	0.0461
*B: Concentración de la enzima	990.12	1	990.12	10.72	0.0221
C: pH	7.03	1	7.03	0.08	0.7936
*AA	1393.82	1	1393.82	15.09	0.0116
AB	12.25	1	12.25	0.13	0.7306
AC	22.56	1	22.56	0.24	0.6420
BB	4.10		4.10	0.04	0.8414
BC	334.89	1	334.89	3.63	0.1152
CC	0.023	1	0.023	0.00	0.9880

*La fuente es significativa de acuerdo al valor- p ($p < 0.05$)

Tabla S5.1. Valores de variables dependientes e independientes generados tras evaluar las condiciones experimentales propuestas por el diseño de Box-Behnken en la inmovilización de MtL (Fuente: Elaboración propia).

No. corrida	Variables independientes			Variables dependientes
	A	B (mol/L)	C (%)	Actividad relativa (%)
1	8	1.0	5.5	28.57
2	3	0.525	10.0	60
3	3	0.525	1.0	7.86
4	5.5	1.0	10.0	58.09
5	5.5	0.05	10.0	100
6	3	0.05	5.5	72.38
7	3	1.0	5.5	26.43
8	5.5	0.05	1.0	78.81
9	8	0.525	1.0	27.14
10	8	0.05	5.5	60
11	8	0.525	10.0	74.29
12	5.5	1.0	1.0	20
13*	5.5	0.525	5.5	45.95
14*	5.5	0.525	5.5	50.71
15*	5.5	0.525	5.5	43.57

* Indica los tres puntos centrales del diseño de Box-Behnken

Tabla S5.2. Análisis de varianza para el modelo cuadrático de superficie respuesta para la inmovilización de la enzima MtL sobre las microesferas de PGMA (Fuente: Elaboración propia).

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Valor- <i>F</i>	Valor- <i>p</i>
*Modelo	7128.57	3	2376.19	15.02	0.0003
A: pH	62.05	1	62.05	0.60	0.4719
*B: Molaridad del buffer	3964.95	1	3964.95	38.66	0.0016
*C: Concentración enzimática	3101.57	1	3101.57	30.24	0.0027
AA	428.41	1	428.41	4.18	0.0964
AB	52.71	1	52.71	0.51	0.5055
AC	3.92	1	3.92	0.04	0.8527
BB	436.54	1	436.54	4.26	0.0941
BC	71.40	1	71.40	0.70	0.4421
CC	161.24	1	161.24	1.57	0.2653

*La fuente es significativa de acuerdo al valor-*p* ($p < 0.05$)

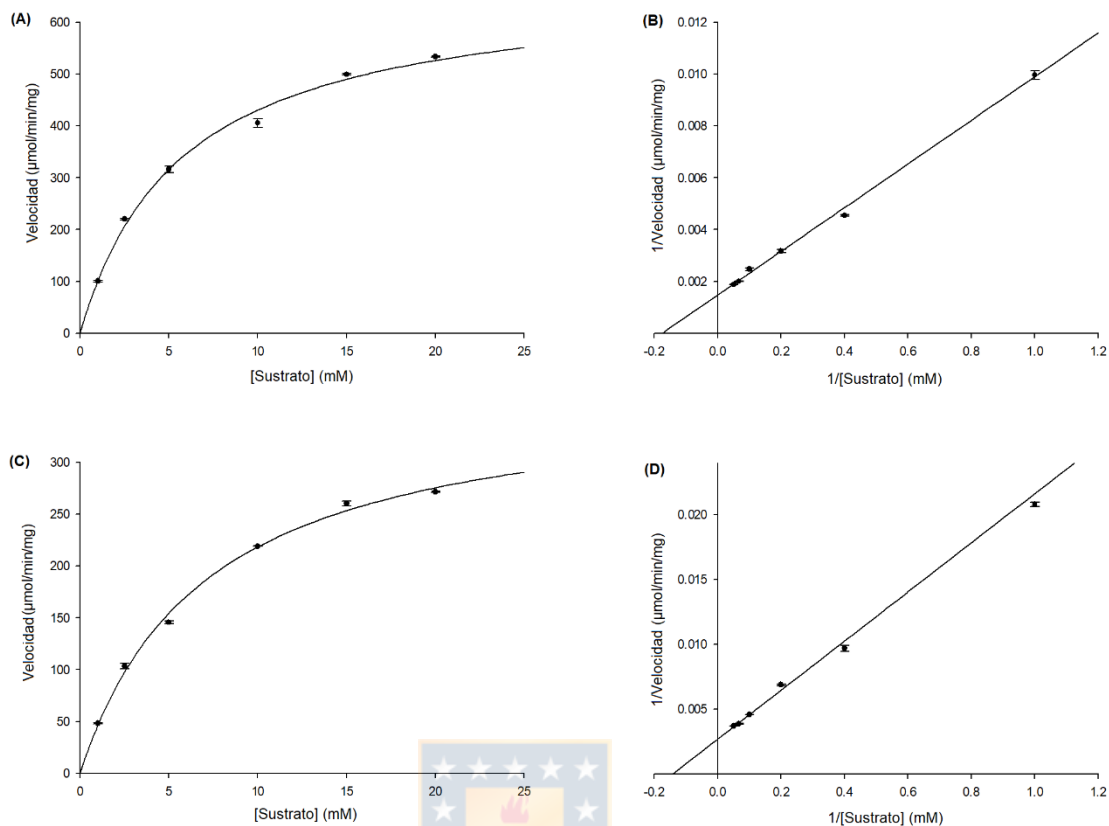


Fig. S5.1. Gráficas de Michaelis-Menten de la enzima MtL libre (A) e inmovilizada (C) en las cuales se varió la concentración de sustrato (ABTS) en el rango de 1.0 – 20.0 mM. Adicionalmente se muestran las gráficas de Lineweaver-Burk de la enzima MtL libre (B) e inmovilizada (D). Todas las medidas se realizaron por triplicado a 25 °C y se muestran con su respectiva desviación estándar (Adaptado de M. Vera, *et al.*⁴⁷).

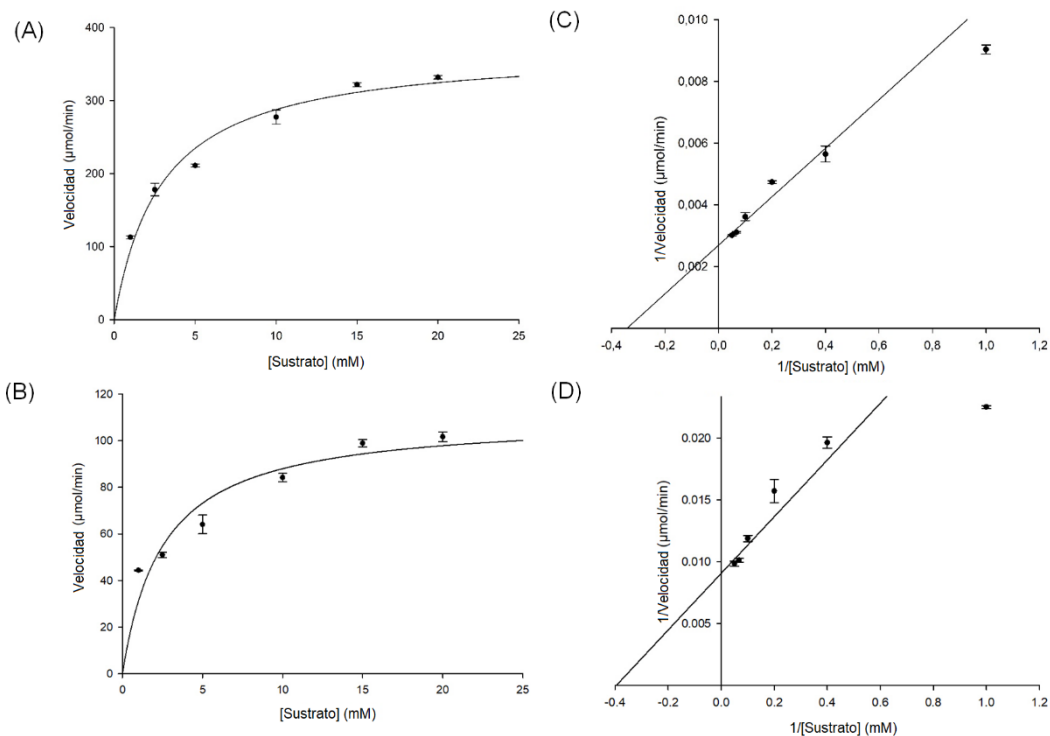


Fig. S5.2. Gráficas de Michaelis-Menten de la enzima TvL libre (A) e inmovilizada (C) en las cuales se varió la concentración de sustrato (ABTS) en el rango de 1.0 – 20.0 mM. Adicionalmente se muestran las gráficas de Lineweaver-Burk de la enzima TvL libre (B) e inmovilizada (D). Todas las medidas se realizaron por triplicado a 25 °C y se muestran con la desviación estándar (Fuente: Elaboración propia).

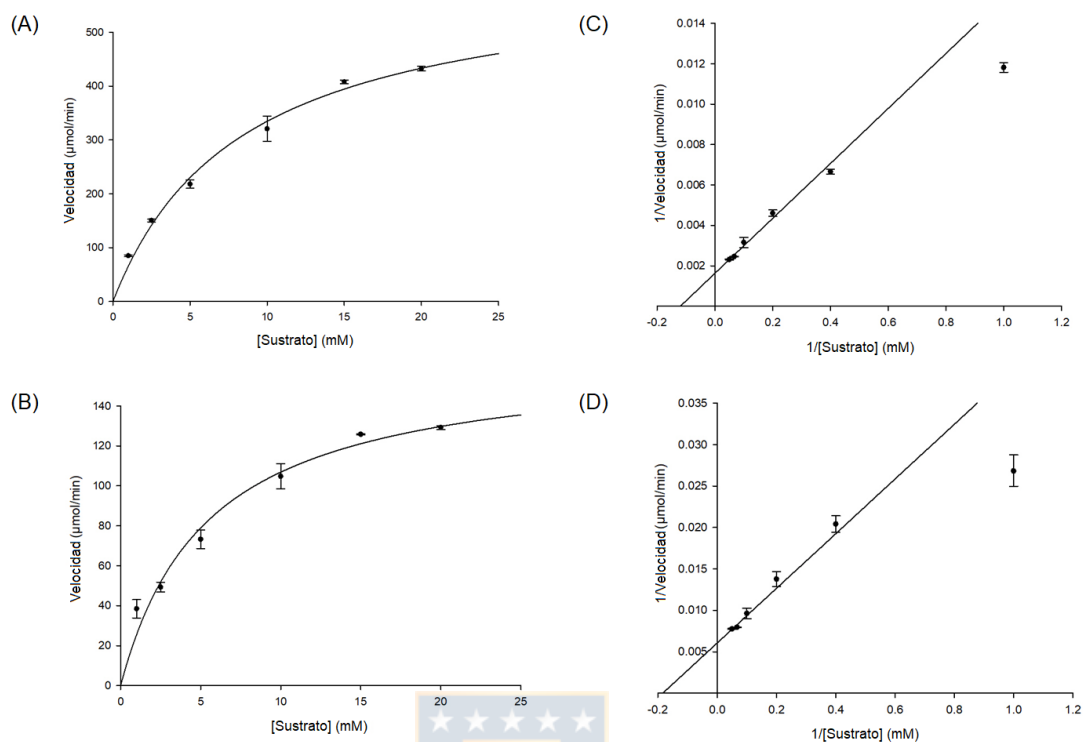


Fig. S5.3. Gráficas de Michaelis-Menten de la enzima ApL libre (A) e inmovilizada (C) en las cuales se varió la concentración de sustrato (ABTS) en el rango de 1.0 – 20.0 mM. Adicionalmente se muestran las gráficas de Lineweaver-Burk de la enzima ApL libre (B) e inmovilizada (D). Todas las medidas se realizaron por triplicado a 25 °C y se muestran con su respectiva desviación estándar (Fuente: Elaboración propia).