



Tesis Doctoral
Doctorado en Ciencia de Materiales

**DESARROLLO DE BIOCATALIZADORES
INMOVILIZADOS PARA EL TRATAMIENTO DE
EFLUENTES LÍQUIDOS INDUSTRIALES**

Ing. Diego Alberto Morales Urrea

Dirigido: Dr. Edgardo Martín Contreras

Co-dirigido: Dra. Patricia Mónica Haure

Febrero de 2020



RINFI se desarrolla en forma conjunta entre el INTEMA y la Biblioteca de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Mar del Plata.

Tiene como objetivo recopilar, organizar, gestionar, difundir y preservar documentos digitales en Ingeniería, Ciencia y Tecnología de Materiales y Ciencias Afines.

A través del Acceso Abierto, se pretende aumentar la visibilidad y el impacto de los resultados de la investigación, asumiendo las políticas y cumpliendo con los protocolos y estándares internacionales para la interoperabilidad entre repositorios



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



Tesis Doctoral
Doctorado en Ciencia de Materiales

**DESARROLLO DE BIOCATALIZADORES
INMOVILIZADOS PARA EL TRATAMIENTO DE
EFLUENTES LÍQUIDOS INDUSTRIALES**

Ing. Diego Alberto Morales Urrea

Dirigido: Dr. Edgardo Martín Contreras

Co-dirigido: Dra. Patricia Mónica Haure

Febrero de 2020

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mis agradecimientos a todas las personas que han sido importantes durante estos últimos cinco años. Sinceramente, cualquier texto que escriba se queda corto para agradecer a tantas personas que desinteresadamente me han extendido su mano.

En primer lugar quisiera agradecer a mi Director y Codirectora, los Dres. Edgardo Contreras y Patricia Haure por la confianza, paciencia y entrega que tuvieron durante toda mi formación doctoral. Pero por sobre todas las cosas, por la calidez humana mostrada hacia mi persona.

Agradezco a todos los miembros de la División de Catalizadores y Superficies en cabeza del Dr. Celso Aldao, por estar siempre atentos y dispuestos a colaborar en todo lo que necesité para desarrollar mi trabajo doctoral. A Naty y Carla que, sin duda, fueron a quienes más molesté haciendo preguntas. A Mica por soportarme como compañero de oficina, por su amistad y generosidad. A Jorge por brindarme su confianza y amistad. También agradezco mucho a Luli, Lauri, Nico, Fede, Pao, Alejandra, Fernando, Carmen, y Daniel. En general, a Todos Muchísimas Gracias. Valoro cada guía y sugerencia dada, pero aún más, su hospitalidad y bondad.

Agradezco muy especialmente al Dr. Pablo Caracciolo por darme la confianza para trabajar con él y por su disponibilidad y aporte desinteresado en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral. Muchas gracias por tanta generosidad y amabilidad.

A los Dres. María Eugenia Suárez y Julián Carrera por darme la posibilidad de trabajar y aprender con ellos en el Grupo GENOCOV de la Universidad Autónoma de Barcelona. También a todo el personal técnico y profesional que me apoyó durante mi estancia en GENOCOV. A la Red Triton-Cyted por financiar mi estancia doctoral en Barcelona. También le doy las gracias muy especiales a Carlos, Alejandra, Vicente, Gaby,

Chan, Nancy y Oscar, a quienes conocí durante mi estancia en Barcelona. Los recuerdo con mucho aprecio.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica, y a la Universidad Nacional de Mar del Plata por financiar y garantizar mi formación doctoral. Agradezco muy especialmente a todos los grandes profesionales que tuve como docente. Asimismo a los Dres. Alejandra Ayude, Ignacio Durruty y Norma Marcovich por ser miembros de la comisión de seguimiento del presente trabajo de investigación. De igual manera a los Dres. Analía Fernández y Noemí Zaritzky miembros del jurado evaluador de esta Tesis Doctoral. Valoro mucho cada aporte realizado para enriquecer la presente investigación.

A todo el personal administrativo, técnico y profesional del Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales (INTEMA).

A mis amados Padres, hermanos, mis sobrinos, mi tío Alfonso y a toda mi familia por apoyarme en todas mis decisiones. Muchas gracias por tanto amor y apoyo emocional. A todos mis grandes amigos en Colombia por sus buenos deseos y apoyarme siempre. A todos los amigos que me ha dejado esta estancia por Argentina. Nanchy, Norman, Nachito, Pelito, el Nahuel, Guishe, Giani, Lauri, Maguisica, Brenda, Mary, Karen, Pabli, Javier, Ramiro, Stefany, Jhon, Caro, Edgar y Mayra. Muchas gracias por tanto aprecio.

Quisiera agradecer muy especialmente a la Familia Clinckspoor Di Iorio por abrirme las puertas de su hogar. Estaré eternamente agradecido con todos ellos.

En general, muchas gracias a la Argentina por permitirme alcanzar una nueva meta académica y profesional, pero por sobre todo, por todos los seres maravillosos que llegaron a mi vida, de quienes aprendo y seguiré aprendiendo.

¡Gracias... Totales!

RESUMEN

Los efluentes líquidos industriales contienen cantidades diversas de compuestos fenólicos y de colorantes azo. En general, estos compuestos son potencialmente tóxicos y difíciles de degradar bajo condiciones naturales. Por tanto, su descarga a cuerpos receptores sin un tratamiento adecuado implica un impacto negativo sobre el ambiente y la salud en general. Recientemente, la catálisis enzimática es una alternativa ecoamigable para obtener altas tasas de remoción de compuestos xenobióticos en aguas residuales bajo condiciones predecibles en comparación con los tratamientos biológicos y químicos.

El diseño de biocatalizadores debe considerar especialmente la estabilidad y la factibilidad de recuperación de la enzima. Por consiguiente, la inmovilización de enzimas se ha convertido en una importante estrategia para el desarrollo de bioprocesos económicamente viables. Sin embargo, para escalar los procesos y desarrollar sistemas controlados, es importante conocer primero las características estequiométricas y cinéticas de las reacciones enzimáticas en fase homogénea, ya que las enzimas suelen ser sensibles a condiciones externas o la presencia de inhibidores, que pueden ser, incluso, sus mismos sustratos.

La presente Tesis Doctoral tuvo como objetivo general desarrollar biocatalizadores basados en la inmovilización de una enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) para el tratamiento de efluentes líquidos industriales con peróxido de hidrógeno.

En el Capítulo 3 se estudió el comportamiento catalítico de la enzima en fase homogénea en la oxidación del contaminante modelo orange II (OII), poniendo énfasis en las condiciones de reacción y posibilidad de reutilización de la enzima, determinando la cinética de degradación y las condiciones óptimas de la reacción. A partir de los resultados obtenidos se desarrolló una versión modificada del mecanismo Dunford de las peroxidases, que tuvo en

cuenta la inhibición de la enzima por altas concentraciones de peróxido de hidrógeno (P), la descomposición de P en agua y oxígeno, la generación de productos de oxidación (PO) y el efecto del pH sobre la cinética de decoloración del OII.

En el Capítulo 4 se estudió la degradación de los contaminantes modelo orange II, fenol y bisfenol A poniendo énfasis en la modalidad de suministro de peróxido de hidrógeno (Sistemas batch y fed-batch) y monitoreando la reacción mediante mediciones del potencial de oxidación-reducción (ORP) para detectar el punto final de la oxidación de los contaminantes estudiados. Los resultados obtenidos demostraron que el ORP puede ser útil para controlar la adición de peróxido de hidrógeno durante la oxidación de OII, fenol y BPA catalizada por HRP, minimizando el tiempo y los costos del proceso.

Una segunda etapa del trabajo de investigación consistió en el estudio de técnicas de inmovilización de la enzima por adsorción y unión covalente sobre dos tipos de materiales: membranas nanofibras de poliuretano y diatomitas. En el Capítulo 5 se desarrollaron biocatalizadores a base de HRP inmovilizada sobre nanofibras de poliuretano. La técnica de Caracciolo y col. (2017) fue adaptada con éxito para maximizar la carga de HRP inmovilizada mediante uniones covalente, funcionalizando y activando el material con hipoclorito de sodio y un activador epoxi a pH 8. Los resultados obtenidos demostraron que la inmovilización de la enzima se efectuaba tanto por adsorción (ME) como por unión covalente (MAE). La evaluación de los biocatalizadores demostraron que la actividad enzimática de ME y MAE fue mayor cuando la inmovilización se realizaba a 20 que a 40 °C. Asimismo, los resultados obtenidos demostraron que los biocatalizadores a base de membranas nanofibras de poliuretano fueron utilizados con éxito en dos ciclos de oxidación de OII durante un tiempo comprendido entre 4 y 10 h, dependiendo de las condiciones de inmovilización.

Finalmente, en el Capítulo 6 se desarrollaron biocatalizadores a base de HRP inmovilizada sobre diatomitas mediante adsorción (DE) y por uniones covalentes (DSGE,

DHSGE). El material de soporte y los biocatalizadores obtenidos fueron caracterizados por microscopía electrónica de barrido (SEM), difracción de rayos X (DRX), fluorescencia de rayos X (FRX), espectroscopía infrarroja por transformada de fourier de reflectancia difusa (DRIFT), microscopía electrónica de barrido y análisis de dispersión de rayos X (SEM/EDX) y análisis termogravimétrico (TGA). Los resultados obtenidos durante la inmovilización mostraron que DSGE tuvo mayores valores de carga enzimática inmovilizada en comparación con DE. Estos resultados fueron consistentes con los obtenidos durante la remoción de OII con P empleando los biocatalizadores a base de diatomitas. La técnica de inmovilización propuesta definió un protocolo exitoso para soportar enzimas estables al almacenamiento durante al menos un mes. Esto reduciría los costos operativos proyectados a la aplicación industrial de enzimas. Los resultados obtenidos representan un punto de inicio para la futura inmovilización de extractos de distintas enzimas con diversas aplicaciones industriales.

ABSTRACT

As a general rule, industrial wastewater usually contain varying amounts of phenolic compounds and azo dyes. In general, these compounds are potentially toxic and difficult to degrade under natural conditions. For this reason, their discharge to the environment without adequate treatments implies a negative impact on the environment and health. In recent years, enzymatic catalysis becomes an eco-friendly alternative in comparison with traditional biological and chemical treatments to obtain high removal rates of xenobiotics under predictable conditions.

The design of biocatalysts must especially consider their stability and feasibility of enzyme recovery. Consequently, enzyme immobilization has become an important strategy for the development of economically viable bioprocesses. However, to scale these processes and develop more controlled systems, it is important to know the stoichiometric and kinetic features of the enzymatic reactions in homogeneous phase. Consequently, the objective of this Doctoral Thesis was to develop biocatalysts based on the immobilization of a horseradish peroxidase (HRP) for the treatment of industrial liquid effluents with hydrogen peroxide.

Chapter 3 deals with the study of the catalytic behavior of the enzyme in the homogeneous phase during the oxidation of Orange II (OII), a model contaminant of industrial wastewaters. The study emphasize the reaction conditions and the possibility of reusing the enzyme, the degradation kinetics, and the experimental conditions to optimize the tested reaction. Based on the obtained results, a modified version of the Dunford mechanism of peroxidases was developed. The model took into account the inhibition of the enzyme by high concentrations of hydrogen peroxide (P), the decomposition of P in water

and oxygen, the generation of oxidation products (PO), and the effect of pH on the bleaching kinetics of OII.

In Chapter 4 the degradation of model contaminants Orange II, phenol, and bisphenol A was studied. In this Chapter, the mode of hydrogen peroxide supply (Batch and fed-batch systems) was studied. Also, an ORP based control strategy through measurements of oxidation-reduction potential (ORP) to detect the end point of the oxidation of the tested pollutants was developed. The obtained results demonstrate that ORP measurements can be useful for controlling the addition of hydrogen peroxide during the oxidation of OII, phenol and BPA catalyzed by HRP, minimizing the time and costs of the process.

The second stage of this research consisted in the study of enzyme immobilization techniques by adsorption and covalent bonding on two types of materials: nanofibrous polyurethane membranes and diatomites. In Chapter 5, biocatalysts based on HRP immobilized on polyurethane nanofibers were developed. The technique of Caracciolo et al. (2017) was successfully adapted to maximize the load of immobilized HRP through covalent bonds, functionalizing and activating the material with sodium hypochlorite and using an epoxy activator at pH 8. Obtained results showed that the immobilization of the enzyme was carried out both by adsorption (ME) and by covalent bonding (MAE). The evaluation of the biocatalysts showed that the enzymatic activity of ME and MAE was greater when immobilization was performed at 20 than at 40 °C. Likewise, the results showed that biocatalysts based on nanofibrous polyurethane membranes were successfully used in two cycles of OII oxidation for a time between 4 and 10 h, depending on the immobilization conditions.

Finally, Chapter 6 deals with the development of biocatalysts based on HRP immobilized on diatomites by adsorption (DE) and by covalent bonds (DSGE, DHSGE). The support material (diatomite) and the obtained biocatalysts (DE, DSGE, DHSGE) were characterized by scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (DRX), X-ray

fluorescence (FRX), infrared diffuse reflector fourier transform spectroscopy (DRIFT), electron microscopy scanning and X-ray scattering analysis (SEM / EDX) and thermogravimetric analysis (TGA). The results obtained during immobilization showed that DSGE had higher values of enzyme load compared to DE. These results were consistent with those obtained during the removal of OII with P using diatomite-based biocatalysts. The proposed immobilization technique defined a successful protocol to support stable enzymes in storage for at least one month. This would reduce the projected operational costs to the industrial application of enzymes. Results obtained in the present work represent a starting point for the future immobilization of extracts of different enzymes with industrial applications.

ÍNDICE

| | |
|---|------|
| AGRADECIMIENTOS | ii |
| RESUMEN | iv |
| ABSTRACT | vii |
| ÍNDICE | x |
| ÍNDICE DE TABLAS | xv |
| ÍNDICE DE FIGURAS | xvii |
| NOMENCLATURA | xxi |
| | |
| CAPÍTULO 1. Estado del Conocimiento | 1 |
| 1.1. EFLUENTES LÍQUIDOS INDUSTRIALES | 3 |
| 1.2. CATÁLISIS ENZIMÁTICA | 5 |
| 1.3. INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS | 9 |
| 1.4. DESARROLLO DE BIOCATALIZADORES INMOVILIZADOS PARA EL TRATAMIENTO DE EFLUENTES LÍQUIDOS INDUSTRIALES | 14 |
| Referencias..... | 16 |
| | |
| CAPÍTULO 2. Materiales y métodos generales | 23 |
| 2.1. MATERIALES | 25 |
| 2.2. MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS | 26 |
| 2.2.1. Concentración de orange II | 26 |
| 2.2.2. Concentración de fenoles totales (FT) | 27 |
| 2.2.3. Determinación de concentración de enzima..... | 28 |
| 2.2.4. Determinación de la enzima inmovilizada | 29 |
| 2.3. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES SOPORTES Y LOS BIOCATALIZADORES DESARROLLADOS | 30 |
| 2.3.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM) | 30 |
| 2.3.2. Difracción de rayos X (DRX) | 31 |
| 2.3.3. Fluorescencia de rayos X (FRX)..... | 32 |
| 2.3.4. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier de reflectancia difusa (DRIFT)..... | 32 |
| 2.3.5. Microscopía electrónica de barrido y análisis de dispersión de rayos X (SEM/EDX) | 33 |

| | |
|---|----|
| 2.3.6. Análisis termogravimétrico (TGA) | 33 |
| 2.3.7. Área BET | 34 |
| 2.4. CÁLCULOS..... | 34 |
| 2.4.1. Velocidad inicial de decoloración de orange II (OII) | 34 |
| 2.4.2. Porcentaje de conversión (R_s) | 37 |
| 2.4.3. Actividad peroxidasa relativa (AR) | 37 |
| Referencias..... | 38 |

| | |
|---|-----------|
| CAPÍTULO 3. Decoloración de orange II con peróxido de hidrógeno en presencia de una peroxidasa de rábano picante | 40 |
| 3.1. INTRODUCCIÓN | 42 |
| 3.2. MATERIALES Y MÉTODOS | 43 |
| 3.2.1. Reactivos..... | 43 |
| 3.2.2. Procedimiento experimental..... | 44 |
| 3.2.3. Mediciones y cálculos | 45 |
| 3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 46 |
| 3.3.1. Cambios en el espectro UV/Vis de la mezcla de reacción en función del tiempo ... | 46 |
| 3.3.2. Efecto del pH y de la concentración inicial de peróxido de hidrógeno en el grado de decoloración de orange II..... | 50 |
| 3.3.3. Efecto del pH y de la concentración inicial de oxidante, enzima y orange II sobre la velocidad de decoloración. | 52 |
| 3.3.4. Modelado de la cinética de decoloración. | 54 |
| 3.3.5. Obtención de los coeficientes del modelo propuesto | 59 |
| 3.3.6. Validación del modelo propuesto..... | 69 |
| 3.4. CONCLUSIONES | 71 |
| Referencias..... | 73 |

| | |
|---|-----------|
| CAPÍTULO 4. Monitoreo de la oxidación de compuestos xenobióticos con peróxido de hidrógeno en presencia de una peroxidasa de rábano picante mediante mediciones de ORP | 77 |
| 4.1. INTRODUCCIÓN | 79 |
| 4.2. MATERIALES Y MÉTODOS | 80 |
| 4.2.1. Reactivos..... | 80 |
| 4.2.2. Procedimientos..... | 81 |

| | |
|---|----|
| 4.2.3. Mediciones y cálculos | 82 |
| 4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 83 |
| 4.3.1. Espectros UV/Visible de los compuestos estudiados..... | 83 |
| 4.3.2. Cambios en el ORP durante la oxidación enzimática de orange II (OII)..... | 84 |
| 4.3.3. Comparación de la evolución del ORP durante la oxidación enzimática de diferentes sustratos reductores | 90 |
| 4.3.4. Oxidación de una mezcla binaria OII-BPA..... | 95 |
| 4.4. CONCLUSIONES | 98 |
| Referencias..... | 99 |

CAPÍTULO 5. Inmovilización de la enzima peroxidasa sobre membranas

| | |
|--|------------|
| nanofibrosas de poliuretano | 102 |
| 5.1. INTRODUCCIÓN | 104 |
| 5.2. MATERIALES Y MÉTODOS | 106 |
| 5.2.1. Reactivos..... | 106 |
| 5.2.2. Síntesis de las membranas nanofibrosas de poliuretano | 106 |
| 5.2.3 Remoción de orange II en presencia de biocatalizadores inmovilizados sobre membranas nanofibrosas..... | 110 |
| 5.2.4. Caracterización de las membranas (M, MA) y los biocatalizadores (ME, MAE) . | 112 |
| 5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 113 |
| 5.3.1. Caracterización de los materiales..... | 113 |
| 5.3.2. Optimización del procedimiento de inmovilización de la HRP..... | 119 |
| 5.3.2.1. Tiempo de inmovilización..... | 120 |
| 5.3.2.2. Efecto de la concentración de HRP en la mezcla de inmovilización. | 121 |
| 5.3.2.3. Efecto del tiempo de funcionalización..... | 122 |
| 5.3.2.4. Efecto de la temperatura de inmovilización..... | 123 |
| 5.3.3. Estudio de la decoloración de orange II empleando HRP inmovilizada sobre membranas de poliuretano | 125 |
| 5.3.3.1. Efecto de la temperatura de inmovilización sobre la actividad catalítica. | 129 |
| 5.3.3.2. Efecto del pH en la actividad catalítica de ME y MAE. | 133 |
| 5.3.3.3. Ensayos de reutilización de los biocatalizadores ME y MAE..... | 134 |
| 5.4. CONCLUSIONES | 137 |
| Referencias..... | 138 |

| | |
|--|------------|
| CAPÍTULO 6. Inmovilización de la enzima peroxidasa sobre diatomitas naturales .. | 141 |
| 6.1. INTRODUCCIÓN | 143 |
| 6.2. MATERIALES Y MÉTODOS | 144 |
| 6.2.1. Sustancias químicas y reactivos | 144 |
| 6.2.2. Procedimiento de inmovilización..... | 144 |
| 6.2.3. Determinación de proteína inmovilizada | 148 |
| 6.2.4. Caracterización de las diatomitas y de los biocatalizadores | 148 |
| 6.2.5. Evaluación de los biocatalizadores | 148 |
| 6.2.5.1. Ensayos de actividad catalítica..... | 148 |
| 6.2.5.2. Estudios de adsorción..... | 149 |
| 6.2.5.3. Ensayos en reactor tipo columna de flujo ascendente..... | 149 |
| 6.2.5.4. Estabilidad de los biocatalizadores. | 151 |
| 6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 151 |
| 6.3.1. Inmovilización de la enzima sobre diatomitas calcinadas | 151 |
| 6.3.1.1. Tiempo de inmovilización..... | 152 |
| 6.3.1.2. Concentración de enzima en la mezcla de inmovilización..... | 153 |
| 6.3.1.3. Efecto de la hidrólisis superficial del soporte sobre la carga enzimática. | 154 |
| 6.3.2. Caracterización de las diatomitas naturales y los biocatalizadores obtenidos | 156 |
| 6.3.2.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM). | 156 |
| 6.3.2.2. Área BET. | 158 |
| 6.3.2.3. Difracción de rayos X (DRX). | 162 |
| 6.3.2.4. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier de reflectancia difusa (DRIFT). | 163 |
| 6.3.2.5. Fluorescencia de rayos X (FRX)..... | 165 |
| 6.3.2.6. Microscopía electrónica de barrido y análisis de dispersión de rayos X (SEM/EDX). | 167 |
| 6.3.2.7. Análisis termogravimétrico (TGA). | 170 |
| 6.3.3. Evaluación de los biocatalizadores mediante la decoloración de OII | 172 |
| 6.3.3.1. Influencia de la concentración de DSGE. | 172 |
| 6.3.3.2. Comparación de la cinética de decoloración de OII empleando los biocatalizadores DE, DHSGE, y DSGE, en presencia y ausencia de peróxido (P). | 174 |
| 6.3.3.3. Ensayos de reutilización de los biocatalizadores. | 178 |

| | |
|--|------------|
| 6.3.3.4. Oxidación de orange II (OII) catalizada por las DSGE en un reactor tipo columna..... | 180 |
| 6.3.3.5. Estabilidad de la actividad catalítica durante el almacenamiento. | 182 |
| 6.4. CONCLUSIONES | 184 |
| Referencias..... | 186 |
| | |
| CAPÍTULO 7. Conclusiones finales | 193 |

APÉNDICES

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO 1. Estado del Conocimiento

| | |
|---|----|
| Tabla 1.1. Ventajas y desventajas de diferentes métodos de inmovilización de enzimas..... | 11 |
| Tabla 1.2. Principales ventajas de los materiales para la inmovilización de enzimas | 13 |

CAPÍTULO 2. Materiales y métodos generales

| | |
|--|----|
| Tabla 2.1. Lista de sustancias y reactivos utilizados en el presente trabajo de Tesis..... | 25 |
|--|----|

CAPÍTULO 3. Decoloración de orange II con peróxido de hidrógeno en presencia de una peroxidasa de rábano picante

| | |
|--|----|
| Tabla 3.1. Estructura y principales propiedades del orange II (OII)..... | 44 |
| Tabla 3.2. Resultados del ajuste de las ecs.(3.20), (3.22) y (3.26) a los datos de la Figura 3.3b..... | 64 |
| Tabla 3.3. Resultados del ajuste de la ec. (3.30) a los datos de la Figura 3.5. | 68 |

CAPÍTULO 4. Monitoreo de la oxidación de compuestos xenobióticos con peróxido de hidrógeno en presencia de una peroxidasa de rábano picante mediante mediciones de ORP

| | |
|---|----|
| Tabla 4.1. Resultados obtenidos en experimentos de oxidación tipo fed-batch..... | 89 |
| Tabla 4.2. Comparación entre los valores Y_S calculados en la oxidación enzimática de distintos sustratos reductores (S)..... | 93 |

CAPÍTULO 5. Inmovilización de la enzima peroxidasa sobre membranas nanofibrosas de poliuretano

| | |
|--|-----|
| Tabla 5.1. Valores de la media y el desvío estándar (SD) para $\text{Log}(d)$ calculados a partir del diámetro de las nanofibras de membranas electrohiladas con y sin tratamiento de activación, y con la HRP inmovilizada y 3 usos en la decoloración de OII con P. | 116 |
| Tabla 5.2. Velocidades iniciales de decoloración de OII (V_{D0}) con P en presencia de uno o dos segmentos de MAE, con y sin lavado con NaCl..... | 119 |
| Tabla 5.3. Efecto de la concentración de enzima en la mezcla de inmovilización sobre los valores de carga específica enzimática (Q) | 122 |

| | |
|---|-----|
| Tabla 5.4. Efecto del tiempo de funcionalización (t_f) de grupos uretano sobre los valores de carga específica de la membrana (Q) | 123 |
| Tabla 5.5. Reutilización de los biocatalizadores inmovilizados en ensayos de oxidación de OII en presencia de peróxido de hidrógeno | 135 |

CAPÍTULO 6. Inmovilización de la enzima peroxidasa sobre diatomitas naturales

| | |
|--|-----|
| Tabla 6.1. Área de superficie BET, volumen y ancho de poro para las muestras de diatomita calcinada (D) y activada (DSG) y con la HRP inmovilizada (DE, DSGE, DHSGE).. | 161 |
| Tabla 6.2. Composición química (% en masa) determinada por FRX del material soporte (D), los diferentes biocatalizadores desarrollados (DE, DSGE, DHSGE) y la enzima sola (HRP)..... | 167 |
| Tabla 6.3. Composición química (% masa) determinados por EDX de la diatomita antes y después de la modificación superficial y la inmovilización de HRP. | 168 |
| Tabla 6.4. Mapas de la distribución de los elementos Si, Fe y Ca para D, DSG y DSGE... | 169 |
| Tabla 6.5. Propiedades térmicas de la diatomita con y sin modificación superficial, y de los biocatalizadores estudiados | 172 |
| Tabla 6.6. Remoción del colorante (R_C , %) en función de la reutilización de los biocatalizadores DE, DSGE y DHSGE en presencia y en ausencia de P. | 179 |
| Tabla 6.7. Actividad peroxidasa (AP) de los sobrenadantes de reacción..... | 180 |
| Tabla 6.8. Porcentaje de remoción del colorante (R_C) en función del tiempo de almacenamiento (t_a) de los biocatalizadores estudiados | 183 |

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1. Estado del Conocimiento

| | |
|--|----|
| Figura 1.1. Clasificación de biocatalizadores de acuerdo al tipo de reacciones que catalizan | 6 |
| Figura 1.2. Principales métodos de inmovilización de enzimas..... | 10 |
| Figura 1.3. Clasificación de los materiales de inmovilización de enzimas..... | 12 |
| Figura 1.4. Representación esquemática del trabajo experimental de la Tesis Doctoral | 15 |

CAPÍTULO 2. Materiales y métodos generales

| | |
|---|----|
| Figura 2.1. Ejemplo de curva de calibración para la determinación de la concentración de OII. | 26 |
| Figura 2.2. Espectro UV/Visible del OII en función del pH. | 27 |
| Figura 2.3. Ejemplos de las curvas de calibración para la determinación de la concentración de fenol y bisfenol A. | 28 |
| Figura 2.4. Curva de calibración para la determinación de la concentración proteína por el método de Bradford. | 29 |
| Figura 2.5. Ejemplo de la medición del diámetro de las nanofibras de poliuretano electrohilado. | 31 |
| Figura 2.6. Ejemplo de decoloración inicial de OII. | 35 |
| Figura 2.7. Ejemplo de curva completa de decoloración de OII. | 36 |

CAPÍTULO 3. Decoloración de orange II con peróxido de hidrógeno en presencia de una peroxidasa de rábano picante

| | |
|---|----|
| Figura 3.1. Espectro UV/Vis correspondiente a orange II (OII), enzima (HRP) y peróxido de hidrógeno (P) a pH 7. | 47 |
| Figura 3.2. Cambios del espectro UV/Vis durante un experimento típico de decoloración de OII, y de la absorbancia a 485 nm en función del tiempo. | 49 |
| Figura 3.3. Ejemplos de reacciones de decoloración de OII para diferentes concentraciones iniciales de peróxido de hidrógeno. | 51 |
| Figura 3.4. Efecto de la concentración inicial de peróxido de hidrógeno y colorante sobre la velocidad específica inicial de decoloración (q_0) para diferentes valores de pH. | 53 |
| Figura 3.5. Efecto del pH en la velocidad inicial específica máxima de decoloración. | 54 |

| | |
|---|----|
| Figura 3.6. Coeficiente estequiométrico observable en función de la concentración inicial de peróxido de hidrógeno | 65 |
| Figura 3.7. Error relativo medio de q_0 en función del pH. | 69 |
| Figura 3.8. Absorbancia a 485 nm en función del tiempo durante adiciones repetidas de orange II y peróxido de hidrógeno. | 71 |

CAPÍTULO 4. Monitoreo de la oxidación de compuestos xenobióticos con peróxido de hidrógeno en presencia de una peroxidasa de rábano picante mediante mediciones de ORP

| | |
|---|----|
| Figura 4.1. Montaje experimental de la oxidación enzimática de xenobióticos mediante sistema fed-batch. | 81 |
| Figura 4.2. Coeficiente de extinción molar (ϵ) a pH 8 en buffer fosfato en función de la longitud de onda (λ) para Orange II (OII), bisfenol A (BPA), fenol, peróxido de hidrógeno y HRP. | 84 |
| Figura 4.3. Ejemplo de reacción de decoloración de OII con peróxido de hidrógeno en presencia de HRP a pH 9. | 86 |
| Figura 4.4. Cambios en la absorbancia a 485 nm y ORP durante la decoloración de OII con adiciones continuas de peróxido de hidrógeno. | 88 |
| Figura 4.5. Cambios de absorbancia, carbono orgánico disuelto (COD), fenoles totales y ORP en función del tiempo normalizado durante la oxidación de OII, fenol y BPA mediante la adición continua de peróxido de hidrógeno en presencia de HRP. | 91 |
| Figura 4.6. Cambio en el espectro UV/Vis durante la oxidación de OII, fenol, y BPA. | 92 |
| Figura 4.7. Oxidación enzimática de fenol y BPA. | 94 |
| Figura 4.8. Oxidación de mezcla binaria de OII y BPA por adiciones continuas de peróxido de hidrógeno a 0.20 mL/min. | 96 |

CAPÍTULO 5. Inmovilización de la enzima peroxidasa sobre membranas nanofibrosas de poliuretano

| | |
|---|-----|
| Figura 5.1. Inmovilización covalente de HRP sobre membranas de poliuretano. | 108 |
| Figura 5.2. Representación esquemática de las variables estudiadas en el procedimiento de inmovilización covalente de HRP sobre nanofibras de poliuretano electrohiladas. | 109 |
| Figura 5.3. Remoción de Orange II (OII) con y sin peróxido de hidrógeno (P) en presencia de membranas nanofibrosas de poliuretano sin (M o MA), y con (ME o MAE) la enzima inmovilizada. | 111 |

| | |
|--|-----|
| Figura 5.4. Membrana electrohilada de poliuretano. | 113 |
| Figura 5.5. Micrografías SEM de membranas nanofibrosas. | 115 |
| Figura 5.6. Verificación cualitativa de la inmovilización de HRP sobre la membrana de poliuretano. | 117 |
| Figura 5.7. Efecto del NaCl sobre la actividad peroxidasa en fase homogénea..... | 118 |
| Figura 5.8. Cambio de la carga específica de enzima (Q) en función del tiempo de inmovilización..... | 121 |
| Figura 5.9. Efecto de la temperatura de inmovilización en la carga enzimática específica (Q) de membranas obtenidas por adsorción o unión covalente | 124 |
| Figura 5.10. Decoloración de OII en presencia de M, ME, MA y MAE con y sin peróxido de hidrógeno | 217 |
| Figura 5.11. Espectros UV/Visible durante experimentos de decoloración de OII en presencia de peróxido de hidrógeno empleando M, ME, MA, y MAE..... | 129 |
| Figura 5.12. Decoloración de OII con P en presencia de MAE y ME sintetizados a 20°C y 40 °C..... | 130 |
| Figura 5.13. Efecto de la temperatura de inmovilización en la velocidad específica inicial de decoloración de OII (V_{eD0}) de las ME y MAE | 131 |
| Figura 5.14. Efecto del tiempo de incubación a 40°C en la actividad peroxidasa relativa .. | 132 |
| Figura 5.15. Efecto del pH en la velocidad inicial específica de decoloración de OII catalizada por ME y MAE..... | 133 |

CAPÍTULO 6. Inmovilización de la enzima peroxidasa sobre diatomitas naturales

| | |
|--|-----|
| Figura 6.1. Procedimiento de inmovilización covalente de HRP sobre diatomitas. | 145 |
| Figura 6.2. Mecanismo de silanización con APTES de materiales a base de sílice..... | 145 |
| Figura 6.3. Mecanismos de activación e inmovilización de enzimas sobre materiales activados con glutaraldehído..... | 146 |
| Figura 6.4. Esquema del reactor tipo columna de flujo ascendente empleado en los estudios de oxidación de Orange II con peróxido de hidrógeno catalizada por DSGE..... | 150 |
| Figura 6.5. Diatomitas calcinadas (D), soporte para la inmovilización de la enzima HRP. | 152 |
| Figura 6.6. Carga enzimática específica (Q) en función del tiempo de inmovilización. | 153 |
| Figura 6.7. Efecto de la concentración de enzima en la mezcla de inmovilización sobre los valores de Q. | 154 |

| | |
|---|-----|
| Figura 6.8. Carga enzimática (Q) correspondiente a los biocatalizadores obtenidos mediante diferentes técnicas de inmovilización | 156 |
| Figura 6.9. Micrografías SEM de las frústulas identificadas en las muestras de diatomitas calcinadas (D), funcionalizada (DSG) y con la enzima inmovilizada (DSGE). | 157 |
| Figura 6.10. Micrografías SEM de las diatomitas calcinadas (D), activadas (DSG) y con la enzima inmovilizada (DSGE)..... | 158 |
| Figura 6.11. Isotermas de adsorción-desorción de N ₂ para D, DE, DSG, DSGE, DHSGE. | 160 |
| Figura 6.12. Distribución de diámetro de poro para D, DE, DSG, DSGE y DHSGE..... | 161 |
| Figura 6.13. Difractogramas DRX correspondientes a D, DE, DSGE, y DHSGE. | 162 |
| Figura 6.14. Espectros de absorbancia IR (DRIFT) de la diatomita calcinada (D), tratada con glutaraldehído (DG), silanizada con APTES (DS) y activada con glutaraldehído (DSG). | 164 |
| Figura 6.15. Espectros de absorbancia IR (DRIFT) de la HRP, D, DE, DSGE y DHSGE.. | 165 |
| Figura 6.16. Masa residual y derivada de la masa residual (%) como función de la temperatura para HRP, D, DSG, DE, DSGE y DHSGE. | 171 |
| Figura 6.17. Ejemplo del cambio del espectro UV/visible y de perfiles de decoloración de OII con P en presencia de distintas concentraciones de DSGE..... | 173 |
| Figura 6.18. Ejemplos del cambio del espectro UV/Visible durante la decoloración de OII con y sin P en presencia de D, DE, DSGE y DHSGE..... | 175 |
| Figura 6.19. Remoción de OII (R _C) con y sin P en presencia de D, DE, DSGE y DHSGE. | 176 |
| Figura 6.20. Remoción de OII mediante una columna rellena con DSGE. | 181 |
| Figura 6.21. Ejemplos del cambio del espectro UV/Visible durante experimentos de decoloración de OII en presencia de DSGE almacenado en seco y en solución..... | 184 |

NOMENCLATURA

| | |
|-----------------|--|
| A | Absorbancia |
| AP | Actividad peroxidasa |
| AP _r | Actividad peroxidasa relativa |
| BPA | Bisfenol A |
| C | Concentración |
| COD | Carbono orgánico disuelto |
| D | Diatomita calcinada |
| DE | Biocatalizador inmovilizado por adsorción sobre diatomita calcinada |
| DG | Diatomita calcinada tratada con glutaraldehído |
| DHSGE | Biocatalizador inmovilizado por unión covalente sobre diatomita calcinada con pretratamiento ácido |
| DS | Diatomita calcinada tratada con silano APTES |
| DSG | Diatomita calcinada tratada con silano APTES y glutaraldehído |
| DSGE | Biocatalizador inmovilizado por unión covalente sobre diatomita calcinada |
| F | Fenol |
| FT | Fenoles totales |
| HRP | Enzima peroxidasa de rábano picante comercial |
| M | Membrana nanofibrosa de poliuretano |
| MA | Membrana nanofibrosa de poliuretano tratada con NaClO y alil glicidil éter |
| MAE | Biocatalizador inmovilizado por unión covalente sobre membrana nanofibrosa de poliuretano |
| ME | Biocatalizador inmovilizado por adsorción sobre membrana nanofibrosa de poliuretano |
| OII | Orange II |
| ORP | Potencial de oxidorreducción |
| P | Peróxido de hidrógeno |

| | |
|------------------|---|
| Q | Carga de enzima soportada |
| Q_{in} | Caudal de entrada de peróxido de hidrógeno |
| q_o | Velocidad específica de decoloración de orange II |
| R_C | Remoción del colorante |
| S | Sustrato reductor |
| t_c | Tiempo crítico |
| t_f | Tiempo de funcionalización |
| u.a (A) | Unidades de absorbancia |
| u.a (Intensidad) | Unidades arbitrarias |
| V_{eD0} | Velocidad específica inicial de decoloración de orange II |
| V_{oD} | Velocidad inicial de decoloración de orange II |
| $Y_{P/S}$ | Coefficiente estequiométrico observable |

Capítulo 1

Estado del conocimiento

1.1. EFLUENTES LÍQUIDOS INDUSTRIALES

El agua es un recurso natural primordial para la vida y el desarrollo social y económico de los seres humanos. Según la Organización de las Naciones Unidas, el uso de agua se divide entre usos agrícolas (70%), domésticos (10%) e industriales (20%). No obstante, solo el 1% del agua del planeta tierra se encuentra disponible y apta para su uso cotidiano. De allí que la protección y conservación de este recurso requiere una atención especial.

Los efluentes líquidos industriales son aguas resultantes de procesos de la industria, los cuales presentan características diversas debido a la variabilidad de los procesos llevados a cabo (industria química, petroquímica, farmacéutica, papel, textil, entre otras). Estas aguas pueden contener productos orgánicos tales como pesticidas, solventes, colorantes, etc., algunos recalcitrantes o refractarios, los cuales representan un riesgo para los humanos y el ambiente (W. Wang y col., 2010). Por tanto, se ha incrementado el interés por el desarrollo de tecnologías para su tratamiento.

El tratamiento de efluentes líquidos industriales involucra una serie de procesos físicos, químicos y/o biológicos que buscan transformar las propiedades de las aguas residuales para hacerlas seguras al medio receptor. Estos sistemas pueden clasificarse como no destructivos y destructivos (Pérez, 2012). Los métodos no destructivos involucran tratamientos como coagulación-floculación (Lau y col., 2014), adsorción (Caliskan y col., 2011) y el empleo de membranas (Mo y col., 2008). La principal desventaja de estos tratamientos es que transfieren los contaminantes a otros medios, por lo que requieren procesos adicionales que eliminen o recuperen el contaminante. Los métodos destructivos incluyen procesos de transformación química o biológica tales como oxidación química (L. I. Doumic y col., 2013), reducción catalítica (Calvo y col., 2006), y degradación biológica (Ferro Orozco y col., 2013), entre otros. Los tratamientos químicos modifican las

propiedades de los contaminantes para facilitar su eliminación de las aguas residuales o para descomponerlos dentro del flujo de residuos (Doumic, 2015). Son procesos muy eficientes pero sus limitaciones se asocian a los costos operativos debido a que muchos de estos procesos se llevan a cabo en condiciones severas (Levec y Pintar, 2007).

Una alternativa eficiente de eliminación de contaminantes recalcitrantes desarrollada bajo condiciones moderadas de presión y temperatura, son los procesos de oxidación avanzada (POAs). Estos se basan en la generación in situ de radicales hidroxilo, aprovechando su elevado potencial de oxidación (Di Luca, 2015). Los POAs pueden ser clasificados de acuerdo a las fases reaccionantes (homogéneos o heterogéneos) y según el método utilizado para la generación de radicales hidroxilo (Fenton, photo-Fenton, oxidación húmeda, ozonización, fotocátalisis). La principal desventaja de los POAs se debe al hecho de que se utilizan reactivos costosos y que pueden generar residuos químicos peligrosos (Forgacs y col., 2004).

Los tratamientos biológicos son procesos que engloban todas las tecnologías que utilizan seres vivos (principalmente bacterias) para la depuración de las aguas residuales (Pérez, 2012). Éstos son atractivos debido a su bajo costo de aplicación y operación, y que además pueden degradar parcial o totalmente los productos iniciales (López, 2005). Sin embargo, el mayor inconveniente del uso de microorganismos está relacionado con que el proceso de eliminación del contaminante puede llevar más tiempo en relación a los procesos fisicoquímicos. Además, en términos generales los procesos biológicos son menos predecibles que los métodos fisicoquímicos. En contraste, la catálisis enzimática es una alternativa eco amigable para obtener altas tasas de remoción de un compuesto específico en condiciones predecibles. Adicionalmente, la degradación enzimática es preferida en los casos en el que el compuesto objetivo inhibe el crecimiento microbiano (Ali y col., 2013).

1.2. CATÁLISIS ENZIMÁTICA

Por definición, los catalizadores son compuestos que aceleran la velocidad de reacción debido a que reducen la barrera de energía necesaria para que éstas ocurran. Las reacciones bioquímicas llevadas a cabo en las células de todos los organismos están catalizadas por enzimas, las cuales son catalizadores de naturaleza proteica, aunque también pueden ser ácidos ribonucleicos o ribonucleoproteínas (Frey y Hegeman, 2007). La Figura 1.1 muestra la clasificación de las enzimas según la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (Illanes, 2008; Gotor Fernández y Hernáiz Gómez-Dégano, 2017).

La catálisis enzimática se enfoca en el estudio de la química y la dinámica de los contactos directos entre un sustrato y el sitio activo de una enzima. El sitio activo es una zona de la superficie de la enzima en forma de hueco a la que se accede por túneles, canales o *pockets* (Lodeiro, 2016). En su interior se encuentran los aminoácidos de unión, que permiten la unión del sustrato y la enzima, y aminoácidos catalíticos, que favorecen el desarrollo de la reacción enzimática (Illanes, 2008; Lodeiro, 2016). Estas interacciones son las que determinan la especificidad de la enzima, es decir, su capacidad para catalizar reacciones determinadas de uno o un grupo de sustratos. La especificidad de las enzimas es una propiedad muy importante que las hace apreciadas en diferentes sectores de industria, tales como el farmacéutico y de alimento, entre otros (Illanes, 2008; Gotor Fernández y Hernáiz Gómez-Dégano, 2017).

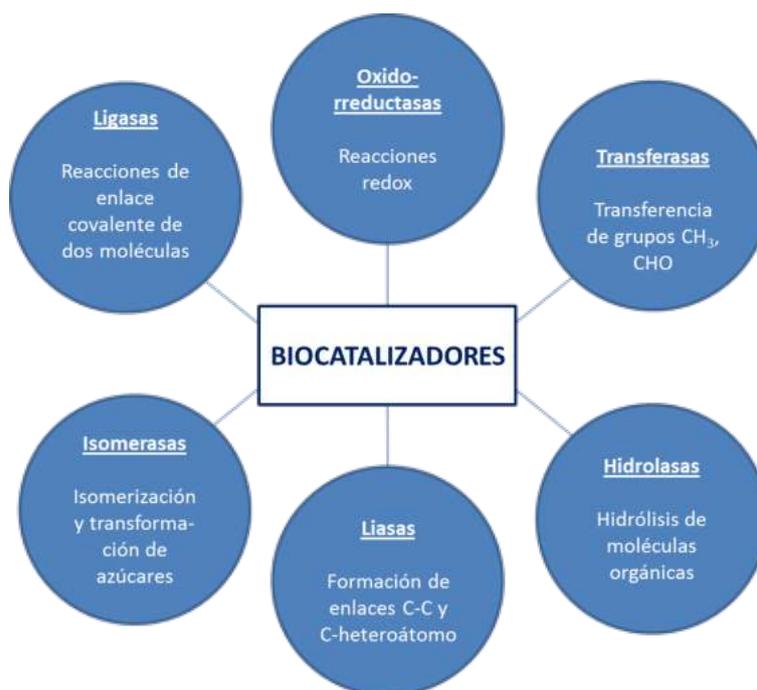


Figura 1.1. Clasificación de biocatalizadores de acuerdo al tipo de reacciones que catalizan (Adaptado de Illanes, 2008 y Gotor Fernández y Hernáiz Gómez-Dégano, 2017)

Las peroxidasas son oxidorreductasas que utilizan peróxidos (de hidrógeno u orgánicos) como oxidantes. Las peroxidasas son enzimas muy comunes en las plantas (savia de la higuera, raíces de rábano picante, etc.) y animales (Courteix y Bergel, 1995). Recientemente, el uso de peroxidasas o sus sistemas biomiméticos (por ejemplo, hematina) han tenido un gran interés debido a su eco-sostenibilidad y amplia variedad de actividades bioquímicas para oxidar diversos xenobióticos (Franciscon y col., 2010; Ali y col., 2013; Chiong y col., 2016; Sahare y col., 2016; Cabrera y col., 2017).

Dentro de las peroxidasas más estudiadas se encuentra la peroxidasa de rábano picante (HRP). Existen al menos siete isoenzimas de la HRP, de las cuales la más abundante es la HRP-C (Veitch, 2004). El sitio catalítico de la HRP contiene un grupo hemo y dos átomos de calcio (Hiner y col., 1996; Veitch, 2004; Malvi y col., 2012). Esta enzima es de

gran disponibilidad y presenta estabilidad en un amplio rango de pH y temperatura, además conserva su actividad catalítica a amplias concentraciones de sustratos y salinidad, haciéndola muy atractiva para el tratamiento de efluentes industriales (J. Nicell y col., 1993; Karam y Nicell, 1997). Por ejemplo, las HRP pueden catalizar la reacción de oxidación de diversos compuestos fenólicos y sus derivados, aminas no aromáticas e indoles, etc., produciendo radicales orgánicos, los cuales pueden posteriormente polimerizar para formar productos insolubles (J. A. Nicell y Wright, 1997; Zdarta y col., 2018a).

El conocimiento de la cinética enzimática es fundamental en el empleo de biocatalizadores para la remoción de contaminantes. En particular, en la literatura se pueden encontrar diferentes modelos matemáticos relacionados con el efecto del peróxido de hidrógeno, sustrato orgánico, pH y otros sobre la actividad de las peroxidasas (Gómez y col., 2008; Ali y col., 2013; Kalsoom y col., 2013). Sin embargo, todos estos modelos son modificaciones del mecanismo propuesto por Dunford (Dunford y Stillman, 1976). De acuerdo al mecanismo de Dunford de las peroxidasas, el primer paso del ciclo catalítico es la reacción entre el peróxido de hidrógeno (P) y el estado de reposo de la enzima (E_0) para formar el compuesto I (E_1) (1.R1), que es una especie dos equivalentes más reducida que E_0 . En presencia de un sustrato reductor (S) se producen dos pasos secuenciales de reducción de E_1 a un electrón por vez. En la primera etapa, un electrón del sustrato reduce E_1 para formar el llamado compuesto II (E_2) (1.R2). Finalmente, en el segundo paso ocurre la reducción que devuelve E_2 a E_0 (1.R3). Además, durante cada paso se produce una especie radical (S^*) debido a la oxidación del sustrato reductor (S). La presencia de estos radicales origina en algunos casos una mezcla compleja de productos, en donde se incluyen dímeros, trímeros y oligómeros (Gómez y col., 2008). Además, el oxígeno disuelto puede reaccionar con estos radicales para dar otros productos de oxidación secundaria (Chahbane y col., 2007).



La especie E_2 puede reaccionar con el exceso de peróxido de hidrógeno (P) para producir una forma inactiva de la enzima (E_3), que puede descomponerse espontáneamente en la forma nativa (E_0) (1.R4). Esta forma inactiva de la enzima es la responsable de la disminución de la velocidad de reacción a altas concentraciones de peróxido de hidrógeno. Además, la descomposición de E_3 a E_0 está asociada con la actividad catalásica de las peroxidasas, es decir, la transformación de peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua (Jakopitsch y col., 2005). Una diferencia esencial entre la actividad catalásica de las catalasas y de las peroxidasas es que esta última depende de la presencia de un sustrato reductor (S). Sin embargo, diversos autores informan que incluso en ausencia de S se puede observar una cierta actividad catalásica de las peroxidasas. Esta actividad catalásica residual se debe a la presencia de impurezas que pueden estar presentes en la preparación enzimática. Algunos autores proponen que incluso la cadena polipeptídica de la propia enzima podría actuar como sustrato reductor, inactivando la enzima de forma irreversible (Sahare y col., 2016).

1.3. INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

Los procesos biocatalíticos pueden desarrollarse tanto en fase homogénea como en heterogénea. En la catálisis homogénea, la enzima, sustratos y productos se encuentran en solución. Este sistema es muy eficaz porque la enzima tiene una completa movilidad, es decir, no hay obstáculo físico que impida su interacción con los sustratos o para la liberación de los productos de la reacción (Xu y col., 2013; Eş y col., 2015). Sin embargo, uno de los principales problemas de trabajar en fase homogénea está relacionado con la inestabilidad en el tiempo de algunas enzimas en solución. Asimismo, las enzimas son insumos generalmente costosos. Por esta razón, para que el proceso sea económicamente viable es muy importante poder recuperar las enzimas una vez utilizadas. En este sentido, la inmovilización de enzimas sobre soportes inertes es una de las técnicas de recuperación más empleadas (Zdarta y col., 2018b). Diversos autores resaltan que la selección de la técnica de inmovilización más adecuada depende de varios factores, tales como el material soporte, el método de unión de la enzima al soporte y el tipo de enzima, entre otros (S. Wang y col., 2016; Zdarta y col., 2018a; Bilal y col., 2019).

Los métodos de inmovilización de enzimas se pueden clasificar en dos categorías: retención física y unión química (Fig. 1.2). En la Tabla 1.1 se comparan algunas técnicas de inmovilización de enzimas. Un punto clave es la elección del material soporte. En general, los materiales soporte pueden dividirse en orgánicos e inorgánicos (Fig. 1.3). La elección del material dependerá del proceso biocatalítico que se llevará a cabo y del costo asociado tanto al soporte como al método de unión de la enzima al mismo (Bilal y col., 2018). Es deseable que los soportes contengan en su superficie gran cantidad de funciones químicas que permitan uniones fuertes con la enzima, además de una alta área superficial para poder incorporar la mayor cantidad de enzima posible en su superficie (Zdarta y col., 2018b).

Asimismo, es conveniente que los soportes tengan una elevada resistencia mecánica, ser de bajo costo y amigables con el ambiente (Zucca y Sanjust, 2014; Eş y col., 2015).

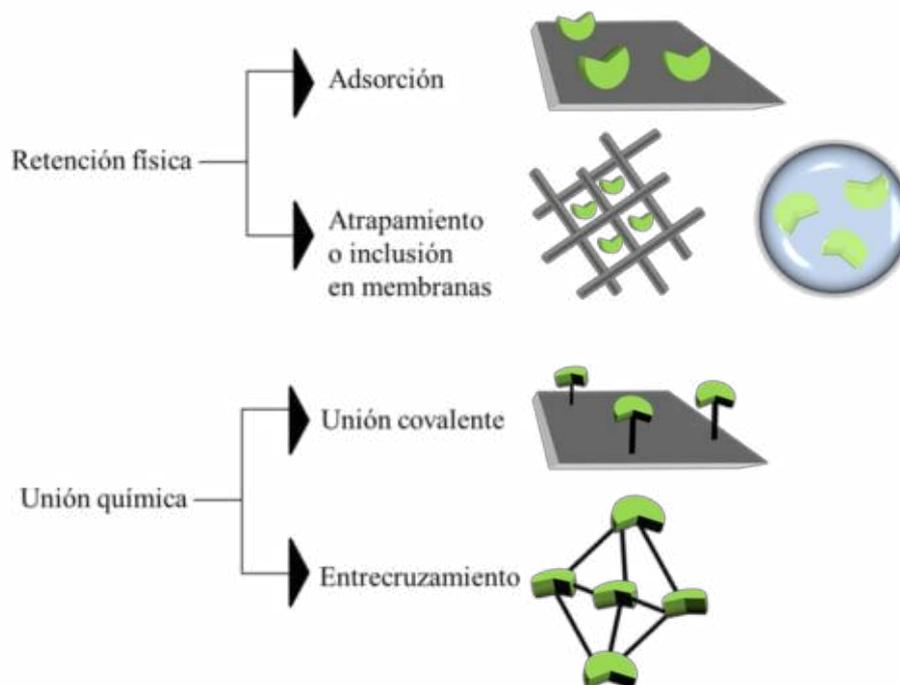


Figura 1.2. Principales métodos de inmovilización de enzimas. Adaptado de Arroyo (1998)

Tabla 1.1. Ventajas y desventajas de diferentes métodos de inmovilización de enzimas

| Método de inmovilización | Ventajas | Desventajas |
|---------------------------------------|---|--|
| Adsorción | <ul style="list-style-type: none"> -Simple de realizar -No utiliza sustancias químicas -Más barato que los métodos químicos -No afecta la estructura de la enzima -El soporte puede reutilizarse | <ul style="list-style-type: none"> -Menor carga de enzima inmovilizada en comparación con los métodos químicos -Lixiviación de la enzima |
| Atrapamiento / inclusión en membranas | <ul style="list-style-type: none"> -No hay modificación de la estructura de la enzima -Menor lixiviación de enzima en comparación a la inmovilización por adsorción -Facilita la separación enzima y sustratos | <ul style="list-style-type: none"> -Limitaciones en la transferencia de masa -Baja carga de enzima inmovilizada |
| Unión covalente | <ul style="list-style-type: none"> -Técnicas simples y versátiles -Reduce la lixiviación de enzima -Mayor disponibilidad de soportes -Uniones fuertes | <ul style="list-style-type: none"> -Uso de sustancias químicas -La enzima puede disminuir la actividad debido a que se reduce su movilidad -Los materiales de soporte no son renovables |
| Entrecruzamiento | <ul style="list-style-type: none"> -Uniones fuertes -No necesita soporte -Reduce la lixiviación de enzima | <ul style="list-style-type: none"> -Puede afectar el sitio catalítico (disminución de actividad catalítica) -Requiere uso de sustancias químicas |

Fuentes: (Eş y col., 2015; Zdarta y col., 2018a; Bilal y col., 2019)

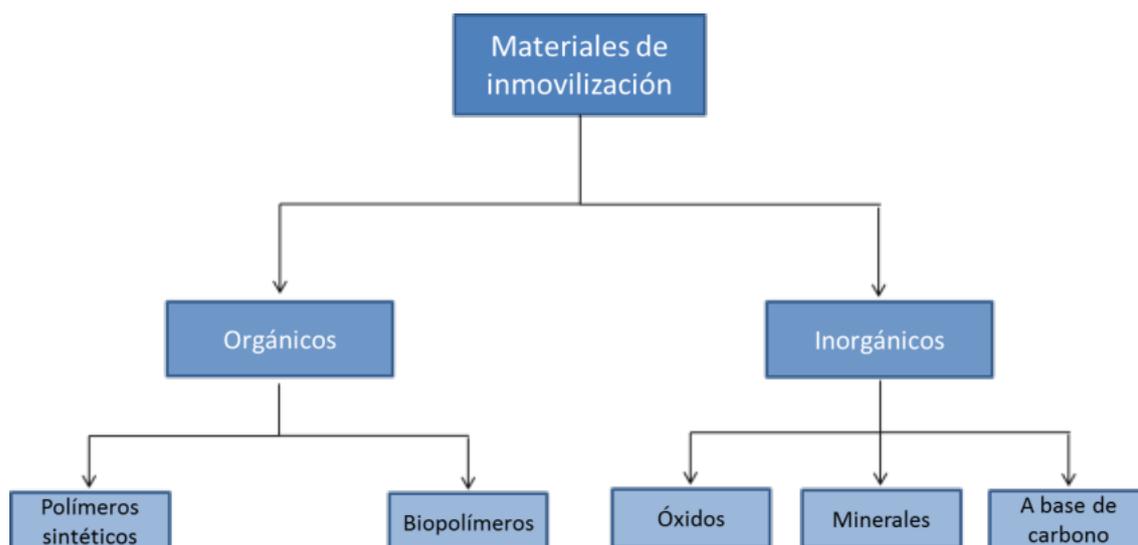


Figura 1.3. Clasificación de los materiales de inmovilización de enzimas. Fuentes: (Zucca y Sanjust, 2014; Zdarta y col., 2018a, 2018b)

En la Tabla 1.2 se muestran las ventajas relacionadas con cada tipo de soporte. Los soportes orgánicos son muy atractivos para la inmovilización de enzimas porque contienen un gran número de grupos funcionales reactivos, son biocompatibles y, en términos generales, tienen alta afinidad por los péptidos (Zdarta y col., 2018a). Los soportes orgánicos pueden dividirse en polímeros sintéticos y biopolímeros. La principal ventaja de los polímeros sintéticos está asociada a que los monómeros pueden elegirse a conveniencia de la técnica de inmovilización (Zdarta y col., 2018b). Pueden contener una variedad de grupos funcionales que favorecen a la inmovilización ya sea por adsorción o mediante uniones covalentes (Bilal y col., 2018; Zdarta y col., 2018b). Además, se puede variar la composición del polímero de tal forma que se obtengan ciertas propiedades físicas deseables, tales como grado de hidrofobicidad superficial, o alta resistencia mecánica y/o térmica. Por su parte, los biopolímeros son una alternativa eco amigable a los materiales sintéticos debido a que en términos generales son más biodegradables y no tóxicos. Entre los biopolímeros

más utilizados en la inmovilización de enzimas están la celulosa (Firooz y col., 2017), el alginato (Spasojević y col., 2014) y el quitosano (Pandey y col., 2017).

Tabla 1.2. Principales ventajas de los materiales para la inmovilización de enzimas

| Materiales | Ventajas |
|-------------------|---|
| Orgánicos | <ul style="list-style-type: none"> -Presencia de numerosos grupos funcionales reactivos -Alta afinidad por los péptidos -Biocompatibilidad -Abundantes en la naturaleza |
| Inorgánicos | <ul style="list-style-type: none"> -Alta resistencia térmica y mecánica -Adsorbentes -Inertes -Fáciles de funcionalizar -Relativamente económicos |

Fuentes: (Zucca y Sanjust, 2014; Zdarta y col., 2018a)

En general, los soportes inorgánicos pueden ser minerales naturales u óxidos inorgánicos. Entre los minerales más empleados en la inmovilización de enzimas podemos citar la bentonita (Mansilla y col., 2018), caolinita (Šekuljica y col., 2016), montmorillonita (Gopinath y Sugunan, 2007) y palygorskita (J. Huang y col., 2009). Por otro lado, entre los óxidos inorgánicos más empleados en la inmovilización de enzimas se pueden citar Al_2O_3 , Fe_3O_4 y SiO_2 (J.-L. Huang y Tsai, 2009; Mohamed y col., 2017). En particular, los materiales a base de óxidos de silicio son muy utilizados debido a que tienen elevada área superficial y porosidad. Además, contienen grupos -OH en su superficie, lo que permite

realizar diversas modificaciones superficiales con el objeto de facilitar la unión de las enzimas (Zucca y Sanjust, 2014).

1.4. DESARROLLO DE BIOCATALIZADORES INMOVILIZADOS PARA EL TRATAMIENTO DE EFLUENTES LÍQUIDOS INDUSTRIALES

La presente Tesis Doctoral tuvo como objetivo general desarrollar biocatalizadores inmovilizados para el tratamiento de efluentes líquidos industriales con peróxido de hidrógeno en presencia de una peroxidasa comercial de rábano picante (HRP). En la Figura 1.4 se muestra un esquema del trabajo experimental desarrollado en la presente Tesis Doctoral.

En una primera etapa se estudió la oxidación del contaminante modelo orange II con peróxido de hidrógeno en presencia de la HRP en sistemas homogéneos. En esta etapa se puso énfasis en el efecto de las condiciones de reacción (rangos adecuados de concentración de enzima, efecto de la concentración inicial de sustratos, pH) la cinética y estequiometría del proceso (Capítulo 3). A partir de los resultados obtenidos se desarrolló una versión modificada del mecanismo Dunford de las peroxidases que tuvo en cuenta la inhibición de la enzima por altas concentraciones de peróxido de hidrógeno, la descomposición de peróxido en agua y oxígeno, la generación de productos de oxidación (PO) y el efecto del pH sobre la cinética de decoloración del orange II (OII).

En el Capítulo 4 se estudió la oxidación enzimática en fase homogénea de los contaminantes modelo (orange II, fenol y bisfenol A) teniendo en cuenta la modalidad de suministro de peróxido de hidrogeno (sistemas batch, fed-batch) y se desarrolló una técnica de monitoreo de la reacción a través de la medición en tiempo real del Potencial de Oxidación-Reducción (ORP).

En paralelo a los estudios cinéticos, se estudió la inmovilización covalente y por adsorción de la HRP sobre dos tipos de materiales (membranas nanofibrosas de poliuretano y diatomitas). En el Capítulo 5 se estudió la inmovilización de HRP sobre membranas nanofibrosas de poliuretano, mientras que en el Capítulo 6 se estudió el uso de diatomitas como soporte para la HRP. Los biocatalizadores inmovilizados fueron evaluados en reacciones de decoloración del contaminante modelo orange II con peróxido de hidrógeno. En ambos casos, se emplearon las condiciones de reacción más favorables obtenidas en el Capítulo 3.

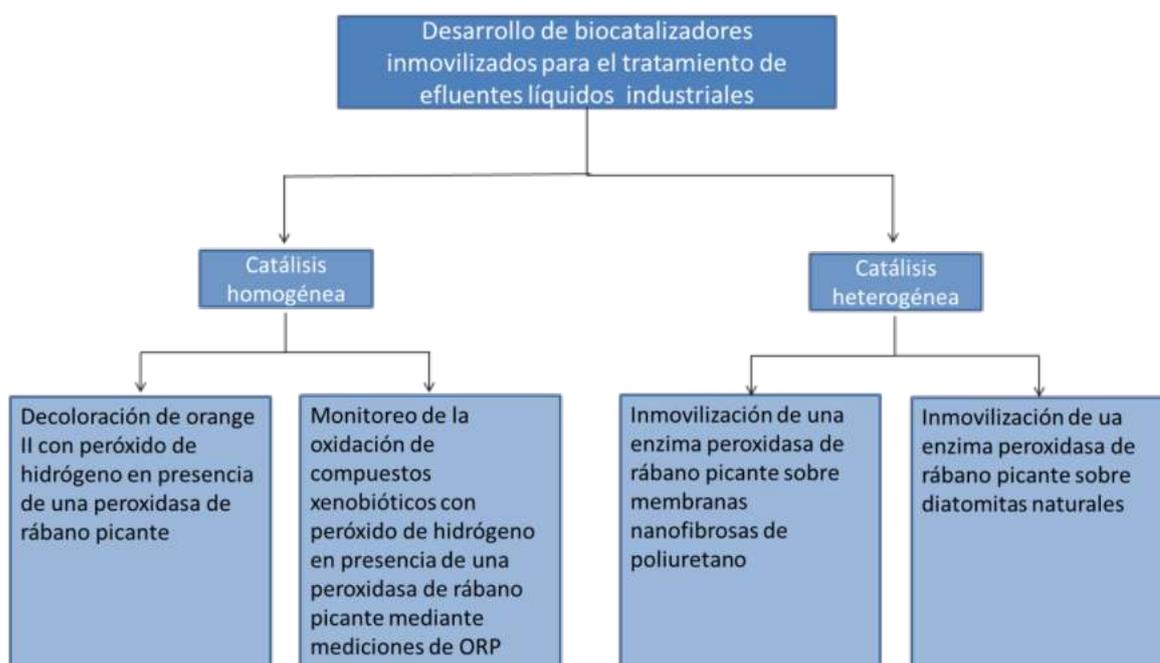


Figura 1.4. Representación esquemática del trabajo experimental de la Tesis Doctoral

Referencias

- Ali, L., Algaithi, R., Habib, H. M., Souka, U., Rauf, M. A., y Ashraf, S. S. (2013). Soybean peroxidase-mediated degradation of an azo dye—a detailed mechanistic study. *BMC biochemistry*, 14(1), 35.
- Arroyo, M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, 39(2), 23-39.
- Bilal, M., Asgher, M., Cheng, H., Yan, Y., y Iqbal, H. M. (2019). Multi-point enzyme immobilization, surface chemistry, and novel platforms: a paradigm shift in biocatalyst design. *Critical reviews in biotechnology*, 39(2), 202-219.
- Bilal, M., Rasheed, T., Zhao, Y., Iqbal, H. M., y Cui, J. (2018). “Smart” chemistry and its application in peroxidase immobilization using different support materials. *International journal of biological macromolecules*, 119, 278-290.
- Cabrera, C., Cornaglia, A., Córdoba, A., Magario, I., y Ferreira, M. L. (2017). Kinetic modelling of the hematin catalysed decolourization of Orange II solutions. *Chemical Engineering Science*, 161, 127-137.
- Caliskan, N., Kul, A. R., Alkan, S., Sogut, E. G., y Alacabey, I. (2011). Adsorption of Zinc (II) on diatomite and manganese-oxide-modified diatomite: A kinetic and equilibrium study. *Journal of hazardous materials*, 193, 27-36.
- Calvo, L., Gilarranz, M., Casas, J., Mohedano, A., y Rodríguez, J. (2006). Hydrodechlorination of 4-chlorophenol in aqueous phase using Pd/AC catalysts prepared with modified active carbon supports. *Applied Catalysis B: Environmental*, 67(1-2), 68-76.
- Courteix, A., y Bergel, A. (1995). Horseradish peroxidase—catalyzed hydroxylation of phenol: I. Thermodynamic analysis. *Enzyme and microbial technology*, 17(12), 1087-1093.

- Chahbane, N., Popescu, D.-L., Mitchell, D. A., Chanda, A., Lenoir, D., Ryabov, A. D., . . . Collins, T. J. (2007). Fe III–TAML-catalyzed green oxidative degradation of the azo dye Orange II by H₂O₂ and organic peroxides: products, toxicity, kinetics, and mechanisms. *Green Chemistry*, 9(1), 49-57.
- Chiong, T., Lau, S. Y., Lek, Z. H., Koh, B. Y., y Danquah, M. K. (2016). Enzymatic treatment of methyl orange dye in synthetic wastewater by plant-based peroxidase enzymes. *Journal of environmental chemical engineering*, 4(2), 2500-2509.
- Di Luca, C. (2015). *Desarrollo de sistemas catalíticos para la oxidación de soluciones concentradas de contaminantes orgánico con peróxido de hidrógeno*. Universidad Nacional de Mar del Plata. Facultad de Ingeniería. Argentina.
- Doumic. (2015). *Nuevas estrategias para la oxidación catalítica de compuestos orgánicos en medio acuoso*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Doumic, L. I., Haure, P. M., Cassanello, M. C., y Ayude, M. A. (2013). Mineralization and efficiency in the homogeneous Fenton Orange G oxidation. *Applied Catalysis B: Environmental*, 142, 214-221.
- Dunford, H., y Stillman, J. (1976). On the function and mechanism of action of peroxidases. *Coordination chemistry reviews*, 19(3), 187-251.
- Eş, I., Vieira, J. D. G., y Amaral, A. C. (2015). Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(5), 2065-2082.
- Ferro Orozco, A., Lobo, C. C., Contreras, E. M., y Zaritzky, N. E. (2013). Biodegradation of bisphenol-A (BPA) in activated sludge batch reactors: analysis of the acclimation process. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85, 392-399.

- Firooz, N. S., Panahi, R., Mokhtarani, B., y Yazdani, F. (2017). Direct introduction of amine groups into cellulosic paper for covalent immobilization of tyrosinase: support characterization and enzyme properties. *Cellulose*, 24(3), 1407-1416.
- Forgacs, E., Cserhati, T., y Oros, G. (2004). Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Environment international*, 30(7), 953-971.
- Franciscon, E., Piubeli, F., Fantinatti-Garboggini, F., de Menezes, C. R., Silva, I. S., Cavaco-Paulo, A., . . . Durrant, L. R. (2010). Polymerization study of the aromatic amines generated by the biodegradation of azo dyes using the laccase enzyme. *Enzyme and microbial technology*, 46(5), 360-365.
- Frey, P. A., y Hegeman, A. D. (2007). *Enzymatic reaction mechanisms*: Oxford University Press.
- Gómez, J., Bódalo, A., Gómez, E., Hidalgo, A., Gómez, M., y Murcia, M. (2008). A transient design model of a continuous tank reactor for removing phenol with immobilized soybean peroxidase and hydrogen peroxide. *Chemical Engineering Journal*, 145(1), 142-148.
- Gopinath, S., y Sugunan, S. (2007). Enzymes immobilized on montmorillonite K 10: Effect of adsorption and grafting on the surface properties and the enzyme activity. *Applied Clay Science*, 35(1-2), 67-75.
- Gotor Fernández, V., y Hernáiz Gómez-Dégano, M. J. (2017). *Biocatálisis aplicada. Las enzimas como herramientas útiles en síntesis orgánica*. Paper presented at the Anales de Química.
- Hiner, A. N., Hernández-Ruíz, J., Arnao, M. B., García-Cánovas, F., y Acosta, M. (1996). A comparative study of the purity, enzyme activity, and inactivation by hydrogen peroxide of commercially available horseradish peroxidase isoenzymes A and C. *Biotechnology and bioengineering*, 50(6), 655-662.

- Huang, J.-L., y Tsai, Y.-C. (2009). Direct electrochemistry and biosensing of hydrogen peroxide of horseradish peroxidase immobilized at multiwalled carbon nanotube/alumina-coated silica nanocomposite modified glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 140(1), 267-272.
- Huang, J., Liu, Y., y Wang, X. (2009). Silanized palygorskite for lipase immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 57(1-4), 10-15.
- Illanes, A. (2008). Enzyme biocatalysis. *Principles and Applications*. Editorial Springer-Verlag New York Inc., United States.
- Jakopitsch, C., Wanasinghe, A., Jantschko, W., Furtmüller, P. G., y Obinger, C. (2005). Kinetics of Interconversion of Ferrous Enzymes, Compound II and Compound III, of Wild-type Synechocystis Catalase-peroxidase and Y249F PROPOSAL FOR THE CATALYTIC MECHANISM. *Journal of Biological Chemistry*, 280(10), 9037-9042.
- Kalsoom, U., Ashraf, S. S., Meemani, M. A., Rauf, M. A., y Bhatti, H. N. (2013). Mechanistic study of a diazo dye degradation by Soybean Peroxidase. *Chemistry Central Journal*, 7(1), 93.
- Karam, J., y Nicell, J. A. (1997). Potential applications of enzymes in waste treatment. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental AND Clean Technology*, 69(2), 141-153.
- Lau, Y.-Y., Wong, Y.-S., Teng, T.-T., Morad, N., Rafatullah, M., y Ong, S.-A. (2014). Coagulation-flocculation of azo dye Acid Orange 7 with green refined laterite soil. *Chemical Engineering Journal*, 246, 383-390.
- Levec, J., y Pintar, A. (2007). Catalytic wet-air oxidation processes: a review. *Catalysis Today*, 124(3-4), 172-184.
- Lodeiro, A. (2016). Catálisis enzimática. Series: Libros de Cátedra.

- López, C. (2005). Oxidación del tinte azo Orange II mediante MnP en reactores enzimáticos operados en continuo. Tesis Doctoral: Universidad de Santiago de Compostela.
- Malvi, B., Panda, C., Dhar, B. B., y Gupta, S. S. (2012). One pot glucose detection by [Fe III (biuret-amide)] immobilized on mesoporous silica nanoparticles: an efficient HRP mimic. *Chemical Communications*, 48(43), 5289-5291.
- Mansilla, A. Y., Lanfranconi, M., Alvarez, V. A., y Casalongué, C. A. (2018). Development and characterization of bentonite/wGLP systems. *Applied Clay Science*, 166, 159-165.
- Mo, J. H., Lee, Y. H., Kim, J., Jeong, J. Y., y Jegal, J. (2008). Treatment of dye aqueous solutions using nanofiltration polyamide composite membranes for the dye wastewater reuse. *Dyes and Pigments*, 76(2), 429-434.
- Mohamed, S. A., Al-Harbi, M. H., Almulaiky, Y. Q., Ibrahim, I. H., y El-Shishtawy, R. M. (2017). Immobilization of horseradish peroxidase on Fe₃O₄ magnetic nanoparticles. *Electronic Journal of Biotechnology*, 27, 84-90.
- Nicell, J., Bewtra, J., Biswas, N., y Taylor, E. (1993). Reactor development for peroxidase catalyzed polymerization and precipitation of phenols from wastewater. *Water Research*, 27(11), 1629-1639.
- Nicell, J. A., y Wright, H. (1997). A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide. *Enzyme and microbial technology*, 21(4), 302-310.
- Pandey, V. P., Rani, J., Jaiswal, N., Singh, S., Awasthi, M., Shasany, A. K., . . . Dwivedi, U. N. (2017). Chitosan immobilized novel peroxidase from *Azadirachta indica*: Characterization and application. *International journal of biological macromolecules*, 104, 1713-1720.
- Pérez, S. S. (2012). *Eliminación de compuestos emergentes mediante sistemas biológicos y su acoplamiento con procesos de oxidación avanzada*. Universidad Autónoma de Madrid.

- Sahare, P., Ayala, M., Vazquez-Duhalt, R., Pal, U., Loni, A., Canham, L., . . . Agarwal, V. (2016). Enhancement of peroxidase stability against oxidative self-inactivation by co-immobilization with a redox-active protein in mesoporous silicon and silica microparticles. *Nanoscale research letters*, 11(1), 417.
- Šekuljica, N. Ž., Prlainović, N. Ž., Jovanović, J. R., Stefanović, A. B., Djokić, V. R., Mijin, D. Ž., y Knežević-Jugović, Z. D. (2016). Immobilization of horseradish peroxidase onto kaolin. *Bioprocess and biosystems engineering*, 39(3), 461-472.
- Spasojević, D., Prokopijević, M., Prodanović, O., Pirtea, M. G., Radotić, K., y Prodanović, R. (2014). Immobilization of chemically modified horseradish peroxidase within activated alginate beads. *Hemijska industrija*, 68(1), 117-122.
- Veitch, N. C. (2004). Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65(3), 249-259.
- Wang, S., Fang, H., Yi, X., Xu, Z., Xie, X., Tang, Q., . . . Xu, X. (2016). Oxidative removal of phenol by HRP-immobilized beads and its environmental toxicology assessment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 130, 234-239.
- Wang, W., Han, H., Yuan, M., y Li, H. (2010). Enhanced anaerobic biodegradability of real coal gasification wastewater with methanol addition. *Journal of Environmental Sciences*, 22(12), 1868-1874.
- Xu, R., Chi, C., Li, F., y Zhang, B. (2013). Immobilization of horseradish peroxidase on electrospun microfibrous membranes for biodegradation and adsorption of bisphenol A. *Bioresource technology*, 149, 111-116.
- Zdarta, J., Meyer, A. S., Jesionowski, T., y Pinelo, M. (2018a). Developments in support materials for immobilization of oxidoreductases: A comprehensive review. *Advances in colloid and interface science*, 258, 1-20.

Zdarta, J., Meyer, A. S., Jesionowski, T., y Pinelo, M. (2018b). A general overview of support materials for enzyme immobilization: characteristics, properties, practical utility. *Catalysts*, 8(2), 92.

Zucca, P., y Sanjust, E. (2014). Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: methods and mechanisms. *Molecules*, 19(9), 14139-14194.

Capítulo 2

Materiales y métodos generales

2.1. MATERIALES

En la Tabla 2.1 se presenta una lista sustancias y reactivos utilizada en la presente trabajo de Tesis Doctoral junto con sus correspondientes proveedores.

Tabla 2.1. Lista de sustancias y reactivos utilizados en el presente trabajo de Tesis

| Nombre | Fórmula química | Proveedor |
|------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| (3-aminopropil)triethoxisilano | $H_2N(CH_2)_3Si(OC_2H_5)_3$ | Sigma, 99 % |
| 4-Aminoantipirina | $C_{11}H_{13}N_3O$ | Sigma, g |
| Ácido clorhídrico | HCl | Merck, 37 % |
| Ácido nítrico | HNO_3 | Merck, 70 % |
| Albúmina sérica bovina | -- | DSF Labs, g |
| Alil glicidil éter | $C_6H_{10}O_2$ | AcrosOrganics |
| Azul de toluidina | $C_{15}H_{16}ClN_3S$ | Sigma, g |
| Bisfenol A | $C_{15}H_{16}O_2$ | Sigma, g |
| Diatomita | -- | Ing. Jacobacci, Río Negro |
| El hidrosulfito de sodio | $Na_2S_2O_4$ | AcrosOrganics, g |
| Enzima peroxidasa Tipo I | -- | Sigma, g |
| Fenol | C_6H_5OH | Sigma, g |
| Ferrocianuro de potasio | $C_6FeK_3N_6$ | Sigma, g |
| Fosfato dibásico de potasio | K_2HPO_4 | Adrena, g |
| Fosfato monobásico de potasio | KH_2PO_4 | Adrena, g |
| Glutaraldehído | $C_5H_8O_2$ | Sigma, 50 % |
| Hipoclorito de sodio | NaClO | Química Industrial Kubo, g |
| Kit de glicemia enzimática | -- | Wiener laboratorios |
| N,N-dimetilformamida | C_3H_7NO | Sigma, 99 % |
| Orange II | $C_{16}H_{11}N_2NaO_4S$ | Sigma, g |
| Peróxido de hidrógeno | H_2O_2 | Adrena, 35 % |
| Poliuretano comercial Avalon 65 DB | -- | HuntsmanPolyurethanes |
| Tetrahidrofurano | C_4H_8O | Sigma, 99 % |

2.2. MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

Todos los experimentos monitoreados por espectrofotometría se llevaron a cabo en cubetas de cuarzo o de metacrilato de 3 y 2 mL, respectivamente. Las mediciones se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 del Laboratorio de Catalizadores y Superficies (INTEMA).

2.2.1. Concentración de orange II

La concentración de orange II (OII) durante los experimentos fue calculada a partir de curvas de calibración (Fig. 2.1) a 485 nm (Inchaurredo, 2013). Cabe destacar que, en el rango de pHs estudiados (5 - 10), el espectro UV/Visible del OII era constante (Fig. 2.2).

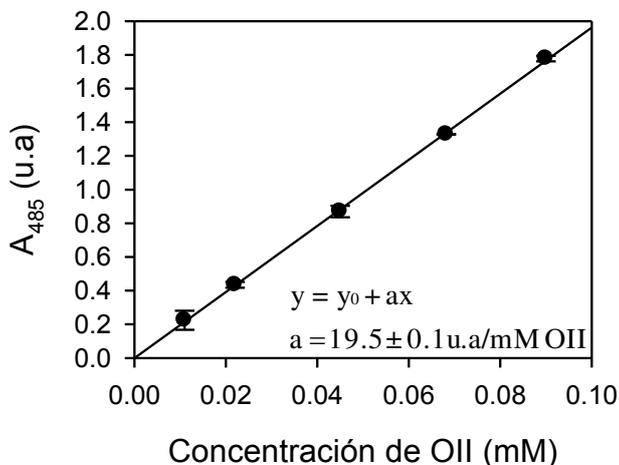


Figura 2.1. Ejemplo de curva de calibración para la determinación de la concentración de OII. En este ejemplo, pH = 7 en buffer fosfato 100 mM. Las barras indican el desvío estándar.

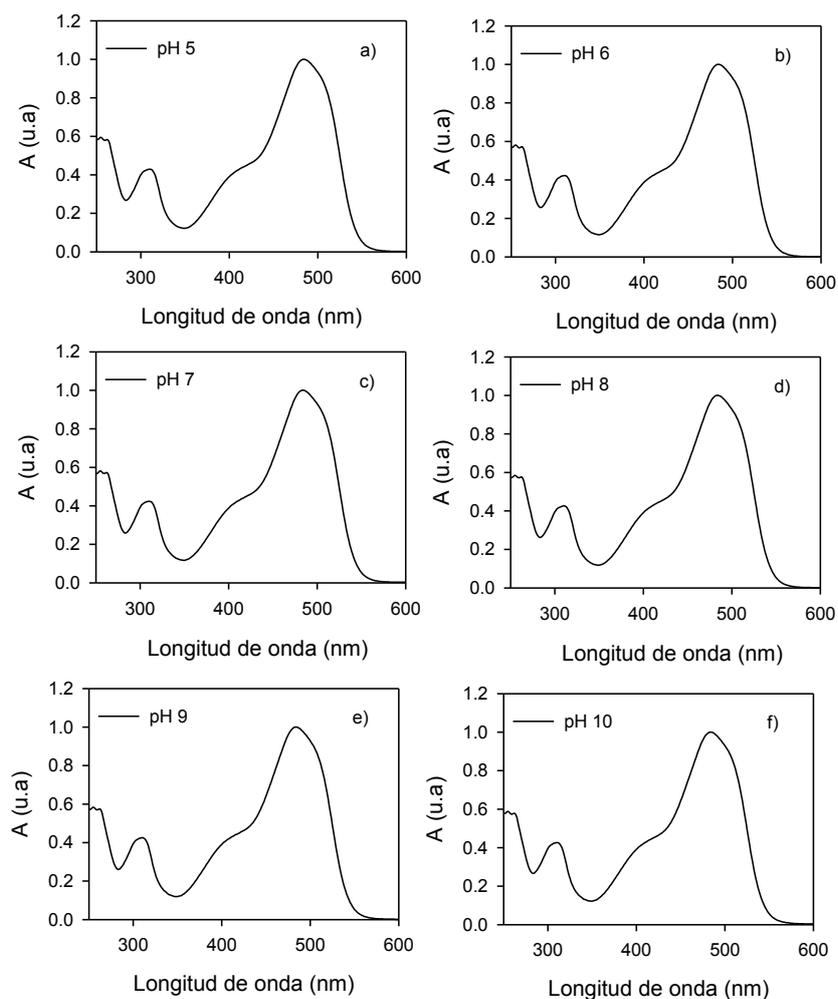


Figura 2.2. Espectro UV/Visible del OII en función del pH.

2.2.2. Concentración de fenoles totales (FT)

Durante la oxidación de fenol y bisfenol A (BPA) (Capítulo 4) se determinó la concentración de fenoles totales (FT) mediante el método de 4-aminoantipirina (4-AAP) (Modaressi y col., 2005). En esta técnica, la 4-AAP (20.8 mM de 4-AAP en 0.25 M NaHCO_3) realiza un ataque nucleófilo a los compuestos fenólicos formando un intermediario que luego es oxidado por el ferricianuro de potasio (83.4 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en 0.25 M de NaHCO_3). Esta reacción produce un complejo coloreado tipo quinona que puede medirse a

510 nm. El ensayo consistía en llenar una cubeta espectrofotométrica con 1 mL de la muestra a concentraciones apropiadas y 0.2 mL de 4-AAP y de K_3Fe . Luego de 10 min, se determinaba la absorbancia a 510 nm. La absorbancia era medida contra un blanco que contenía agua destilada en lugar de la muestra. La Figura 2.3 muestra un ejemplo de las curvas de calibración realizadas para el fenol y BPA.

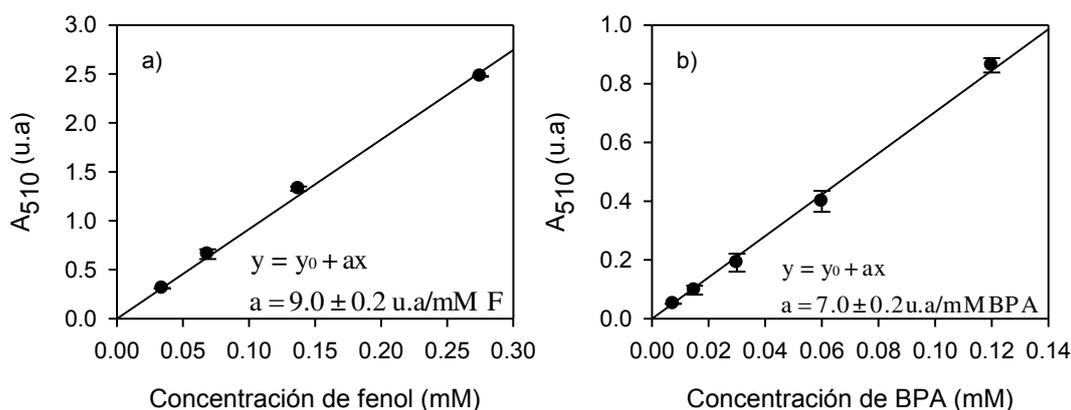


Figura 2.3. Ejemplos de las curvas de calibración para la determinación de la concentración de a) fenol y b) bisfenol A. Las barras indican el desvío estándar de tres determinaciones.

2.2.3. Determinación de concentración de enzima

El contenido de enzima se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando como estándar soluciones de albúmina sérica bovina (DSF Labs, Argentina) (Fig. 2.4). El ensayo de Bradford se basa en la unión del colorante Coomassie Blue G250 a la proteína. Para determinar el contenido de proteína, se hacía reaccionar 1 mL del reactivo de Bradford con 0.1 mL de la muestra. Luego de 2 min, se registraba la absorbancia a 595 nm medida contra agua destilada.

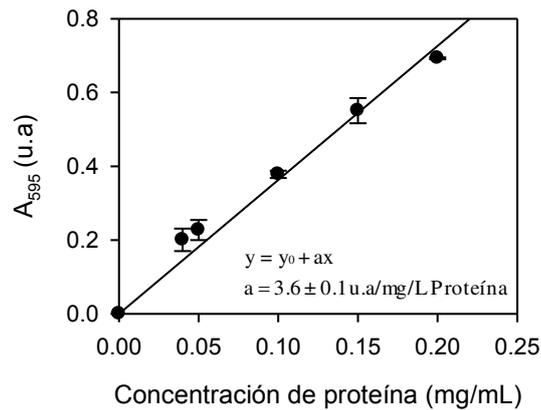


Figura 2.4. Curva de calibración para la determinación de la concentración proteína por el método de Bradford. Las barras indican el desvío estándar de tres determinaciones.

2.2.4. Determinación de la enzima inmovilizada

Durante la realización de experimentos de inmovilización de la enzima sobre los diferentes soportes estudiados (Caps. 5 y 6), la cantidad específica de enzima inmovilizada (Q) se calculó empleando un balance de masa para la enzima:

$$Q = \frac{V}{X}(HRP_0 - HRP_t) \quad (2.1)$$

donde HRP_0 y HRP_t son la concentración de HRP inicial y a un tiempo dado en la mezcla de inmovilización, V es el volumen de solución de enzima y X son los gramos (en el caso de la diatomita) o los cm^2 (en el caso de membranas nanofibras) de soporte puesto en contacto con la solución de enzima.

2.3. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES SOPORTES Y LOS BIOCATALIZADORES DESARROLLADOS

2.3.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido (SEM) es uno de los instrumentos más versátiles para el análisis de la morfología de la microestructura y las caracterizaciones de la composición química de materiales (Zhou y col., 2006). Las membranas nanofibras producidas en el Capítulo 5 fueron caracterizadas antes de la inmovilización y una vez finalizados los ensayos de decoloración de OII mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) en un equipo JEOL modelo JSM-6460LV. En total se estudiaron 10 membranas y se registraron 10 imágenes de distintas zonas para cada muestra a distintos aumentos (500X, 3000X y 5000X).

El diámetro de las nanofibras que componen las membranas de poliuretano (Cap. 5) fue determinado mediante el software Image Pro (Versión 6). Para cada muestra se consideraron 100 datos distribuidos en 3 imágenes SEM de 3000X. En total se estudiaron 10 membranas para un total de 1000 datos. Estos datos fueron analizados mediante un test de diferencia de medias (test t de Student para datos desapareados) empleando el programa SigmaPlot (Versión 14.0/2018). Systat Software Inc.). La Figura 2.5 muestra un ejemplo de la medición de los diámetros.

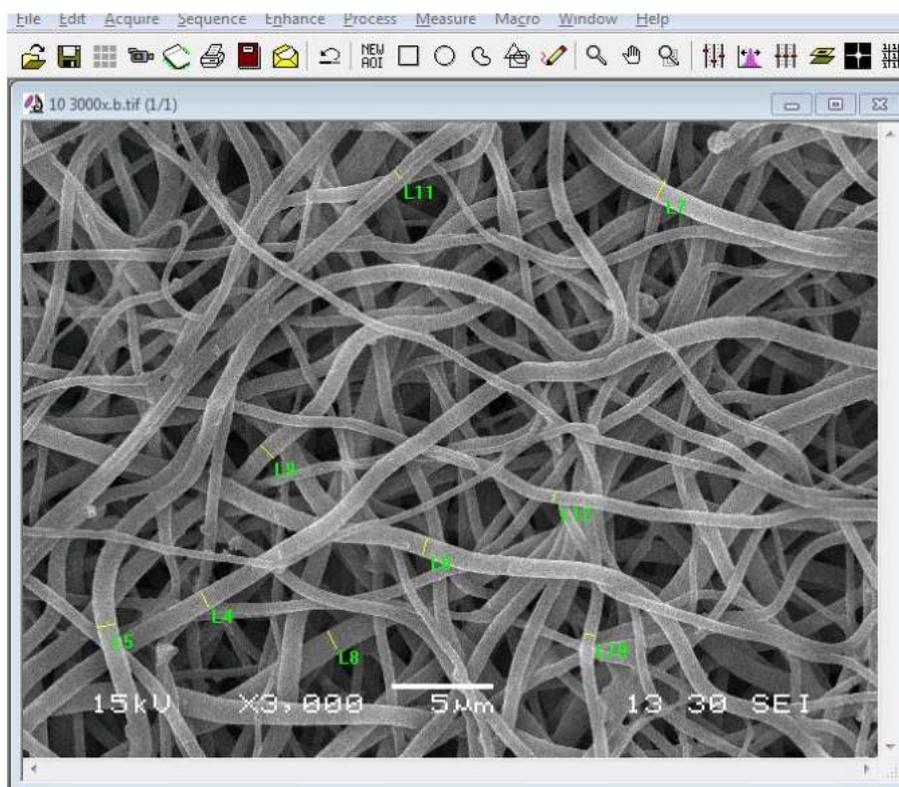


Figura 2.5. Ejemplo de la medición del diámetro de las nanofibras de poliuretano electrohilado.

2.3.2. Difracción de rayos X (DRX)

La técnica de DRX es muy utilizada para identificar la estructura cristalina de materiales (Sharma y col., 2000). Esta técnica se basa en la incidencia de un haz de luz de rayos X sobre una muestra plana. La intensidad de la radiación difractada es función de la distancia entre los planos cristalinos que configuran la estructura y del ángulo de difracción θ (Inchaurredo, 2013). Los estudios se realizaron en un equipo PANalytical X'Pert PRO PW3040 del Laboratorio de Procesamiento y Caracterización de Materiales Cerámicos de INTEMA. En los ensayos se utilizó radiación $\text{CuK}\alpha$ (1,54056 Å) y monocromador de grafito a 40 kV y 40 mA. La velocidad de barrido aplicada fue de 0.02 °/seg (en 2θ), con un tamaño de paso de 0.02° y un tiempo de 1 seg por paso. Las mediciones se realizaron en el rango 5°

$< 2\theta < 70^\circ$. Los difractogramas obtenidos fueron comparados con datos de literatura (Inchaurredo y col., 2016; Inchaurredo y col., 2017) para identificar la naturaleza de las fases cristalinas.

2.3.3. Fluorescencia de rayos X (FRX)

La composición química de las muestras se determinó mediante fluorescencia de rayos X (FRX) utilizando un espectrómetro PANalytical Minipal 2 PW4024 de tipo dispersivo con ánodo de Cr (Laboratorio de Procesamiento y Caracterización de Materiales Cerámicos, INTEMA). Los ensayos se hicieron en modo “standarless” sobre muestras en polvo. Una limitación de la espectroscopía de fluorescencia de rayos X es su capacidad para analizar elementos con un número atómico inferior a 11 (Na). Por lo tanto, los resultados relacionados con la composición solo reflejan estos elementos.

2.3.4. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier de reflectancia difusa (DRIFT)

La espectroscopía de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) se considera una herramienta semicuantitativa que permite el análisis de materiales mediante la incidencia de radiación infrarroja sobre las muestras. A partir de los FTIR se obtienen espectros que caracteriza las vibraciones de los enlaces dentro de una molécula aportando información única de los materiales estudiados (Beasley y col., 2014). El DRIFT es una técnica alternativa que permite determinar los grupos funcionales sobre la superficie de los materiales.

Las diatomitas empleadas en el Capítulo 6 fueron caracterizadas mediante la técnica DRIFT para identificar los grupos funcionales sobre el soporte antes y después de la inmovilización de la HRP. Las mediciones se realizaron utilizando un espectrofotómetro

FTIR Nicolet 6700 de ThermoScientific (Laboratorio de Caracterización de Polímeros, INTEMA). Los espectros fueron obtenidos a temperatura ambiente realizando 32 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} . Las muestras en polvo fueron preparadas en KBr con una relación 1:2 m/m. Los espectros fueron registrados en el rango entre $700 - 3800\text{ cm}^{-1}$.

2.3.5. Microscopía electrónica de barrido y análisis de dispersión de rayos X (SEM/EDX)

Se estudiaron las características superficiales de diferentes muestras de diatomita y los biocatalizadores desarrollados en polvo utilizando un microscopio electrónico de barrido Carl Zeiss EVO MA10 operado a 20 kV y equipado con un detector Oxford x-act (EDX) (Laboratorios de PLAPIQUI, Argentina). Los resultados fueron interpretados con el programa AztecOne. Se midieron tres espectros puntuales en diferentes zonas de la muestra. Además, se realizó un mapeo superficial a fin de mostrar la distribución cualitativa de los elementos detectados.

2.3.6. Análisis termogravimétrico (TGA)

Las muestras de diatomita y de los biocatalizadores inmovilizados fueron caracterizadas mediante análisis termogravimétrico. Las mediciones se realizaron en un analizador térmico TGA Q500 V20.13 Build 39 (Laboratorio de Materiales Compuestos Termoplásticos, INTEMA) a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min desde la temperatura ambiente hasta 900 °C en flujo de aire. La masa inicial de las muestras estuvo en el rango de 11 a 14 mg. A partir de los perfiles de pérdida de masa se calculó la derivada del TGA en función de la temperatura con el programa SigmaPlot (Versión 14.0/2018. Systat Software Inc.).

2.3.7. Área BET

La adsorción de gas es una herramienta bien establecida para la caracterización de la textura de sólidos porosos y polvos finos (Thommes y col., 2015). Las áreas específicas de la diatomita y los biocatalizadores inmovilizados fueron determinadas a partir de las isotermas de adsorción/desorción de nitrógeno utilizando un equipo Micrometrics ASAP-2020 (Laboratorios de CINDECA, Argentina). Las isotermas se interpretaron mediante el modelo de Brunauer-Emmett- Teller (BET). Antes de su análisis, cada muestra se desgasificó durante la noche a 120 °C en condiciones de vacío.

2.4. CÁLCULOS

2.4.1. Velocidad inicial de decoloración de orange II (OII)

Durante los ensayos de oxidación enzimática de OII con peróxido de hidrógeno, la velocidad inicial de decoloración de OII (VD_0) fue determinada a partir de curvas de absorbancia a 485 nm en función del tiempo. Los cálculos de VD_0 se realizaron según el tipo de datos disponible. Cuando los datos de absorbancia en función del tiempo formaban una recta (Fig. 2.6), VD_0 fue calculada como la pendiente de la recta obtenida mediante regresión lineal.

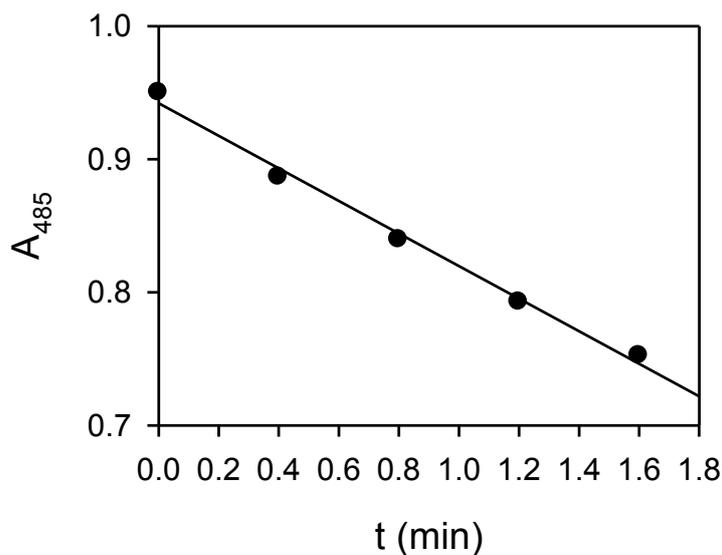


Figura 2.6. Ejemplo de decoloración inicial de OII.

Por otro lado, cuando se disponía de la curva completa de decoloración (Fig. 2.7), VD_0 fue calculada mediante una aproximación de pseudo primer orden. Según la figura 2.7, el cambio de absorbancia (A) en función del tiempo puede aproximarse mediante la siguiente ecuación:

$$A = A_{\infty} + ae^{-bt} \quad (2.2)$$

donde A es la absorbancia a un cierto tiempo, A_{∞} es la absorbancia a tiempo infinito, a es la variación de absorbancia y b es la constante de pseudo primer orden. Derivando la ec. (2.2) para $t = 0$ se obtiene que la velocidad inicial de decoloración (VD_0):

$$VD_0 = a \times b \quad (2.3)$$

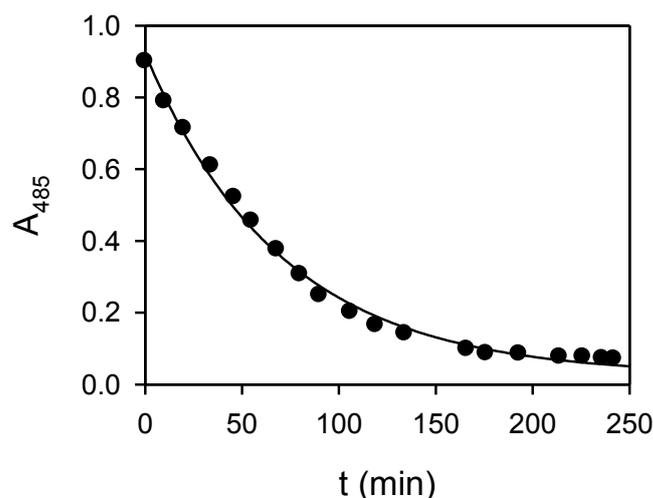


Figura 2 7. Ejemplo de curva completa de decoloración de OII.

Para obtener los coeficientes a y b , se realizó un ajuste no lineal de la ec. (2.2) a los datos experimentales empleando el programa SigmaPlot (Versión 14.0/2018). Debido a que el programa proporciona tanto los valores de a y b como sus respectivos errores asociados (σ_a, σ_b), se estimó el error de VD_0 (σ_{VD_0}) empleando el método de propagación lineal de errores (Lobo y col., 2014). De acuerdo a este método, para una cierta función Y la cual depende de n parámetros (X), el error de Y (σ_Y) es el resultado de la contribución del error asociado a cada parámetro (σ_{X_i}):

$$\sigma_Y^2 = \sum_{i=1}^n \left(\sigma_{X_i} \frac{dY}{dX_i} \right)^2 \quad (2.4)$$

Aplicando la ec. (2.4) a la (2.3), el error en VD_0 resulta

$$\sigma_{VD_0}^2 = (\sigma_a b)^2 + (\sigma_b a)^2 \quad (2.5)$$

2.4.2. Porcentaje de conversión (R_s)

El porcentaje de conversión de un cierto compuesto (sustratos orgánicos) durante una cierta reacción fue calculado mediante la ec. (2.6).

$$R_s(\%) = \frac{C_{s0} - C_s}{C_{s0}} \times 100 \quad (2.6)$$

donde C_{s0} y C_s son la concentración inicial y a un cierto tiempo, respectivamente. Teniendo en cuenta que tanto C_{s0} y C_s están medidos con un cierto error ($\sigma_{C_{s0}}, \sigma_{C_s}$), aplicando la ec. (2.4) a (2.6) se obtuvo el error asociado a R_s :

$$\sigma_{R_s}^2 = \left(\sigma_{C_s} \frac{100}{C_{s0}} \right)^2 + \left(\sigma_{C_{s0}} \frac{100C_s}{C_{s0}^2} \right)^2 \quad (2.7)$$

2.4.3. Actividad peroxidasa relativa (AP_r)

La actividad peroxidasa relativa se determinó a partir de la ec. (2.8):

$$AP_r(\%) = \frac{AP}{AP_0} \times 100 \quad (2.8)$$

donde AP_0 y AP son la actividad peroxidasa inicial y a un cierto tiempo, respectivamente. Aplicando la ec. (2.4) a (2.8) se obtuvo el error asociado a AP_r :

$$\sigma_{AP_r}^2 = \left(\sigma_{AP} \frac{100}{AP_0} \right)^2 + \left(\sigma_{AP_0} \frac{100AP}{AP_0^2} \right)^2 \quad (2.9)$$

Referencias

- Beasley, M. M., Bartelink, E. J., Taylor, L., y Miller, R. M. (2014). Comparison of transmission FTIR, ATR, and DRIFT spectra: implications for assessment of bone bioapatite diagenesis. *Journal of Archaeological Science*, 46, 16-22.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Inchaurredo, N. (2013). *Catalizadores compuestos para la oxidación de contaminantes modelo fenol y OII, con peróxido de hidrógeno*. (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Mar del Plata. Facultad de Ingeniería. Argentina).
- Inchaurredo, N., Font, J., Ramos, C. P., y Haure, P. (2016). Natural diatomites: efficient green catalyst for Fenton-like oxidation of Orange II. *Applied Catalysis B: Environmental*, 181, 481-494.
- Inchaurredo, N., Ramos, C. P., Žerjav, G., Font, J., Pintar, A., y Haure, P. (2017). Modified diatomites for Fenton-like oxidation of phenol. *Microporous and Mesoporous Materials*, 239, 396-408.
- Lobo, C. C., Bertola, N. C., y Contreras, E. M. (2014). Error propagation in open respirometric assays. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 31(2), 303-312.
- Modaressi, K., Taylor, K. E., Bewtra, J., y Biswas, N. (2005). Laccase-catalyzed removal of bisphenol-A from water: protective effect of PEG on enzyme activity. *Water Research*, 39(18), 4309-4316.
- Sharma, A., Kyotani, T., y Tomita, A. (2000). Comparison of structural parameters of PF carbon from XRD and HRTEM techniques. *Carbon*, 38(14), 1977-1984.

- Thommes, M., Kaneko, K., Neimark, A. V., Olivier, J. P., Rodriguez-Reinoso, F., Rouquerol, J., y Sing, K. S. (2015). Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 87(9-10), 1051-1069.
- Zhou, W., Apkarian, R., Wang, Z. L., y Joy, D. (2006). Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM) *Scanning microscopy for nanotechnology* (pp. 1-40): Springer.

Capítulo 3

Decoloración de orange II con peróxido
de hidrógeno en presencia de una
peroxidasa de rábano picante

3.1. INTRODUCCIÓN

El principal objetivo del tratamiento de aguas residuales con compuestos cromóforos es la eliminación del color, teniendo un papel secundario la eliminación de la carga orgánica. Actualmente, los colorantes azo son compuestos muy utilizados en muchas industrias, como la textil, farmacéutica, alimenticia, curtiduría y otros (Lin y col., 2014). Los colorantes azo representan el 70% de la producción mundial de colorantes (Rache y col., 2014). Entre los colorantes azo, el orange II (OII) es uno de los más empleados en la industria. Esto se debe a que el OII es un colorante muy soluble en agua, resistente a la degradación natural, a la oxidación por O₂ y a la hidrólisis catalizada por ácidos o bases comunes (Heydari y col., 2016). Se estima que aproximadamente un 10% de los colorantes producidos en el mundo se pierden en las aguas residuales durante la fabricación y los procesos de aplicación (Rauf y Ashraf, 2012). Estos compuestos son potencialmente tóxicos, cancerígenos y mutagénicos, en consecuencia, es fundamental su eliminación de las aguas residuales antes de ser descargados a un medio natural (Sudha y col., 2014).

Recientemente, la oxidación enzimática de los colorantes azo representa una alternativa ecoamigable de bajo costo en comparación con los métodos fisicoquímicos (Saratale y col., 2011; Rauf y Ashraf, 2012). Por otra parte, el uso de enzimas resulta más ventajoso que los tratamientos microbianos tradicionales, ya que las enzimas actúan con mayor especificidad, y son más simples de manipular y almacenar (Nicell y Wright, 1997). En particular, se ha propuesto el uso de diferentes peroxidasas (peroxidasa de soja, peroxidasa de manganeso, peroxidasa de lignina, peroxidasa de rábano picante) o sus sistemas biomiméticos (p.ej., hematina) para la eliminación de colorantes azoicos (Cheng y col., 2007; Franciscon y col., 2010; Ali y col., 2013; Chiong y col., 2016; Sahare y col., 2016; Cabrera y col., 2017).

El uso de enzimas inmovilizadas es una de las estrategias más utilizadas para desarrollar bioprocesos económicamente viables, ya que permite la reutilización del biocatalizador (Zdarta y col., 2018). Sin embargo, para escalar los procesos y desarrollar sistemas más controlados, es importante primero conocer las características estequiométricas y cinéticas de las reacciones enzimáticas en condiciones ideales, ya que las enzimas suelen ser sensibles a condiciones externas o la presencia de inhibidores, que pueden ser, incluso, sus mismos sustratos (López, 2005). Típicamente, los sistemas catalíticos en fase homogénea son más eficientes que los heterogéneos porque la enzima tiene mayor movilidad y permite mayor interacción con los sustratos (Xu y col., 2013).

En la literatura se pueden encontrar varios modelos matemáticos relacionados con el efecto del peróxido de hidrógeno, el tipo de sustrato reductor, el pH, entre otros, sobre la actividad de las peroxidasas (Olsen y col., 2003; Gómez y col., 2008; Ali y col., 2013; Kalsoom y col., 2013). Sin embargo, la mayoría de estos modelos son modificaciones o extensiones del mecanismo de Dunford (Dunford y Stillman, 1976).

En el presente Capítulo se estudió la cinética de la oxidación de un contaminante azo modelo (orange II) con peróxido de hidrógeno (P) en presencia de una enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) en fase homogénea. Parte del presente Capítulo fue publicado en la revista *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 25. pag, 19989-20002. Año: 2018.

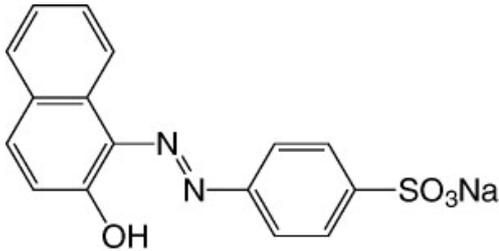
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Reactivos

El orange II (OII) fue adquirido a Sigma Aldrich como sal sódica. En la Tabla 3.1 se muestra la estructura química y las principales características del orange II. La peroxidasa de

rábano picante (HRP) (Tipo I, RZ = 1) fue provista por Sigma Aldrich. La enzima comercial consistía en un polvo liofilizado el cual se usó sin purificación adicional. Según el fabricante, la actividad específica del liofilizado era de 146 unidades/mg del polvo sólido (una unidad corresponde a la cantidad de enzima que forma 1 mg de purpurogalina de pirogalol en 20 segundos a pH 6 y 20 °C). El peróxido de hidrógeno (30% p/p) era Sigma Aldrich. Todas las demás sales utilizadas en este trabajo fueron adquiridas a Anedra (San Fernando, Argentina). Para más detalles, revisar lista de sustancias y reactivos del Capítulo 2.

Tabla 3.1. Estructura y principales propiedades del orange II (OII).

| | |
|---------------------|---|
| Nombre: | Orange II |
| Estructura química: |  |
| Fórmula molecular: | $C_{16}H_{11}N_2NaO_4S$ |
| Peso molecular: | 350.32 g/mol |
| pK _a : | pK ₁ = 1.0; pK ₂ = 11.4 |
| Solubilidad: | 116 g/L a 30 °C |

Fuente: (Gil y col., 2011; Inchaurredo y col., 2016)

3.2.2. Procedimiento experimental

Todos los experimentos de decoloración de OII se llevaron a cabo en buffer fosfato (BF) 100 mM a pH 5 - 10, y a temperatura ambiente ($T = 20 \pm 2$ °C). Los ensayos consistían

en llenar cubetas de cuarzo (de 3 mL) con 2 mL de una solución de HRP (37 - 150 mgHRP/L) y 100 μ L de OII (0.5 - 2 mM). Finalmente, la reacción era iniciada adicionando 100 μ L de P (0.25 - 100 mM). De acuerdo con este procedimiento, las concentraciones iniciales en la mezcla de reacción eran: 34 - 136 mg/L de HRP, 0.02 - 0.1 mM de OII y 0.01 - 4.7 mM de P. Cabe destacar que se verificó que las soluciones de enzima almacenadas a 4 °C eran estables durante no más de una semana. Por tanto, se preparaba una nueva solución de HRP cada vez que se iba a realizar un ensayo.

Se realizaron además ensayos de reutilización de la enzima a temperatura ambiente y pH 9 en buffer fosfato (100 mM). Los ensayos consistían en llenar una cubeta de cuarzo con 2mL de una solución de HRP (150 mg/L) y 100 μ L de OII (2 mM). La reacción se inició con la adición de 100 μ L de P (2 mM). La reacción de decoloración se monitoreó mediante el cambio de la absorbancia a 485 nm en función del tiempo. Cuando la absorbancia alcanzó un valor constante debido al agotamiento de peróxido de hidrógeno o del orange II, según el caso, se realizaron adiciones repetitivas de 50 μ L de OII (2 mM) o 50 μ L de P (2 mM).

3.2.3. Mediciones y cálculos

A tiempos dados, fueron registrados los espectros UV/Visible en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800. La cinética de decoloración se siguió mediante la absorbancia de la mezcla de reacción a 485 nm. Todos los ensayos eran medidos contra BF (100 mM) al pH correspondiente. La velocidad inicial de decoloración (V_{D0} , a.u/min) se obtuvo a partir de la pendiente de la curva de absorbancia (A , u.a) en función del tiempo (t , min). Luego, se calculó la velocidad inicial específica de decoloración (q_0 , u.a.L/min/mgHRP) como el cociente entre V_{D0} y la concentración de enzima en la mezcla de reacción (HRP_T , mgHRP/L). Todos los cálculos fueron realizados en el programa SigmaPlot (Versión 14.0/2018. Systat Software Inc.).

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Cambios en el espectro UV/Vis de la mezcla de reacción en función del tiempo

La Figura 3.1 muestra los espectros UV/Vis correspondientes al orange II (OII), la enzima (HRP) y el peróxido de hidrógeno (P) en buffer fosfato (100 mM) a pH 7. Dentro del rango visible, el OII exhibe dos bandas de absorción a 485 y 430 nm, las cuales corresponden a las formas tautoméricas hidrazona y azo del colorante, respectivamente (Fig. 3.1a). Las bandas a 230 y 310 nm están relacionadas con los anillos benceno y naftaleno del OII (Zhou y col., 2016). Además, los resultados obtenidos indicaron que el espectro del OII era constante entre pH 5 y 10, sugiriendo que el pKa del OII debe ser mayor a 10. Estos resultados son consistentes con los informados por Oakes y Gratton (1998); de acuerdo a dichos autores, el pKa del OII es 11.4. Por otra parte, las absorbancias aportadas por la HRP y el P resultaron significativas solamente a longitudes de onda (λ) menores a 300 nm (Fig. 3.1b,c).

A partir de los datos mostrados en la Figura 3.1 y considerando la concentración mínima de OII (0.02 mM) y las máximas de HRP (136 mg/L) y P (4.7 mM) estudiadas, se calculó la absorbancia que aportaba cada especie a la absorbancia total. En el Inserto de la Figura 3.1 se observa que a 485 nm el OII es responsable de más del 95% de la absorbancia total, siendo las absorbancias correspondientes a HRP y P menores a 0.01 u.a. Este resultado indicó que aún en la condición experimental más desfavorable para la determinación espectrofotométrica de OII, la absorbancia a 485 nm (A_{485}) de la mezcla de reacción puede ser empleada como una medida de OII. Resultados similares fueron informados por otros autores (Rache y col., 2014). Con base a estos resultados, se obtuvo un valor de 19.5 ± 0.3 a.u/cm/mM para el coeficiente de extinción molar del orange II a 485 nm (ϵ_{OII}) dentro del intervalo de pH estudiado.

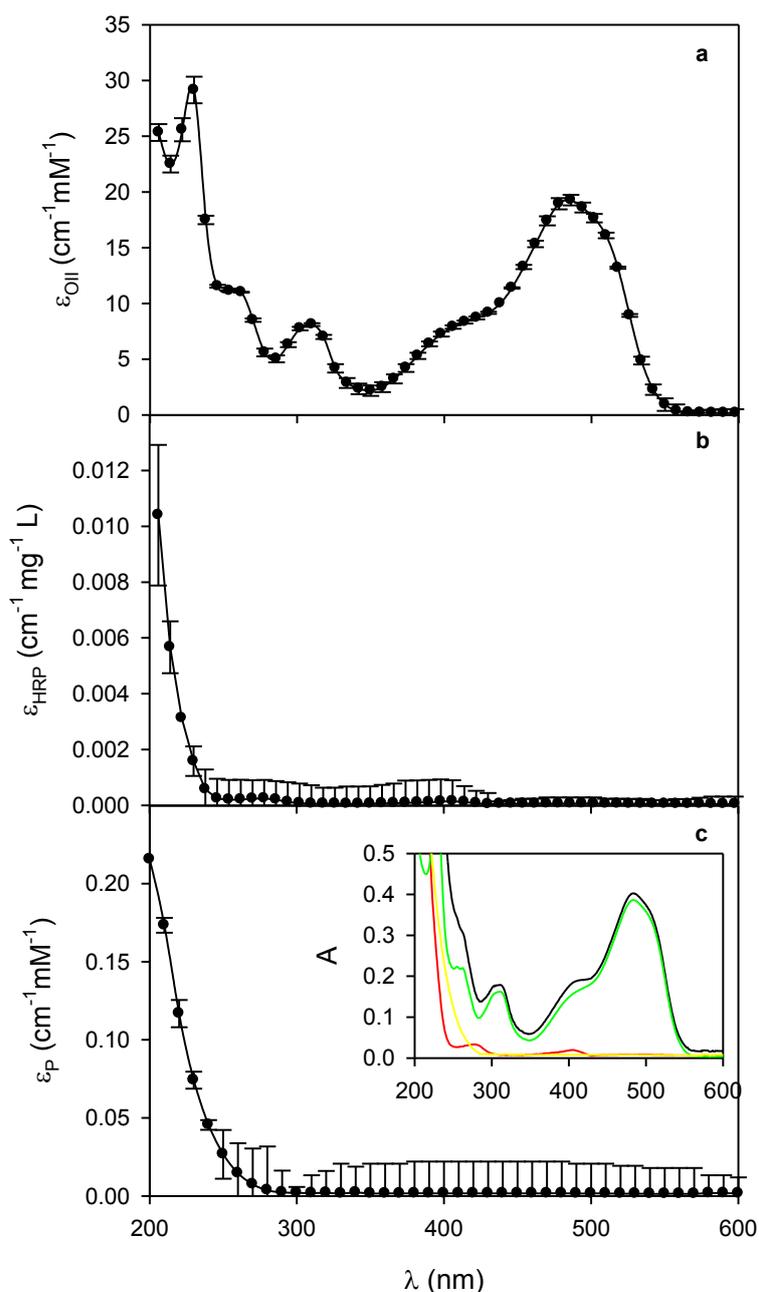


Figura 3.1. Espectro UV/Vis correspondiente a orange II (OII) (a), enzima (HRP) (b) y peróxido de hidrógeno (P) (c) en buffer fosfato (100 mM) a pH 7. Las barras indican el intervalo con un nivel de confianza del 95%. Inseto: Absorbancias (A) calculadas con las siguientes concentraciones: OII = 0.02 mM (verde), HRP = 136 mg/L (rojo), P = 4.7 mM (amarillo). La línea negra representa la A total de la mezcla de reacción.

Una vez establecida la utilidad de la A_{485} para seguir el curso de la reacción de decoloración, se realizaron ensayos control de decoloración de soluciones de OII en ausencia de HRP y en presencia de P (0.2 mM). Los resultados demostraron que a temperatura ambiente y pH 8, el colorante era estable al menos durante 72 hs. Además, se observó que en ausencia de OII, la enzima recién preparada no era capaz de descomponer el P en forma significativa dentro de las 24 h. Este último resultado indica que la actividad catalásica (es decir, la capacidad de catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno) de la peroxidasa estudiada no era significativa en ausencia de un sustrato oxidable adecuado, tal como el OII, en las condiciones estudiadas.

La Figura 3.2a muestra el cambio del espectro UV/Vis de la mezcla de reacción durante un experimento típico de decoloración de OII. Como regla general, se observó una disminución de las bandas de absorción características del OII. Además, a medida que transcurría la reacción apareció una nueva banda alrededor de los 340 nm debido a la formación de productos de oxidación (PO). En la Figura 3.2a se pueden observar al menos 3 puntos isobéuticos a 290, 320 y 375 nm. Los puntos isobéuticos aparecen cuando un reactivo cromóforo es convertido cuantitativamente en un cierto producto, el cual tiene un espectro diferente al reactivo (Berlett y col., 2000). Si los espectros del reactivo y del producto se cortan en n puntos, se puede demostrar matemáticamente que el espectro de la mezcla de reacción en cualquier instante también corta a los espectros del reactivo y del producto en los mismos n puntos. Así, en las condiciones ensayadas, la presencia de tales puntos (Figura 3.2a) sugiere una estequiometría constante entre reactivos (OII) y productos de oxidación (PO) (Berlett y col., 2000).

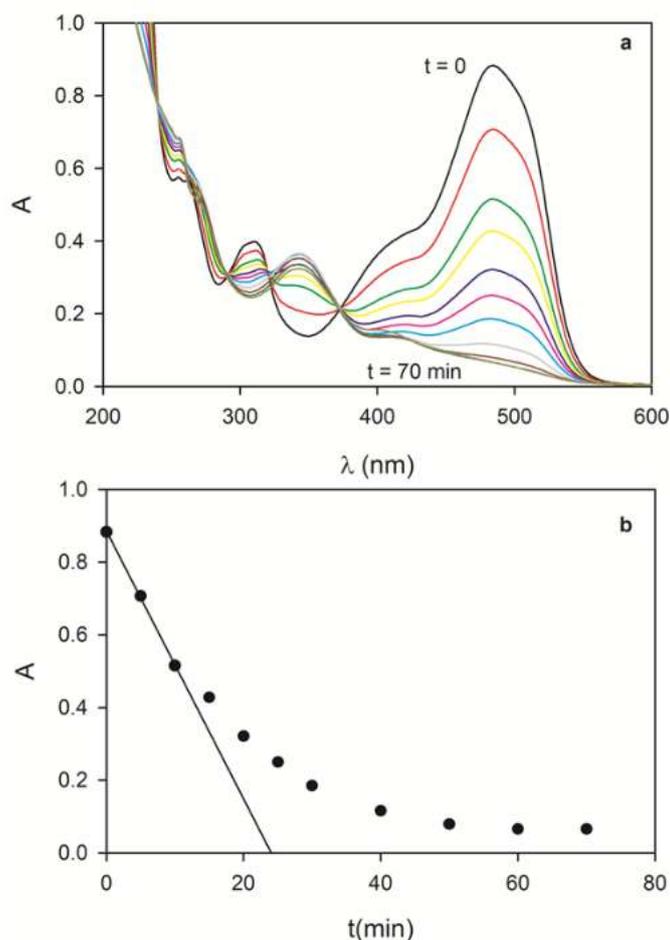


Figura 3.2. a) cambios del espectro UV/Vis durante un experimento típico de decoloración de OII. Condiciones experimentales: OII = 0.045 mM, peróxido de hidrógeno = 0.090 mM, HRP = 136 mgHRP/L, pH = 6. b) Cambio de la absorbancia a 485 nm en función del tiempo. La línea continua indica la regresión lineal de los primeros. La pendiente corresponde a la velocidad inicial de decoloración (V_{0D}) en las condiciones ensayadas.

La Figura 3.2b muestra que la absorbancia a 485 nm disminuyó en función del tiempo hasta un cierto valor final (A_f). Para verificar si la reacción se detuvo debido al agotamiento del oxidante, se añadió peróxido de hidrógeno a la mezcla de reacción. Sin embargo, los valores de absorbancia se mantuvieron constantes, lo que sugirió que el

peróxido de hidrógeno estaba en exceso respecto al OII. Por tanto, esta absorbancia final se debía a la presencia de PO, los cuales en las condiciones probadas no se pueden oxidar más con peróxido de hidrógeno. En este sentido, diferentes autores informaron acerca de la formación de intermediarios refractarios durante la oxidación enzimática de OII. Por ejemplo, Lopez y col. (2004) demostraron que los principales productos de oxidación (PO) de OII por peróxido de hidrógeno en presencia de una manganeso peroxidasa eran 4-diazonio benceno sulfonato y 4-hidroxibenceno sulfonato. Asimismo, también reportaron otros PO menores, tales como 4-aminobencenosulfonato y 1,2-naftoquinona. Recientemente, Cabrera y col. (2017) informaron los siguientes PO durante la oxidación de OII con peróxido de hidrógeno en presencia de hematina (un sistema biomimético para HRP): 1-amino 2-naftol, sulfanilato, 1-diazo 2-naftol, 1,2-naftoquinona, 4- hidroxibenceno sulfonato, 4-diazobenceno sulfonato y anilina.

3.3.2. Efecto del pH y la concentración inicial de peróxido de hidrógeno en el grado de decoloración de OII

En la Figura 3.3a se muestran algunos ejemplos de cinéticas de decoloración de OII en diferentes condiciones. En términos generales se observa que la absorbancia a 485 nm (A_{485}) disminuía rápidamente hasta estabilizarse en un cierto valor mínimo (A_f). Para una concentración inicial constante de OII (S_0), el valor de A_f disminuía con el incremento de la concentración inicial de peróxido (P_0). Se demostró además que en algunos casos la decoloración seguía si se realizaba un nuevo agregado de P a la mezcla de reacción. Esto demostró que, en estos casos, la decoloración se detenía porque se había consumido el peróxido agregado inicialmente.

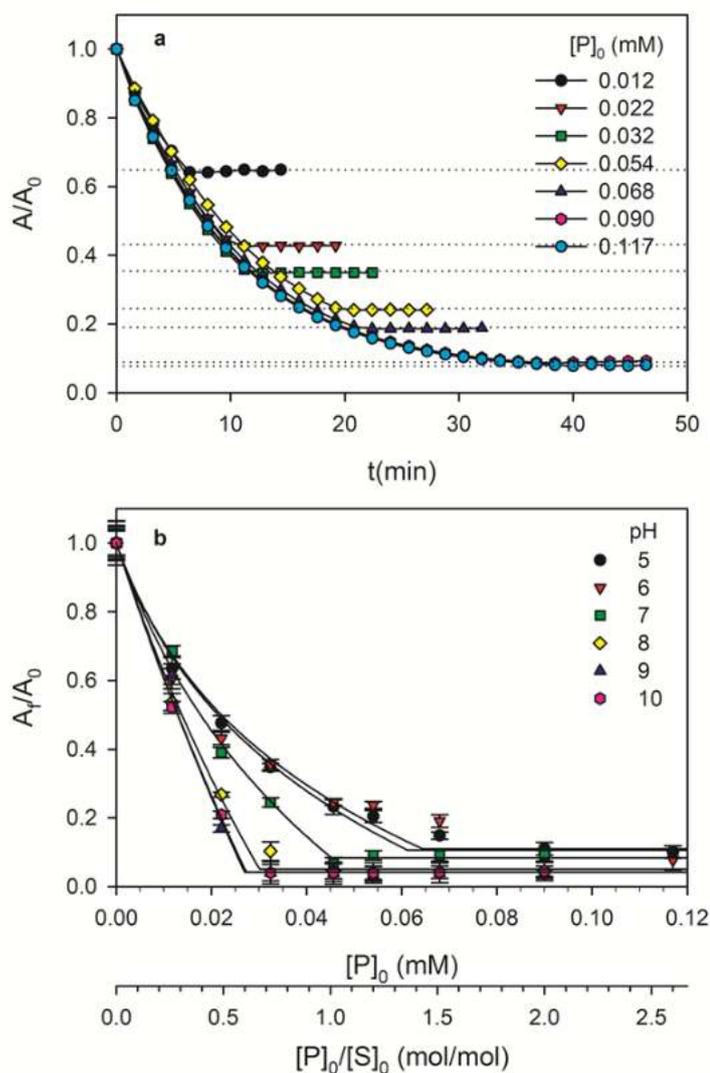


Figura 3.3. a) Ejemplos de reacciones de decoloración de OII para diferentes concentraciones iniciales de peróxido de hidrógeno (P_0). En este ejemplo: $\text{pH} = 6$, $S_0 = 0.045$ mM, $\text{HRP}_T = 136$ mg/L, $\lambda = 485$ nm. Las líneas punteadas representan el cociente A_t/A_0 correspondiente a cada caso. b) Variación de cociente A_t/A_0 en función de P_0 a diferentes pHs. En todos los casos $S_0 = 0.045$ mM. Las líneas continuas en representan los resultados del modelo desarrollado empleando los coeficientes de la Tabla 3.2. Las barras indican la desviación estándar.

Por otra parte, la Figura 3.3b muestra que a partir de una cierta relación P_0/S_0 crítica, la A_f se estabilizaba en un cierto valor mínimo (A_{\min}). Los experimentos demostraron que el valor de A_{\min} era proporcional a la concentración inicial de OII, sugiriendo que esta absorbancia mínima era debido a la presencia de productos de oxidación (PO). Además, los resultados obtenidos mostraron que tanto A_{\min} como la relación P_0/S_0 crítica (Fig. 3.3b), así como los espectros finales (obtenidos a las 24 hs de reacción), eran función del pH, indicando que el conjunto de productos formados durante la reacción de decoloración eran función del pH.

3.3.3. Efecto del pH y de la concentración inicial de oxidante, enzima y orange II sobre la velocidad de decoloración.

La Figura 3.4 muestra el efecto de las concentraciones iniciales de peróxido de hidrógeno (P_0) y de Orange II (S_0) sobre la velocidad inicial específica de decoloración (q_0) a diferentes pHs. Para todos los pHs estudiados se observó que los valores de q_0 eran poco afectados por P_0 cuando se empleaban concentraciones de peróxido menores a 0.2 mM. Además, dentro de este intervalo de concentraciones iniciales de peróxido se obtuvieron los máximos valores de q_0 . Nótese de la Figura 3.4 que valores de P_0 mayores a 0.2 mM inhibieron a la enzima, siendo este efecto más notorio a pH menor a 8. Es decir, los resultados sugieren que el pH no solo influye en la velocidad específica inicial de decoloración (q_0) sino en el efecto inhibitorio del peróxido en la reacción de decoloración.

Por otra parte, la Figura 3.4 muestra que q_0 se incrementó en función de la concentración inicial de OII (S_0) dentro del rango estudiado ($S_0 = 0.022 - 0.090$ mM). De acuerdo a los resultados mostrados en la Figura 3.4, para P_0 comprendido entre 0.02 y 0.20 mM se obtuvieron los valores máximos de velocidad específica inicial de decoloración ($q_{0\max}$). A partir de estos datos, en la Figura 3.5 se graficaron los valores de $q_{0\max}$ en función

del pH para los diferentes valores ensayados de S_0 . Nótese que q_{0max} se incrementó en función de S_0 y además, ascendió considerablemente a partir de pH 7 hasta pH 10.

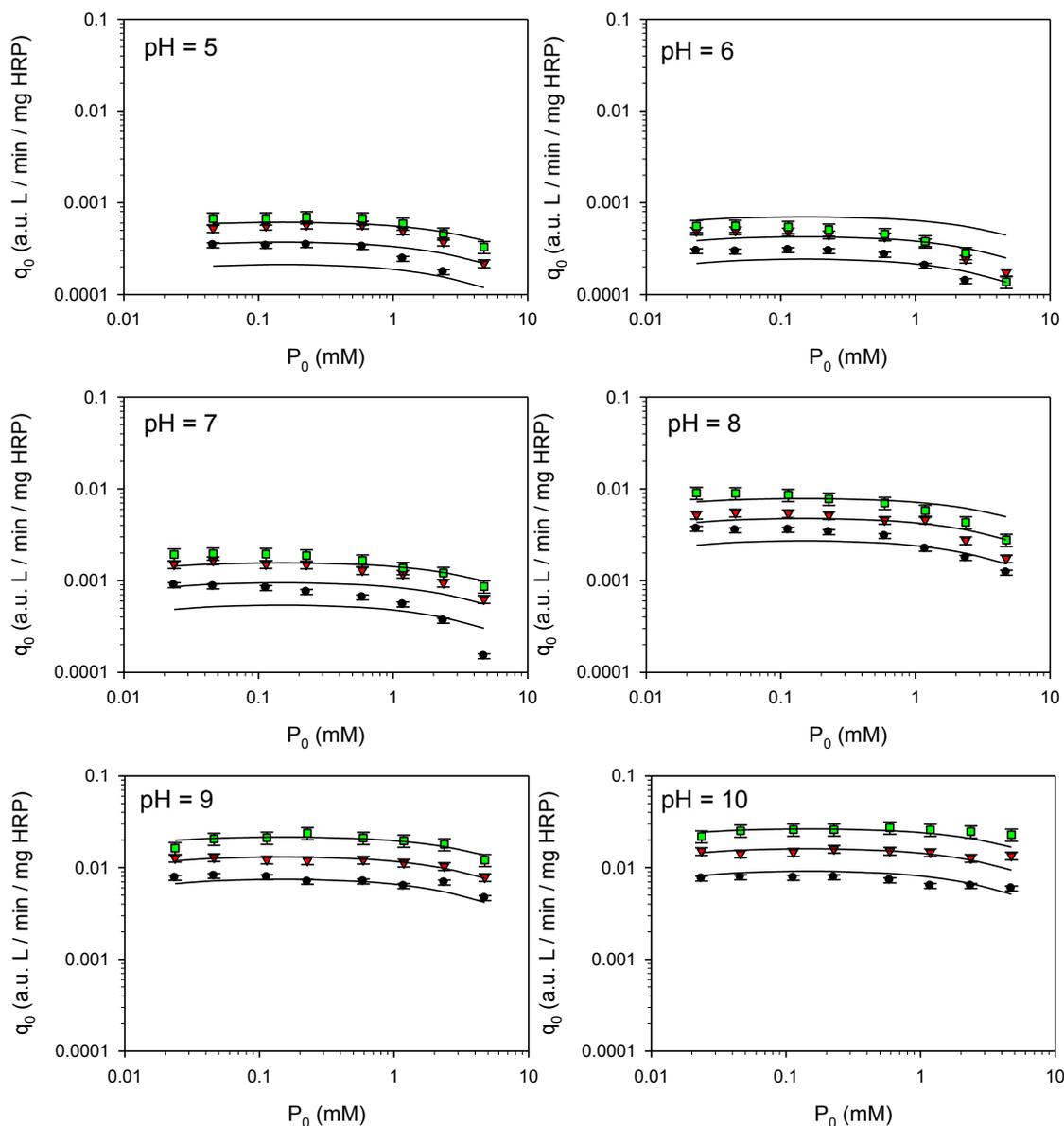


Figura 3.4. Efecto de la concentración inicial de peróxido de hidrógeno (P_0) y colorante (S_0) sobre la velocidad específica inicial de decoloración (q_0) para diferentes valores de pH. Los valores S_0 fueron 0.023 mM (círculos negros), 0.045 mM (triángulos rojos) y 0.090 mM (cuadros verdes). Las barras representan la desviación estándar. La línea continua representa el modelo propuesto empleando los coeficientes de las Tablas 3.2 y 3.3.

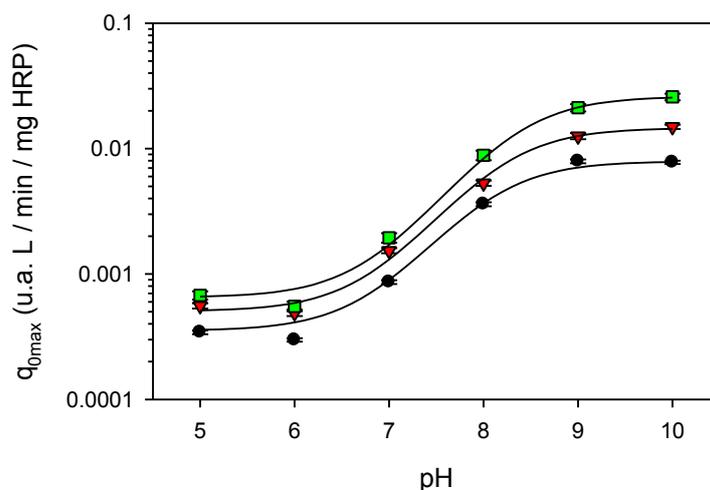


Figura 3.5. Efecto del pH en la velocidad inicial específica máxima de decoloración (q_{0max}). Los valores de S_0 fueron 0.023 mM (círculos negros), 0,045 mM (triángulos rojos) y 0,090 mM (cuadros verdes). Las barras representan la desviación estándar. La línea continua representa el modelo propuesto empleando los coeficientes de las Tablas 3.2 y 3.3.

3.3.4. Modelado de la cinética de decoloración.

Con base a los resultados obtenidos, se propuso un modelo para representar la cinética de decoloración de orange II (S) con peróxido de hidrógeno (P) en presencia de la enzima peroxidasa (E). El modelo propuesto tuvo en cuenta la inhibición de las peroxidasas por altas concentraciones de P, la actividad catalásica (o sea, la descomposición de P en agua y oxígeno) dependiente de la presencia de sustrato reductor, la generación de productos de oxidación (PO) y el efecto del pH sobre la velocidad de decoloración. Además, para representar el efecto del pH se asumió que la enzima puede estar en dos estados: no disociado (HE) o disociado (E) y que el equilibrio entre ambos estados está gobernado por el pH. De acuerdo con estas consideraciones, se propuso el siguiente esquema de reacciones:



Se asumió que las reacciones 3.R1, 3.R2, 3.R5, 3.R1h, 3.R2h y 3.R5h eran reversibles, siendo K_P , K_S , K_I , K_{Ph} , K_{Sh} , K_{Ih} sus respectivas constantes de equilibrio. Con el objeto de reducir la complejidad matemática, se asumió un equilibrio instantáneo de estas reacciones. Además, se asumió que todas las especies enzimáticas (disociadas y no disociadas) están relacionadas por equilibrios ácido/base, los cuales también se consideran alcanzados instantáneamente. Por simplicidad, se consideró el siguiente equilibrio:



Puede demostrarse que los equilibrios ácido/base correspondientes a todas las demás formas enzimáticas pueden deducirse a partir de combinaciones apropiadas de la ec. (3.R7) con las reacciones reversibles 3.R1, 3.R2, 3.R5, 3.R1h, 3.R2h y 3.R5h. Por esta razón, sólo se necesita un único equilibrio ácido/base (por ejemplo, 3.R7) para definir completamente la distribución de todas las especies enzimáticas en función del pH.

Las reacciones 3.R1 a 3.R6 y 3.R1h a 3.R6h representan el mecanismo de reacción correspondiente a los estados disociado y no disociado de la enzima, respectivamente. El mecanismo clásico Dunford está representado por las reacciones 3.R1 a 3.R4 y 3.R1h a 3.R4h. Aunque el producto primario de estas reacciones es un radical S^* , los radicales formados pueden reaccionar tanto entre sí, como también con el oxígeno disuelto, resultando en una mezcla compleja de productos de oxidación (PO) (Lopez y col., 2004; Chahbane y col., 2007; Gómez y col., 2008). Además, la distribución de estos PO, o sea, la cantidad relativa de X e Y en el presente modelo, puede ser una función del pH. Por esta razón, en el presente modelo las especies X e Y representan el conjunto de productos de oxidación obtenidos durante la oxidación de S en condiciones básicas (3.R3, 3.R4) o ácidas (3.R3h, 3.R4h), respectivamente. Por otro lado, la inhibición de la actividad enzimática por P está representada por 3.R5 y 3.R5h. Finalmente, las reacciones 3.R6 y 3.R6h tienen en cuenta la descomposición enzimática de P. Debido a que la presencia de un sustrato reductor (S) es necesario para producir el complejo enzima-sustrato (3.R2, 3.R2h), según el modelo propuesto la descomposición enzimática de P sólo se produce bajo la presencia de S (3.R6, 3.R6h).

Para simplificar el número de especies enzimáticas, se asumió que 3.R4 y 3.R4h son mucho más rápidas que 3.R3 y 3.R3h, respectivamente. De acuerdo a esto, las concentraciones de E_2 y HE_2 son insignificantes. Combinando 3.R3 con 3.R4 y 3.R3h con 3.R4h se obtiene:



Como 3.R3 y 3.R3h son las etapas limitantes de la velocidad de 3.R8 (V_{R8}) y 3.R8h (V_{R8h}):

$$V_{R8} = V_{R3} = k_c[E_1S] \quad (3.1)$$

$$V_{R8h} = V_{R3h} = k_{ch}[HE_1S] \quad (3.2)$$

De acuerdo con las consideraciones anteriores, las velocidades de reacción correspondientes al sustrato reductor (S), peróxido de hidrógeno (P) y los productos de oxidación (X, Y) son:

$$-\frac{d[S]}{dt} = 2k_c[E_1S] + 2k_{ch}[HE_1S] \quad (3.3)$$

$$-\frac{d[P]}{dt} = (k_c + 2k_d[P])[E_1S] + (k_{ch} + 2k_{dh}[P])[HE_1S] \quad (3.4)$$

$$\frac{d[X]}{dt} = 2k_c[E_1S] \quad (3.5)$$

$$\frac{d[Y]}{dt} = 2k_{ch}[HE_1S] \quad (3.6)$$

Los términos $2k_d[P]$ y $2k_{dh}[P]$ en la ec. (3.4) surgen del hecho de que una molécula de P se consume durante la producción de E_1S o HE_1S (3.R2, 3.R2h) mientras que otra se consume durante su descomposición en agua y oxígeno molecular (3.R6, 3.R6h). Si la actividad catalásica de E es despreciable ($k_d = 0$, $k_{dh} = 0$), el modelo propuesto se reduce al mecanismo clásico de Dunford, en el cual una molécula de peróxido oxida a dos moléculas de sustrato reductor.

Por otra parte, el balance de masa para la enzima es:

$$E_T = [E_0] + [E_1] + [E_1P] + [E_1S] + [HE_0] + [HE_1] + [HE_1P] + [HE_1S] \quad (3.7)$$

donde E_T es la concentración total de enzima. Combinando la ec. (3.7) con las definiciones de las constantes de equilibrio y resolviendo para $[E_1S]$ se obtiene la ec. (3.8):

$$[E_1S] = E_T \left(\frac{K_S K_P [S][P]}{\left(1 + \frac{H}{K_a}\right) + (K_P + K_{Ph} \frac{H}{K_a})[P] + (K_P K_I + K_{Ih} K_{Ph} \frac{H}{K_a})[P]^2 + (K_S K_P + K_{Sh} K_{Ph} \frac{H}{K_a})[S][P]} \right) \quad (3.8)$$

A partir de las definiciones de las constantes de equilibrio K_S , K_P , K_{Sh} , K_{Ph} y K_a se puede obtener la siguiente expresión:

$$\frac{[HE_1S]}{[E_1S]} = \frac{K_{Sh} K_{Ph} H}{K_S K_P K_a} \quad (3.9)$$

Finalmente, combinando las ecs. (3.3) a (3.6) con (3.8) y (3.9), se pueden obtener las ecs. (3.10) a (3.13):

$$-\frac{d[S]}{dt} = 2 \left(k_c + k_{ch} \frac{K_{Sh} K_{Ph} H}{K_S K_P K_a} \right) [E_1S] \quad (3.10)$$

$$-\frac{d[P]}{dt} = \left[(k_c + 2k_d[P]) + (k_{ch} + 2k_{dh}[P]) \frac{K_{Sh} K_{Ph} H}{K_S K_P K_a} \right] [E_1S] \quad (3.11)$$

$$\frac{d[X]}{dt} = 2k_c [E_1S] \quad (3.12)$$

$$\frac{d[Y]}{dt} = 2k_{ch} \frac{K_{Sh} K_{Ph} H}{K_S K_P K_a} [E_1S] \quad (3.13)$$

3.3.5. Obtención de los coeficientes del modelo propuesto

Aspectos estequiométricos

La cantidad de peróxido de hidrógeno necesaria para la oxidación de un sustrato dado ($Y_{p/S}$) es un parámetro clave en el diseño de sistemas de eliminación de color de aguas residuales industriales. Como regla general, cuando se utiliza peróxido de hidrógeno como agente oxidante en la decoloración de aguas residuales, este se consume durante la reacción de decoloración (3.R3, 3.R3h, 3.R4, 3.R4h), así como en su descomposición en agua y oxígeno (3.R6, 3.R6h). Entonces, su consumo dependerá de las velocidades relativas de estas dos reacciones, que a su vez también dependen de factores como el pH y las concentraciones iniciales de peróxido de hidrógeno y el sustrato reductor. Así pues, en esta sección se estudia la estequiometría de la decoloración de OII con peróxido de hidrógeno en presencia de HRP ($Y_{p/S}$).

Los resultados obtenidos demuestran que la absorbancia a 485 nm de la mezcla de reacción dependía de la concentración del colorante y de los productos de oxidación obtenidos. Por lo tanto, en términos del modelo propuesto, la absorbancia (A) de la mezcla de reacción es función de la concentración de colorante (S) y de los productos de oxidación X e Y :

$$A = \varepsilon_S[S] + \varepsilon_X[X] + \varepsilon_Y[Y] \quad (3.14)$$

donde ε_S , ε_X y ε_Y son los coeficientes de extinción molar de S , X and Y , respectivamente. Debe notarse que como X e Y representan una mezcla de productos obtenidos en condiciones básicas o ácidas, ε_X y ε_Y son en realidad coeficientes de extinción aparentes. A partir de las ecs. (3.10), (3.12) y (3.13), las concentraciones de S , X e Y se pueden relacionar de la siguiente forma:

$$-\frac{d[X]}{d[S]} = \frac{k_c}{k_c + k_{ch} \frac{K_{HS} K_{HP} H}{K_S K_P K_a}} = \frac{K_{ap}}{K_{ap} + H} \quad (3.15)$$

$$-\frac{d[Y]}{d[S]} = \frac{k_{ch} \frac{K_{HS} K_{HP} H}{K_S K_P K_a}}{k_c + k_{ch} \frac{K_{HS} K_{HP} H}{K_S K_P K_a}} = \frac{H}{K_{ap} + H} \quad (3.16)$$

donde $K_{ap} = K_a \frac{K_S K_P}{K_{HS} K_{HP}} \frac{k_c}{k_{ch}}$ es una constante de disociación aparente.

Teniendo en cuenta que los ensayos de decoloración se realizaron a pH constante, y asumiendo que la mezcla de reacción al inicio del experimento estaba desprovista de productos de oxidación ($[X]_0 = [Y]_0 = 0$), a partir de la integración de las ecs. (3.15) y (3.16) se obtuvieron las siguientes expresiones:

$$[X] = \frac{K_{ap}}{K_{ap} + H} ([S]_0 - [S]) \quad (3.17)$$

$$[Y] = \frac{H}{K_{ap} + H} ([S]_0 - [S]) \quad (3.18)$$

donde $[S]_0$ es la concentración inicial del sustrato reductor.

Combinando, las ecuaciones (3.14), (3.17) y (3.18), el cociente A/A_0 resulta

$$\frac{A}{A_0} = \frac{[S]}{[S]_0} + r_f \frac{([S]_0 - [S])}{[S]_0} \quad (3.19)$$

con

$$r_f = r_{fOH} \left(\frac{K_{ap}}{K_{ap} + H} \right) + r_{fH} \left(\frac{H}{K_{ap} + H} \right) \quad (3.20)$$

donde $r_{fOH} = \frac{\varepsilon_X}{\varepsilon_S}$ y $r_{fH} = \frac{\varepsilon_Y}{\varepsilon_S}$ son los valores de r_f en condiciones básicas y ácidas, respectivamente.

Como [S] se consume durante la reacción, la relación A/A_0 también cambia con el tiempo (Fig. 3.3a). Sin embargo, para tiempos suficientemente largos esta relación tiende a un valor constante A_f/A_0 , lo que indica que se detuvo la reacción. La Figura 3.3b muestra que la relación A_f/A_0 disminuye a medida que aumenta la concentración inicial de P. Sin embargo, a partir de una cierta concentración crítica de P ($[P]_C$), aumentos adicionales de P no producen mayores reducciones de la relación A_f/A_0 . Esto indica que cuando $[P]_0$ es mayor a P_C , el peróxido de hidrógeno está en exceso con respecto a S. En otras palabras, se agregó una concentración de P lo suficientemente elevada como para oxidar completamente S.

De acuerdo con la ec. (3.19), la relación A_f/A_0 más baja que se puede lograr corresponde a la eliminación completa de S ($[S]_f = 0$). Por el contrario, cuando S está en exceso con respecto a P ($[P]_0 < [P]_C$), el peróxido de hidrógeno se consume por completo ($[P]_f = 0$) mientras que permanece en solución una cierta concentración final del sustrato reductor ($[S]_f$). Haciendo el cociente entre las ecs. (3.10) y (3.11), y reordenando, se puede obtener la siguiente expresión:

$$\frac{d[P]}{d[S]} = \frac{1}{2} + \alpha[P] \quad (3.21)$$

con

$$\alpha = \frac{\left(k_a + k_{dh} \frac{K_{Sh} K_{Ph} H}{K_S K_P K_a}\right)}{\left(k_c + k_{ch} \frac{K_{Sh} K_{Ph} H}{K_S K_P K_a}\right)} = \alpha_{OH} \left(\frac{K_{ap}}{K_{ap} + H}\right) + \alpha_H \left(\frac{H}{K_{ap} + H}\right) \quad (3.22)$$

donde $\alpha_{OH} = \frac{k_d}{k_c}$ y $\alpha_H = \frac{k_{dh}}{k_{ch}}$ son los valores de α (mM^{-1}) obtenidos en condiciones básicas y ácidas, respectivamente. De acuerdo con la ec. (3.22), si la reacción de decoloración se realiza a pH constante, α también es una constante. Por lo tanto, trabajando a pH constante se puede integrar la ec. (3.21) para obtener la siguiente expresión:

$$[S]_0 - [S]_f = \frac{1}{\alpha} \ln \left(\frac{1+2\alpha[P]_0}{1+2\alpha[P]_f} \right) \quad (3.23)$$

Para un cierto valor de $[S]_0$, a partir de la ec. (3.23) se puede calcular la concentración inicial mínima de P ($[P]_c$) tal que $[S]_f = 0$ y $[P]_f = 0$:

$$[P]_c = \frac{1}{2\alpha} (e^{\alpha[S]_0} - 1) \quad (3.24)$$

La ec. (3.24) es muy importante ya que define las condiciones de exceso o defecto de $[P]_0$ en relación a $[S]_0$. Cuando $[P]_0 < [P]_c$, $[P]_f = 0$ y puede aplicarse la ec. (3.23) para calcular $[S]_f$. Luego, combinando las ecs. (3.19) y (3.23)

$$\frac{A_f}{A_0} = 1 - (1 - r_f) \frac{1}{\alpha[S]_0} \ln(1 + 2\alpha[P]_0) \quad (3.25)$$

De acuerdo con la ec. (3.25), en condiciones de exceso de S la relación $\frac{A_f}{A_0}$ disminuye a medida que $[P]_0$ aumenta. Sin embargo, cuando $[P]_0 \geq [P]_c$, el sustrato se agota completamente $[S]_f = 0$ y por lo tanto, no se conseguirá una disminución adicional de la relación $\frac{A_f}{A_0}$:

$$\frac{A_f}{A_0} = \begin{cases} 1 - (1 - r_f) \frac{1}{\alpha[S]_0} \ln(1 + 2\alpha[P]_0) & [P]_0 < [P]_c \\ r_f [P]_0 & [P]_0 \geq [P]_c \end{cases} \quad (3.26)$$

donde r_f (ec. 3.20) y α (ec. 3.22) son función del pH.

Con el objeto de obtener los coeficientes r_{fOH} , r_{fH} , α_{OH} , α_H y K_{ap} , las ecs.(3.20), (3.22) y (3.26) se ajustaron simultáneamente a los datos experimentales que se muestran en la Figura 3.3b. De acuerdo a los resultados de ajuste mostrados en la Tabla 3.2 y teniendo en cuenta la ec. (3.22), el valor de α esta comprendido entre $\alpha_{OH} = 7.8 \text{ mM}^{-1}$ ($\text{pH} > \text{pK}_{ap}$) y $\alpha_H = 40.9 \text{ mM}^{-1}$ ($\text{pH} < \text{pK}_{ap}$). Debe tenerse en cuenta que el coeficiente α es una medida de la relación entre el consumo de P debido a las reacciones de descomposición y su consumo en reacciones de decoloración. Por lo tanto, a partir de los datos de la Tabla 3.2 se concluye que la contribución de las reacciones de descomposición al consumo total de P disminuye a medida que aumenta el pH. En otras palabras, trabajando a $\text{pH} > \text{pK}_{ap}$ se logra una mejor eficiencia de utilización de P para la reacción de decoloración.

Desde un punto de vista práctico, el coeficiente r_f representa la máxima decoloración posible, es decir, el valor más bajo de la relación A_f/A_0 que se puede alcanzar bajo el exceso de peróxido. De acuerdo con la Figura 3.3b, para valores de pH superiores a 7 y usando una relación inicial $P_0/S_0 > 0.6 \text{ mol/mol}$, se obtuvo una decoloración máxima de aproximadamente el 95%. En este sentido, López (2005) estudió la decoloración de OII por una peroxidasa de manganeso, reportando una decoloración entre 80 y 90% cuando la relación P_0/S_0 era de aproximadamente 1 mol/mol. Además, dicho autor informa que al aumentar la relación P_0/S_0 no obtuvieron niveles de decoloración más altos. Chiong y col. (2016) estudiaron la decoloración de soluciones de naranja de metilo por peroxidases extraídas de biodesechos de cáscaras de piel de soja y luffa (*Luffa acutangula*). Esos autores informaron un nivel máximo de decoloración del 81% con la peroxidasa de soja utilizando

una relación $P_0/S_0 = 22$ mol/mol, la cual es aproximadamente 35 veces mayor que la utilizada en el presente trabajo.

Tabla 3.2. Resultados del ajuste de las ecs.(3.20), (3.22) y (3.26) a los datos de la Figura 3.3b.

| Coeficiente | Unidades | Valor |
|---------------|------------------|--------------------------------|
| r_{fOH} | Adimensional | 0.041 ± 0.008 |
| r_{fH} | Adimensional | 0.115 ± 0.012 |
| α_{OH} | mM^{-1} | 7.8 ± 1.5 |
| α_H | mM^{-1} | 40.9 ± 1.8 |
| K_{ap} | M | $(6.3 \pm 1.8) \times 10^{-8}$ |

El coeficiente estequiométrico observable para la reacción de oxidación de OII (S) por peróxido de hidrógeno (P) catalizada por E ($Y_{P/S}$), es la cantidad de P consumida por unidad de S oxidado. De acuerdo a esta definición:

$$Y_{P/S} = \frac{[P]_0 - [P]_f}{[S]_0 - [S]_f} \quad (3.27)$$

donde los subíndices 0 y f indican concentraciones iniciales y finales, respectivamente.

En los casos en que $[P]_0 < [P]_C$, $[P]_f = 0$. Por lo tanto, a partir de la relación experimental A_f/A_0 y reordenando la ec. (3.27) se puede calcular el término $[S]_0 - [S]_f$. Por el contrario, cuando $[P]_0 \geq [P]_C$, por definición $[S]_f = 0$. En este caso, $[P]_f$ puede calcularse mediante la ec. (3.23). Finalmente, $Y_{P/S}$ se calculó usando la ec. (3.27) (Fig.3.6,

puntos experimentales). Por otra parte, como se conoce α (Tabla 3.2), el coeficiente estequiométrico observable para la reacción de decoloración S por E ($Y_{P/S}$) se puede calcular de la siguiente manera:

$$Y_{P/S} = \begin{cases} \frac{\alpha[P]_0}{\ln(1+2\alpha[P]_0)} [P]_0 < [P]_C \\ \frac{[P]_0 - \frac{1}{2\alpha}[(1+2\alpha[P]_0)e^{-\alpha[P]_0} - 1]}{[S]_0} [P]_0 \geq [P]_C \end{cases} \quad (3.28)$$

donde $[P]_C$ viene dado por la ec. (3.24). En la Figura 3.6 se grafican los resultados del cálculo.

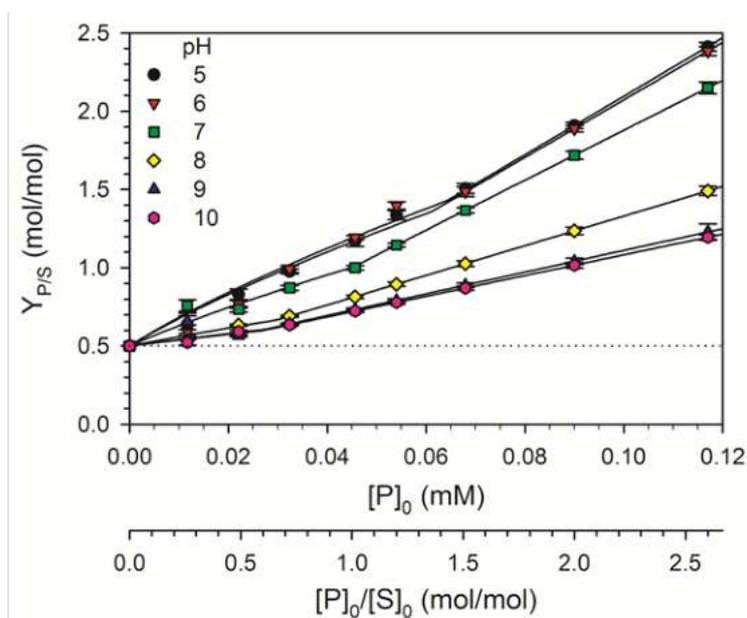


Figura 3.6. Coeficiente estequiométrico observable ($Y_{P/S}$) en función de la concentración inicial de peróxido de hidrógeno ($[P]_0$). En todos los casos, $[S]_0 = 0.045$ mM. Las barras representan la desviación estándar. Las líneas representan los resultados de las ecs.(3.22) y (3.28) usando los coeficientes de la Tabla 3.2. La línea punteada indica el valor $Y_{P/S}$ de acuerdo con el mecanismo de Dunford.

Según el mecanismo clásico de Dunford (Fig. 3.6, línea de puntos), se oxidan dos moles del sustrato reductor por mol de peróxido de hidrógeno consumido, lo que corresponde a $Y_{P/S} = 0.5$ mol/mol. La Figura 3.6 muestra que para valores de pH entre 9 y 10, $Y_{P/S}$ varió entre 0.5 y 1.2 mol/mol. Por el contrario, para pH entre 5 y 8 hubo un efecto notable de la concentración inicial de peróxido de hidrógeno en $Y_{P/S}$. Dentro de este rango de pH los valores de $Y_{P/S}$ aumentaron hasta aproximadamente 2.4 mol/mol. Varios autores informaron una relación $Y_{P/S}$ cercana a 1 mol/mol para la eliminación de fenol por peroxidasa (I. D. Buchanan y Nicell, 1997; Wu y col., 1999; I. Buchanan y Han, 2000). Chahbane y col. (2007) informan valores $Y_{P/S}$ entre 1 y 2 mol/mol.

Aspectos cinéticos

Como se mencionó anteriormente, las Figuras 3.4 y 3.5 muestran la dependencia de $[S]_0$ y del pH sobre la velocidad inicial específica de decoloración (q_0). Además, la Figura 3.4 muestra el efecto inhibitorio de P_0 sobre E, el cual es más notorio a pH inferiores a 8 y concentraciones de peróxido mayores a 0.2 mM. Los resultados mostrados en la Figura 3.5 son similares a los reportados por Chahbane y col. (2007). Estos autores encontraron un fuerte incremento en la velocidad de decoloración cuando los valores de pH aumentaron de 5 a 9, siendo la máxima velocidad de decoloración a valores de pH entre 9 y 10. Considerando que los valores de pKa del OII y del peróxido de hidrógeno son 11.4 y 11.7, respectivamente (Oakes y Gratton, 1998), dentro del rango de pH estudiado ambos sustratos se encontraban presentes principalmente como sus respectivas especies no disociadas. Por esta razón, la dependencia observada de q_{0max} en función del pH se atribuyó a la presencia de, al menos, dos especies enzimáticas cuya distribución dependía del pH, en concordancia con las hipótesis del modelo propuesto.

A partir de la ec. (3.19), la velocidad de consumo de sustrato reductor (V_S) y la tasa de decoloración (V_D) se relacionan de la siguiente manera:

$$V_D = (1 - r_f)\varepsilon_S V_S \quad (3.29)$$

donde V_S está dado por la ec. (3.10). Combinando las ecs.(3.10) y (3.29) se puede obtener la expresión para la velocidad específica inicial de decoloración (q_0) en función del pH y de las concentraciones iniciales de S y P:

$$q_0 = 2(1 - r_f)\varepsilon_S \left(k_c + k_{ch} \frac{K_{Sh}K_{Ph}}{K_S K_P} \frac{H}{K_a} \right) \left(\frac{K_S K_P [S]_0 [P]_0}{\left(1 + \frac{H}{K_a}\right) + (K_P + K_{Ph} \frac{H}{K_a}) [P]_0 + (K_P K_I + K_{Ih} K_{Ph} \frac{H}{K_a}) [P]_0^2 + (K_S K_P + K_{Sh} K_{Ph} \frac{H}{K_a}) [S]_0 [P]_0} \right) \quad (3.30)$$

donde r_f es función del pH (ec. 3.20).

Con el objeto de obtener los coeficientes del modelo propuesto, en un primer intento se ajustó la ec. (3.30) a los valores experimentales de q_0 en función de S_0 (0.02 - 0.09 mM), P_0 (0.02 - 4.7 mM) y pH (5 - 10) mostrados en la Figura 3.5. Aunque se obtuvo un ajuste bastante bueno, el coeficiente de variación correspondiente a K_{Ph} fue de 166%, lo que sugería una sobreparametrización del modelo con relación a los datos disponibles. En el desarrollo del modelo, se asumió que las constantes de equilibrio de las dos especies enzimáticas con el peróxido tenían diferente valor, lo cual puede que no sea correcto. Por esta razón, se ajustó la ec. (3.30) a los datos experimentales pero asumiendo que $K_{Ph} = K_P$. Esta aproximación no produjo un incremento en el error cuadrático medio (RMSE) con respecto al primer caso, lo que confirma la sobreparametrización de la ec. (3.30) para representar los datos experimentales, dentro de las condiciones ensayadas. Además, en el segundo caso varios parámetros tuvieron un coeficiente de variación más bajo con respecto

al primer intento de ajuste. Los resultados de este ajuste se muestran en la Tabla 3.3. En un tercer intento de simplificar aún más la ec. (3.30), se asumió que $K_{Ph} = K_P$ y $K_{Sh} = K_S$. Sin embargo, en este caso el RMSE aumentó un 20% con respecto al segundo intento de ajuste, por lo que se descartó esta aproximación.

En la Figura 3.7a se muestran los valores de q_0 calculados mediante la ec. (3.30) (q_{0-fit}) en función de los datos experimentales (q_{0-exp}). El 76% del total de los valores calculados de q_0 tuvieron un error menor al 20%. Además, los valores de q_0 con mayor error relativo se encontraban principalmente para los datos correspondientes a pH menor a 8 (Fig. 3.7b). Esto se debía a que para un pH menor a 8, los valores experimentales de q_0 caían abruptamente (Fig. 3.5) y por lo tanto, el error en relación a estos valores era mayor. Por el contrario, para un pH comprendido entre 8 y 10 la Figura 3.7b indica que los valores de q_0 calculados mediante la ec. (3.30) tienen un error menor al 7%.

Tabla 3.3. Resultados del ajuste de la ec. (3.30) a los datos de la Figura 3.5. Los valores de r_f en función del pH se obtuvieron de la ec. (3.20) empleando los coeficientes de la Tabla 3.2.

| Coefficiente | Valor | Error estándar | CV(%) | RMSE | r² |
|---|----------------------|-----------------------|--------------|-----------------------|----------------------|
| k_c (mmolP mgE ⁻¹ min ⁻¹) | 3.3×10^{-3} | 0.4×10^{-3} | 12.1 | | |
| K_S (mM ⁻¹) | 3.2 | 0.5 | 15.6 | | |
| K_P (mM ⁻¹) | 304 | 89 | 29.3 | | |
| K_I (mM ⁻¹) | 0.051 | 0.012 | 23.5 | | |
| pK _a | 7.89 | 0.07 | 0.9 | 3.50×10^{-4} | 0.992 |
| k_{ch} (mmolP mgE ⁻¹ min ⁻¹) | 2.7×10^{-5} | 0.3×10^{-5} | 11.1 | | |
| K_{Sh} (mM ⁻¹) | 31.6 | 7.3 | 23.1 | | |
| K_{Ph} (mM ⁻¹) | 304 | -- | -- | | |
| K_{Ih} (mM ⁻¹) | 1.8 | 0.3 | 16.7 | | |

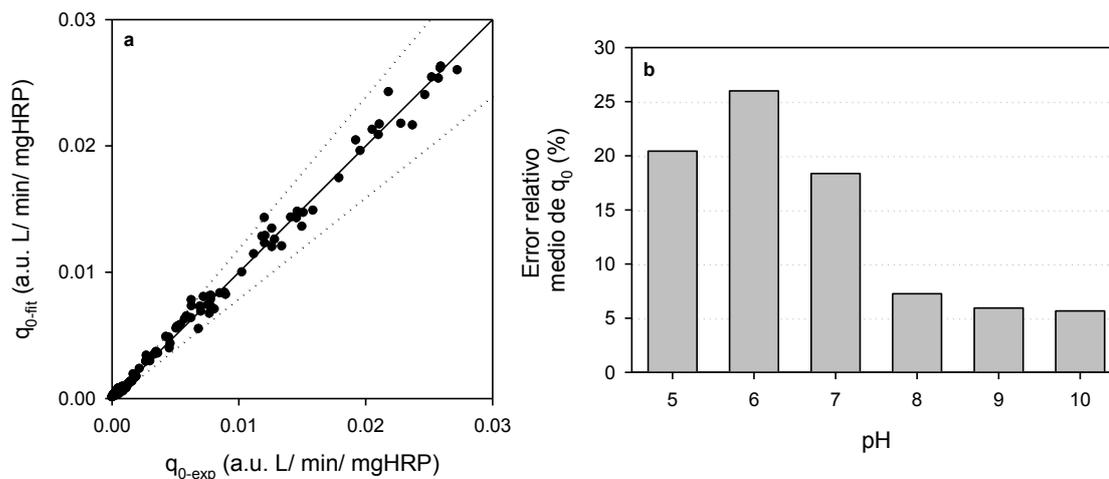


Figura 3.7. a) Valores de q_0 calculados mediante la ec. (3.30) ($q_{0\text{-fit}}$) en función de los datos experimentales ($q_{0\text{-exp}}$). La línea continua representa la correlación perfecta. Las líneas punteadas indican $\pm 20\%$ del valor experimental. b) Error relativo medio de q_0 en función del pH.

3.3.6. Validación del modelo propuesto

Las Figuras 3.4 y 3.5 muestran que el modelo propuesto representa adecuadamente la velocidad específica de decoloración (q_0) en función del pH, S_0 y P_0 para todas las condiciones ensayadas. Sin embargo, cabe resaltar que estos experimentos se realizaron con enzima recién preparada, la cual nunca había sido empleada previamente en experimentos de decoloración. Durante el desarrollo del modelo se supuso que la enzima conservaba su actividad durante la reacción de decoloración. Para verificar esta hipótesis, se realizó un ensayo de reutilización de la enzima en la reacción de decoloración. Asimismo, se realizaron simulaciones empleando los coeficientes de las Tablas 3.2 y 3.3 para representar los cambios en la absorbancia en función del tiempo durante el ensayo de reutilización de la enzima.

Con el objeto de verificar si la enzima permanecía activa luego de la decoloración del OII, se realizó un ensayo típico de decoloración de OII a pH 9. Una vez terminada la decoloración, se adicionaron progresivamente pulsos de OII y P de acuerdo a lo detallado en la Figura 3.8. Los resultados mostraron que la enzima permanecía activa después de al menos seis ciclos de reutilización, demostrando que en las condiciones ensayadas la desactivación de la enzima no fue significativa. A su vez, en la Figura 3.8 se observa un lento aumento de la absorbancia mínima luego de cada agregado de OII debido a la acumulación de productos de oxidación (PO), en concordancia con el modelo propuesto. Debe tenerse en cuenta que este conjunto de datos no se utilizó durante el procedimiento de ajuste del modelo. Por lo tanto, la concordancia entre las simulaciones y los datos experimentales proporciona una poderosa validación del modelo propuesto. Finalmente, debe observarse que el modo de operación por adiciones repetidas de OII y P a una misma mezcla de reacción es similar al funcionamiento de un reactor tipo fed batch. Por tanto, los resultados mostrados en la Figura 3.8 sugieren que una alimentación de tipo fed batch podría ser eficaz en la decoloración enzimática de aguas residuales que contienen colorantes azoicos.

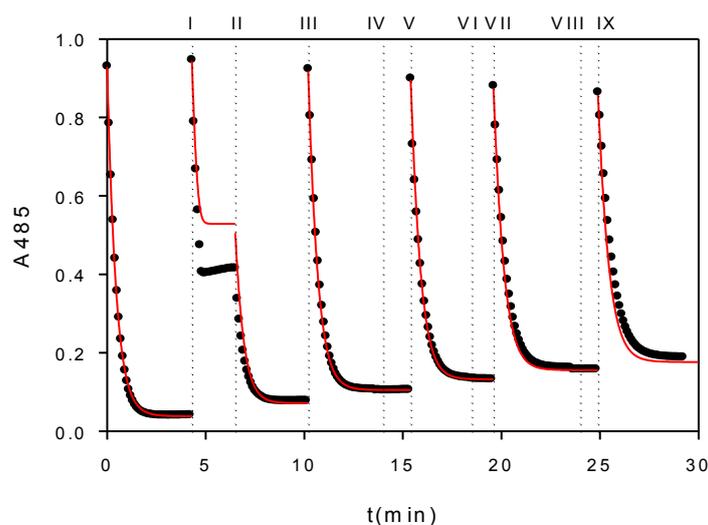


Figura 3.8. Absorbancia a 485 nm (símbolos negros) en función del tiempo durante adiciones repetidas de 50 μl de Orange II (2 mM) (I, III, V, VII, X) y 100 μl de peróxido de hidrógeno (2 mM) (II, IV, VI, VIII). Condiciones iniciales: $[E_T] = 143 \text{ mg/L}$, $[OII]_0 = [P]_0 = 0.048 \text{ mM}$, $\text{pH} = 9$, volumen inicial de la mezcla de reacción = 2.1 mL. Las líneas punteadas indican los agregados de OII o P. La línea continua representa el modelo propuesto empleando los coeficientes de las Tablas 3.2 y 3.3.

3.4. CONCLUSIONES

En este Capítulo se desarrolló una versión modificada del mecanismo clásico de Dunford para peroxidasas. El modelo propuesto representó adecuadamente la inhibición de la actividad enzimática por altas concentraciones de peróxido de hidrógeno (P), la actividad catalásica de la enzima, la generación de productos de oxidación (PO) y la dependencia de la cinética de decoloración de OII con la concentración inicial de P y S, y el pH.

Los resultados obtenidos demostraron que a pH 9-10 y baja concentración inicial de P, el consumo de P fue principalmente para oxidar la OII. Entre tanto, pH más bajos y altas

concentraciones iniciales de P, favorecen la actividad catalásica de la enzima. Además, en condiciones ácidas se observó una fuerte disminución de la velocidad inicial específica de decoloración (q_0). Por lo tanto, para maximizar la eficiencia de decoloración es conveniente trabajar a pH mayores a 8 y tratando de mantener una baja concentración de peróxido de hidrógeno durante la reacción.

Referencias

- Ali, L., Algaithi, R., Habib, H. M., Souka, U., Rauf, M. A., y Ashraf, S. S. (2013). Soybean peroxidase-mediated degradation of an azo dye—a detailed mechanistic study. *BMC biochemistry*, 14(1), 35.
- Berlett, B. S., Levine, R. L., y Stadtman, E. R. (2000). Use of isosbestic point wavelength shifts to estimate the fraction of a precursor that is converted to a given product. *Analytical biochemistry*, 287(2), 329-333.
- Buchanan, I., y Han, Y. (2000). Assessment of the potential of *Arthromyces ramosus* peroxidase to remove phenol from industrial wastewaters. *Environmental technology*, 21(5), 545-552.
- Buchanan, I. D., y Nicell, J. A. (1997). Model development for horseradish peroxidase catalyzed removal of aqueous phenol. *Biotechnology and bioengineering*, 54(3), 251-261.
- Cabrera, C., Cornaglia, A., Córdoba, A., Magario, I., y Ferreira, M. L. (2017). Kinetic modelling of the hematin catalysed decolourization of Orange II solutions. *Chemical Engineering Science*, 161, 127-137.
- Chahbane, N., Popescu, D.-L., Mitchell, D. A., Chanda, A., Lenoir, D., Ryabov, A. D., . . . Collins, T. J. (2007). Fe III–TAML-catalyzed green oxidative degradation of the azo dye Orange II by H₂O₂ and organic peroxides: products, toxicity, kinetics, and mechanisms. *Green Chemistry*, 9(1), 49-57.
- Cheng, X.-b., Rong, J., Ping-Sheng, L., Qin, Z., Shi-Qian, T., y Wen-Zhong, T. (2007). Studies on the properties and co-immobilization of manganese peroxidase. *Chinese Journal of Biotechnology*, 23(1), 90-96.

- Chiong, T., Lau, S. Y., Lek, Z. H., Koh, B. Y., y Danquah, M. K. (2016). Enzymatic treatment of methyl orange dye in synthetic wastewater by plant-based peroxidase enzymes. *Journal of environmental chemical engineering*, 4(2), 2500-2509.
- Dunford, H., y Stillman, J. (1976). On the function and mechanism of action of peroxidases. *Coordination chemistry reviews*, 19(3), 187-251.
- Franciscon, E., Piubeli, F., Fantinatti-Garboggini, F., de Menezes, C. R., Silva, I. S., Cavaco-Paulo, A., . . . Durrant, L. R. (2010). Polymerization study of the aromatic amines generated by the biodegradation of azo dyes using the laccase enzyme. *Enzyme and microbial technology*, 46(5), 360-365.
- Gil, A., Assis, F., Albeniz, S., y Korili, S. (2011). Removal of dyes from wastewaters by adsorption on pillared clays. *Chemical Engineering Journal*, 168(3), 1032-1040.
- Gómez, J. L., Bódalo, A., Gómez, E., Bastida, J., Hidalgo, A. M., y Gómez, M. (2008). A covered particle deactivation model and an expanded Dunford mechanism for the kinetic analysis of the immobilized SBP/phenol/hydrogen peroxide system. *Chemical Engineering Journal*, 138(1-3), 460-473.
- Heydari, R., Hosseini, M., Amraei, A., y Mohammadzadeh, A. (2016). Preparation of a novel pH optical sensor using orange (II) based on agarose membrane as support. *Materials Science and Engineering: C*, 61, 333-337.
- Inchaurredo, N., Font, J., Ramos, C. P., y Haure, P. (2016). Natural diatomites: efficient green catalyst for Fenton-like oxidation of Orange II. *Applied Catalysis B: Environmental*, 181, 481-494.
- Kalsoom, U., Ashraf, S. S., Meetani, M. A., Rauf, M. A., y Bhatti, H. N. (2013). Mechanistic study of a diazo dye degradation by Soybean Peroxidase. *Chemistry Central Journal*, 7(1), 93.

- Lin, H., Zhang, H., Wang, X., Wang, L., y Wu, J. (2014). Electro-Fenton removal of Orange II in a divided cell: reaction mechanism, degradation pathway and toxicity evolution. *Separation and Purification Technology*, 122, 533-540.
- López, C. (2005). Oxidación del tinte azo Orange II mediante MnP en reactores enzimáticos operados en continuo. Tesis Doctoral: Universidad de Santiago de Compostela.
- Lopez, C., Valade, A.-G., Combourieu, B., Mielgo, I., Bouchon, B., y Lema, J. M. (2004). Mechanism of enzymatic degradation of the azo dye Orange II determined by ex situ ¹H nuclear magnetic resonance and electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Analytical biochemistry*, 335(1), 135-149.
- Nicell, J. A., y Wright, H. (1997). A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide. *Enzyme and microbial technology*, 21(4), 302-310.
- Oakes, J., y Gratton, P. (1998). Kinetic investigations of azo dye oxidation in aqueous media. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*(9), 1857-1864.
- Olsen, L. F., Hauser, M. J., y Kummer, U. (2003). Mechanism of protection of peroxidase activity by oscillatory dynamics. *European Journal of Biochemistry*, 270(13), 2796-2804.
- Rache, M. L., García, A. R., Zea, H. R., Silva, A. M., Madeira, L. M., y Ramírez, J. H. (2014). Azo-dye orange II degradation by the heterogeneous Fenton-like process using a zeolite Y-Fe catalyst—kinetics with a model based on the Fermi's equation. *Applied Catalysis B: Environmental*, 146, 192-200.
- Rauf, M. A., y Ashraf, S. S. (2012). Survey of recent trends in biochemically assisted degradation of dyes. *Chemical Engineering Journal*, 209, 520-530.
- Sahare, P., Ayala, M., Vazquez-Duhalt, R., Pal, U., Loni, A., Canham, L., . . . Agarwal, V. (2016). Enhancement of peroxidase stability against oxidative self-inactivation by co-immobilization with a redox-active protein in mesoporous silicon and silica microparticles. *Nanoscale research letters*, 11(1), 417.

- Saratale, R. G., Saratale, G. D., Chang, J.-S., y Govindwar, S. P. (2011). Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: a review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42(1), 138-157.
- Sudha, M., Saranya, A., Selvakumar, G., y Sivakumar, N. (2014). Microbial degradation of azo dyes: a review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(2), 670-690.
- Wu, Y., Taylor, K. E., Biswas, N., y Bewtra, J. K. (1999). Kinetic model for removal of phenol by horseradish peroxidase with PEG. *Journal of Environmental Engineering*, 125(5), 451-458.
- Xu, R., Chi, C., Li, F., y Zhang, B. (2013). Immobilization of horseradish peroxidase on electrospun microfibrous membranes for biodegradation and adsorption of bisphenol A. *Bioresource technology*, 149, 111-116.
- Zdarta, J., Meyer, A. S., Jesionowski, T., y Pinelo, M. (2018). Developments in support materials for immobilization of oxidoreductases: A comprehensive review. *Advances in colloid and interface science*, 258, 1-20.
- Zhou, G., Guo, J., Zhou, G., Wan, X., y Shi, H. (2016). Photodegradation of Orange II using waste paper sludge-derived heterogeneous catalyst in the presence of oxalate under ultraviolet light emitting diode irradiation. *Journal of Environmental Sciences*, 47, 63-70.

Capítulo 4

Monitoreo de la oxidación de
compuestos xenobióticos con peróxido
de hidrógeno en presencia de una
peroxidasa de rábano picante mediante
mediciones de ORP

4.1. INTRODUCCIÓN

La catálisis enzimática es una alternativa eficiente para la eliminación de contaminantes xenobióticos debido a que el uso de enzimas es una forma sencilla de obtener altas tasas de remoción de un compuesto específico en condiciones predecibles sin utilizar grandes cantidades de químicos (Saratale y col., 2011; Rauf y Ashraf, 2012; Ali y col., 2013). En particular, uno de los costos asociados con la eliminación de xenobióticos empleando peroxidasas está relacionado con el uso de peróxido de hidrógeno como oxidante. En el Capítulo 3 se desarrolló un modelo cinético para representar la actividad catalítica de una peroxidasa de rábano picante (HRP). Según el modelo desarrollado, como máximo se pueden oxidar dos moles del sustrato reductor (S) por mol de peróxido de hidrógeno. Se verificó que este valor es difícil de lograr debido a que la HRP también cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua en presencia de un sustrato reductor. Además, se demostró que la descomposición del peróxido de hidrógeno aumentaba con la concentración inicial de peróxido.

Una forma sencilla de maximizar el consumo eficiente de peróxido de hidrógeno en términos de moles del sustrato reductor oxidado por mol de peróxido de hidrógeno consumido, es mediante la adición gota a gota del oxidante, como en los reactores tipo fed-batch. No obstante, cabe destacar que el funcionamiento óptimo de un fed-batch requiere un ajuste cuidadoso de las concentraciones y caudales de alimentación de peróxido. Para una dada concentración de sustrato reductor (S), las altas concentraciones de enzimas y los bajos caudales de entrada de P deberían favorecer las bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno (P). Este enfoque reducirá la descomposición del peróxido de hidrógeno, mejorando la eficiencia de consumo en términos de moles de sustrato oxidado por mol de peróxido de hidrógeno consumido ($Y_{S/P}$). Por lo tanto, un punto clave para evitar la adición

Monitoreo de la oxidación de compuestos xenobióticos con peróxido de hidrógeno en presencia de una peroxidasa de rábano picante mediante mediciones de ORP

de un exceso de peróxido de hidrógeno, es detectar el agotamiento del sustrato reductor. Si los compuestos a oxidar se agotan, la adición de peróxido de hidrógeno es inútil, lo que aumenta el gasto de oxidante, el tiempo de operación y el costo general del proceso.

Varios autores han propuesto el uso de mediciones del potencial de óxido-reducción (ORP) de la mezcla de reacción para controlar la oxidación de xenobióticos mediante procesos de oxidación avanzada (Contreras y col., 2011; Yu y col., 2014; Vitale y col., 2016). Aunque las mediciones de ORP han sido empleadas para monitorear también varios procesos biológicos de tratamiento de aguas residuales (Lackner y Horn, 2012; Kishimoto y col., 2017; Vongvichiankul y col., 2017; Foladori y col., 2018; Weißbach y col., 2018), de acuerdo con la bibliografía consultada, no se ha propuesto el uso del ORP como sistema de monitoreo de procesos de oxidación enzimática de xenobióticos. Por este motivo, en este Capítulo se desarrolló un método para el control de la oxidación de diferentes contaminantes modelo (OII, fenol y BPA) con peróxido de hidrógeno en presencia de HRP mediante ORP. Parte de los resultados del presente Capítulo fueron publicados en la revista *Industrial & Engineering Chemistry Research* vol 57. pag, 16518-16525. Año: 2018.

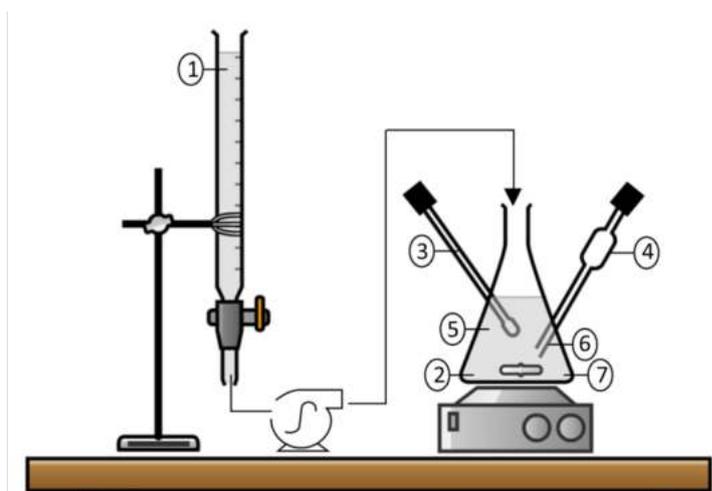
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Reactivos

El Orange II (OII), fenol (F), bisfenol A (BPA) y la peroxidasa de rábano picante (HRP) Tipo I fueron adquiridos de Sigma Aldrich. Todos los demás reactivos utilizados en este trabajo fueron de grado reactivo de Anedra (San Fernando, Argentina). Para más detalles, revisar lista de sustancias y reactivos del Capítulo 2.

4.2.2. Procedimientos

Los ensayos de oxidación se realizaron en vasos de precipitados de 250 mL a temperatura ambiente (20 ± 2 °C). Cantidades apropiadas de HRP y de los contaminantes modelos (OII, fenol, BPA) se diluyeron en buffer fosfato (100 mM, pH 9). A su vez, se prepararon soluciones stock de peróxido de hidrógeno en el mismo buffer fosfato. Los ensayos fed-batch (Fig. 4.1) se llevaron a cabo alimentando gota a gota soluciones de peróxido de hidrógeno a concentraciones apropiadas a diferentes caudales con una bomba peristáltica (Apema modelo PC25-1-M6-S). La concentración de HRP en los experimentos fue de 20 a 30 mg/L.



1. Adición de peróxido de hidrógeno
2. Mezcla de sustrato reductor y HRP
3. Monitoreo del pH
4. Monitoreo del ORP

Muestreo:
5. Cambio de absorbancia
6. Cambio del carbono orgánico disuelto
7. Cambio de fenoles totales

Figura 4.1. Montaje experimental de la oxidación enzimática de xenobióticos mediante sistema fed-batch.

4.2.3. Mediciones y cálculos

El ORP se midió de manera continua empleando un monitor multiparamétrico Altronix (Mod. EZDO-PC) con un electrodo de ORP de combinación recargable Altronix ALPHA GO-51. El pH fue medido utilizando un electrodo de cuerpo de polímero (Broadley-James Corp., EE. UU.) conectado a un monitor de pH Masstek (Argentina). A intervalos apropiados se extrajeron muestras del reactor, se centrifugaron inmediatamente durante 5 minutos a 13000 rpm (Eppendorf 5415C) y el sobrenadante se filtró a través de membranas celulósicas de 0,45 mm (Osmonics Inc.). Luego, se realizaron diluciones apropiadas de los filtrados utilizando buffer fosfato. Posteriormente, se registraron los espectros UV/Vis en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800. Asimismo, las diluciones fueron utilizadas para determinar el carbono orgánico disuelto (COD) empleando un analizador Shimadzu TOC-VCPN (Laboratorio Catalizadores y Superficies, INTEMA), que mide el CO₂ generado durante la oxidación del carbono orgánico total (COT).

Durante los ensayos de oxidación de fenol o BPA, la concentración total de fenoles (FT) se determinó utilizando el método de 4-aminoantipirina (4-AAP) (Modaressi y col., 2005). En este método, 4-AAP (20.8 mM de 4-AAP en 0.25 M NaHCO₃) y ferricianuro (83.4 mM de K₃Fe (CN)₆ en 0.25 M de NaHCO₃) son sustratos generadores de color cuando se combinan con compuestos fenólicos. Estos complejos coloreados se midieron a 510 nm. Las curvas de calibración se realizaron periódicamente utilizando fenol o BPA como compuestos de referencia (Cap. 2. Secc. 2.2.2)

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Espectros UV/Visible de los compuestos estudiados

La Figura 4.2 muestra el coeficiente de extinción molar (ϵ) a pH 8 para el OII (Fig. 4.2a), BPA y fenol (Fig. 4.2b), peróxido de hidrógeno (Fig. 4.2c) y HRP (Fig. 4.2d). Con relación al OII, como se comentó en el Capítulo 3, las bandas de absorción a 485 y 430 nm corresponden las formas tautoméricas hidrazona y azo del colorante, respectivamente. Las otras dos bandas a 230 y 310 nm están relacionadas con los anillos de benceno y naftaleno del colorante. Por su parte, el BPA y el fenol tuvieron espectros similares, presentando dos bandas de absorción a aproximadamente 275 y 215 nm. Considerando las concentraciones iniciales empleadas más altas de peróxido hidrógeno ($P = 0.21$ mM) y enzima (HRP = 30 mg/L) y de acuerdo a los coeficientes de extinción molar representados en la Figura 4.2, los valores de absorbancia a longitudes de onda superiores a 240 nm correspondientes al peróxido de hidrógeno y a HRP fueron menores a 0.01 u.a. Debido a que estas absorbancias son insignificantes en comparación con las correspondientes al OII, BPA o fenol (Fig. A1.1. Apéndice A1), la oxidación de estos compuestos con peróxido de hidrógeno en presencia de HRP pueden ser medidos mediante los valores de absorbancia en función del tiempo. Así, bajo las condiciones experimentales, las absorbancias a 485 y 275 nm fueron consideradas para monitorear la concentración de OII y fenol o BPA, respectivamente.

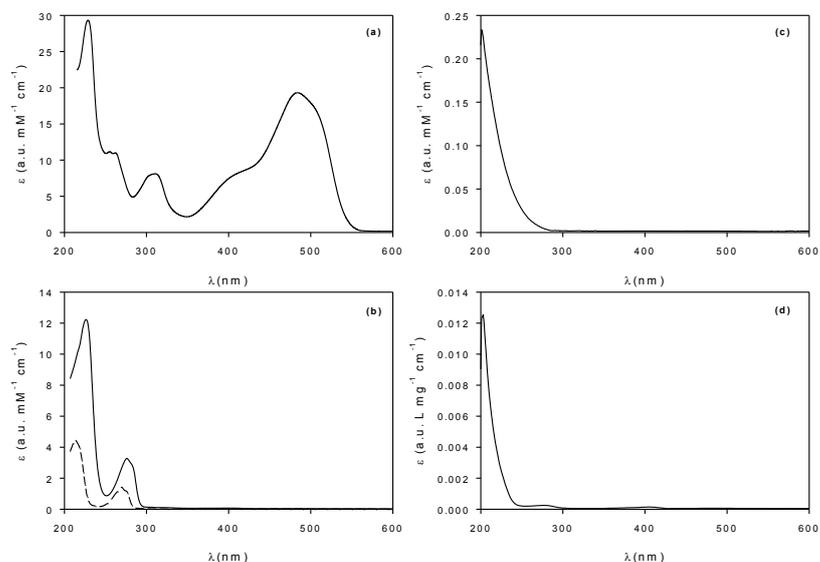


Figura 4.2. Coeficiente de extinción molar (ϵ) a pH 8 en buffer fosfato (100 mM) en función de la longitud de onda (λ) para: a) Orange II, b) bisfenol A (línea continua) y fenol (línea discontinua), c) peróxido de hidrógeno, y d) HRP.

4.3.2. Cambios en el ORP durante la oxidación enzimática de orange II (OII)

Experimentos por pulso

Se realizaron ensayos preliminares en batch para observar los cambios de los perfiles de ORP durante la oxidación de OII (0.17 mM) con peróxido de hidrógeno (0.21 mM) a pH 9 en presencia de HRP (30 mg/L). Al comienzo del experimento, OII y HRP estaban presentes en la mezcla de reacción (250 mL). La Figura 4.3a muestra que, bajo esta condición, la absorbancia a 485 nm se mantuvo constante en 3.2. Luego, después de la primera adición de peróxido de hidrógeno ($t = 0$), los valores de absorbancia disminuyeron a 0.14 durante los primeros 6 minutos. En este momento, se detuvo la reacción de decoloración, obteniéndose una decoloración casi completa.

La Figura 4.3b muestra el perfil de ORP correspondiente a la mezcla de reacción. Nótese que antes de la adición de peróxido de hidrógeno, los valores de ORP se mantuvieron prácticamente constantes en 120 mV. Posteriormente, cuando se añadió peróxido de hidrógeno ($t = 0$) y se inició la reacción de oxidación, se observó un aumento muy notorio en ORP. Los valores de ORP alcanzaron un valor máximo de 170 mV, el cual coincidió con la terminación de la reacción de decoloración. Mediante la derivada del ORP en función del tiempo (Fig. 4.3c) se obtuvo el tiempo en el que el ORP alcanzó dicho valor máximo. Nótese de la Figura 4.3 que cuando el OII estaba por agotarse ($t = 15$ min), se realizó una segunda adición de peróxido de hidrógeno. En este punto, los valores de ORP continuaron disminuyendo. Luego, una adición de OII a $t = 30$ min provocó el aumento de ORP desde 140 mV hasta un valor máximo de aproximadamente 180 mV. Una vez más, el tiempo correspondiente a este ORP máximo estuvo cerca del final de la reacción de decoloración (Fig. 4.3b).

Los resultados que se muestran en la Figura 4.3 sugieren que, en lugar de indicar la presencia de peróxido de hidrógeno u OII, el aumento de los valores de ORP se asocian a la actividad enzimática. Es decir, cuando la enzima estuvo en contacto solo con OII, los valores de ORP se mantuvieron en aproximadamente a 120 mV. Luego, después de la adición de peróxido de hidrógeno ($t = 0$ min) comenzó la reacción de decoloración y aumentó el ORP. Sin embargo, la segunda adición de peróxido de hidrógeno ($t = 15$ min) no causó un nuevo aumento en el ORP porque se agotó el OII. Finalmente, a $t = 30$ min, la adición del sustrato reductor (OII) inició una nueva reacción de decoloración catalizada por la enzima. Estos resultados demuestran que el aumento en los valores de ORP fue provocado por la actividad de la enzima. Por el contrario, cuando la enzima no estaba activa (por ejemplo, cuando faltaba alguno de los dos sustratos), los valores de ORP disminuyeron lentamente.

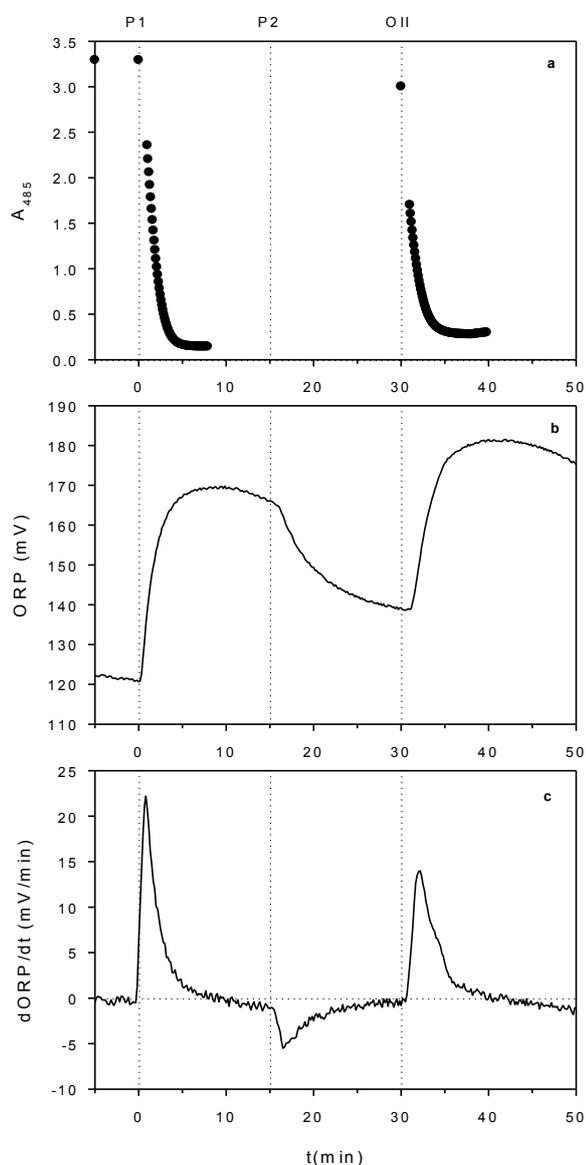


Figura 4.3. Ejemplo de reacción de decoloración de OII (0.17 mM) con peróxido de hidrógeno (0.21 mM) en presencia de HRP (30 mg/L) a pH 9 en buffer fosfato (100 mM). a) Absorbancia a 485 (A_{485}), b) ORP, c) derivada del ORP en función del tiempo ($dORP/dt$). Las líneas punteadas indican el tiempo en el cual se adiciona OII o peróxido de hidrógeno.

Experimentos tipo Fed-Batch

Se realizaron experimentos tipo fed-batch para decolorar soluciones de OII. En estos experimentos, las concentraciones iniciales de HRP y OII fueron 30 mg/L y 0.19 mM, respectivamente. La reacción se inició mediante la adición continua de peróxido de hidrógeno (1.8 mM) a diferentes caudales (0.21 a 2.37 mL/min). En todos los casos, el volumen inicial fue de 250 mL, pH = 9 y se empleó la señal de ORP para monitorear los experimentos de decoloración y determinar el punto final de la reacción.

La Figura 4.4 muestra el cambio de absorbancia a 485 nm (A_{485}) y la señal ORP durante la reacción de decoloración. En todos los casos, se observó una disminución aproximadamente lineal de A_{485} , siendo la velocidad de decoloración proporcional al caudal empleado. Debe notarse que cuando se sacaba una muestra (y por lo tanto se detenía la adición de peróxido de hidrógeno) la decoloración se detenía inmediatamente, demostrando que bajo las condiciones ensayadas, la acumulación de peróxido de hidrógeno era insignificante. La Figura 4.4 muestra que los valores de absorbancia alcanzaron un valor mínimo a un cierto tiempo crítico (t_c) y luego se mantuvieron constantes. Este tiempo crítico (t_c) representa el final de la reacción de decoloración. En todos los casos presentados en la Figura 4.4, los valores de t_c obtenidos fueron similares al tiempo en el cual el ORP alcanzó un valor máximo (Tabla 4.1). Estos valores de t_c basados en el ORP, se obtuvieron a partir de la gráfica de la primera derivada de ORP en función del tiempo (Fig. A1.2. Apéndice A1). Se debe tener en cuenta que, debido a que el ORP se midió de manera continua, se obtuvo una estimación más precisa de t_c utilizando el ORP que usando los valores de absorbancia.

La Tabla 4.1 muestra que la cantidad de OII consumido por unidad de peróxido de hidrógeno agregado ($Y_{S/P}$) disminuyó a medida que aumentaba el caudal de entrada de P (Q_{in}). Este efecto se puede atribuir al hecho de que en un fed-batch, la concentración de peróxido de hidrógeno aumenta en función de Q_{in} . Por otra parte, como se demostró en el Capítulo 3, la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno aumenta con la concentración de peróxido de hidrógeno (Morales Urrea y col., 2018). Por lo tanto, cuanto mayor sea Q_{in} , menor $Y_{S/P}$. Para más detalles ver el Apéndice A1 (Sección A1.3).

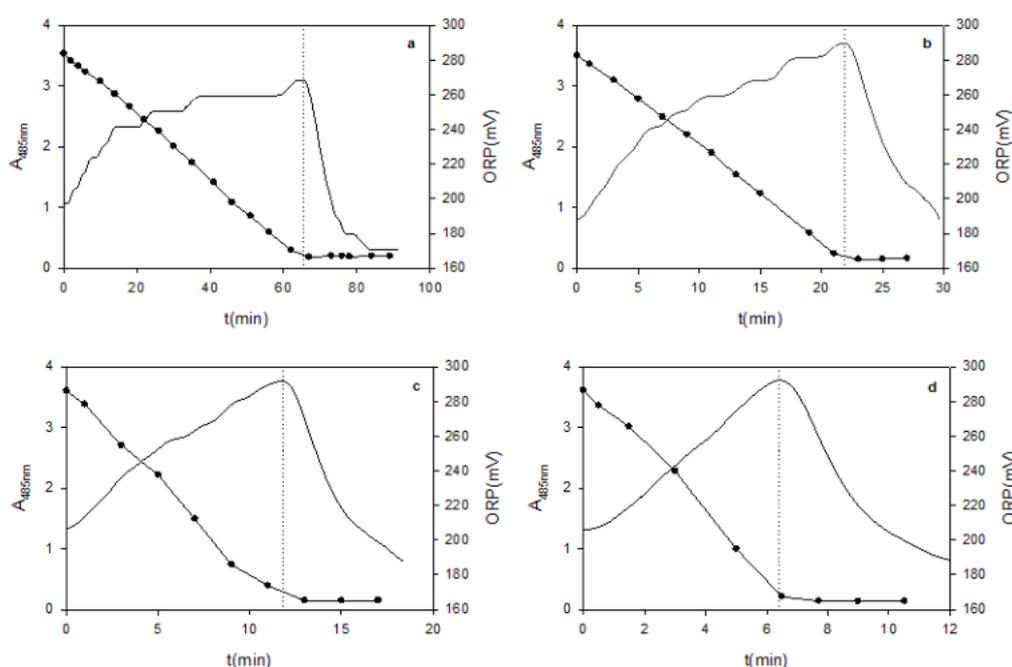


Figura 4.4. Cambios en la absorbancia a 485 nm (A_{485}) y ORP durante la decoloración de OII (0.19 mM) con adiciones continuas de peróxido de hidrógeno (1.8 mM) a un caudal de (mL/min): a) 0.21, b) 0.65, c) 1.28, d) 2.37. Las líneas punteadas indican el tiempo crítico (t_c). En todos los casos, la concentración de HRP fue 30 mg/L, pH = 9, y el volumen inicial de fue 250 mL.

Monitoreo de la oxidación de compuestos xenobióticos con peróxido de hidrógeno en presencia de una peroxidasa de rábano picante mediante mediciones de ORP

Tabla 4.1. Resultados obtenidos en experimentos de oxidación tipo fed-batch. En todos los casos, la concentración de entrada del peróxido de hidrógeno (H_2O_{2in}) fue 1.8 mM, pH = 9, HRP = 30 mg/L. El volumen inicial (V_0) de la reacción fue 250 mL

| Corrida | Q_{in} (mL/min) | $[OII]_0$ (mM) | t_C (min) | $t_{C(ORP)}$ (min) | Y_{SP} (mol/mol)* |
|---------|-------------------|----------------|-------------|-----------------------|---------------------|
| 1 | 0.21 | 0.183 | 67 | 65 | 1.83 |
| 2 | 0.65 | 0.183 | 24 | 22 | 1.65 |
| 3 | 1.28 | 0.187 | 13 | 12 | 1.55 |
| 4 | 2.37 | 0.187 | 7 | 6 | 1.54 |

$$* Y_S = \frac{V_0[OII]_0}{Q_{in}H_2O_{2in}t_{C(ORP)}}$$

En resumen, los resultados mostrados en la Figura 4.4 sugieren que la señal de ORP se puede emplear para determinar el punto final de la oxidación de OII con peróxido de hidrógeno catalizada por HRP. Sin embargo, estos resultados solo podrían ser aplicables a la oxidación de OII. Por esta razón, se realizaron nuevos experimentos para evaluar la efectividad de la señal ORP para detectar el punto final de la reacción de oxidación catalítica de otros xenobióticos, tales como fenol y BPA.

4.3.3. Comparación de la evolución del ORP durante la oxidación enzimática de diferentes sustratos reductores

En la Figura 4.5 se compara la cinética de oxidación correspondiente a los diferentes sustratos reductores estudiados (OII, fenol y BPA). La Tabla 4.2 muestra las condiciones experimentales y los principales resultados. Cabe señalar que la escala de tiempo de estos experimentos varió de 70 a 130 min. Por lo tanto, para ayudar a la comparación entre los diferentes experimentos, los resultados en la Figura 4.5 se representaron en función de un tiempo normalizado, expresado por la relación t/t_c . En todos los casos, el tiempo crítico (t_c) se obtuvo a partir de la gráfica de la derivada de ORP en función del tiempo (Fig. A1.4. Apéndice A1). La Tabla 4.2 muestra los tiempos críticos obtenidos (t_c) para cada uno de los sustratos reductores ensayados.

La Figura 4.5 muestra que tanto los valores de absorbancia (Fig. 4.5a) como la concentración de fenoles totales (Fig. 4.5c) mostraron una tendencia similar. En ambos casos, estas mediciones disminuyeron en función del tiempo normalizado, alcanzando valores aproximadamente constantes para $t/t_c \geq 1$. Además, la Figura 4.5b muestra que en el caso de OII, los valores de carbono orgánico disuelto (COD) se mantuvieron constantes, lo que indica que el sustrato reductor (OII) y los productos de oxidación permanecieron en la fase acuosa. Por el contrario, en el caso de fenol y BPA se observó un descenso del COD, con remociones del 70 y 50%, respectivamente. Para todos los xenobióticos estudiados, la Figura 4.5d muestra que el ORP alcanzó un valor máximo cuando se detuvo la reacción de oxidación. Además, en todos los casos, la adición de exceso de peróxido de hidrógeno causó una disminución bastante notable de los valores de ORP.

La Figura 4.6 muestra el cambio de los espectros UV/Vis durante la oxidación enzimática de OII, fenol y BPA con peróxido de hidrógeno. Como regla general, en el caso del OII (Fig. 4.6a) se observó una disminución de las bandas de absorbancia características

Monitoreo de la oxidación de compuestos xenobióticos con peróxido de hidrógeno en presencia de una peroxidasa de rábano picante mediante mediciones de ORP

del colorante dentro de la región visible. Sin embargo, a medida que avanzaba la reacción, apareció una nueva banda de absorción a 340 nm debido a la formación de productos de oxidación del OII, los cuales no son oxidados en las condiciones probadas.

De acuerdo con la Tabla 4.2, la cantidad de sustrato oxidado por mol de peróxido de hidrógeno agregado, osciló entre 1.6 y 2.2 mol/mol. Estos valores son más altos que los reportados por otros autores en sistemas batch, lo que indica un mejor aprovechamiento del oxidante. Por ejemplo, varios autores informaron una relación Y_{SP} cercana a 1 mol/mol para la remoción de fenol mediante HRP (I. D. Buchanan y Nicell, 1997, 1999; Wu y col., 1999; I. Buchanan y Han, 2000).

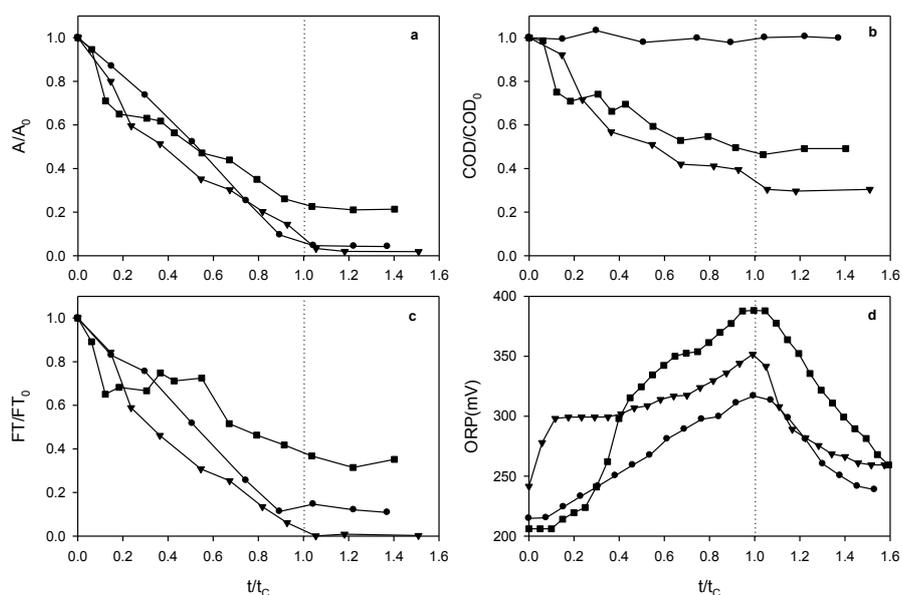


Figura 4.5. Cambios de a) absorbancia, b) carbono orgánico disuelto (COD), c) fenoles totales (FT), y d) ORP en función del tiempo normalizado (t/t_c) durante la oxidación de OII (círculos), fenol (triángulos), y BPA (cuadrados) mediante la adición continua de peróxido de hidrógeno en presencia de HRP. El OII fue medido a 485 nm, mientras que el fenol y BPA fueron medidos a 275 nm. Para más detalles de las condiciones experimentales ver

Tabla 4.2.

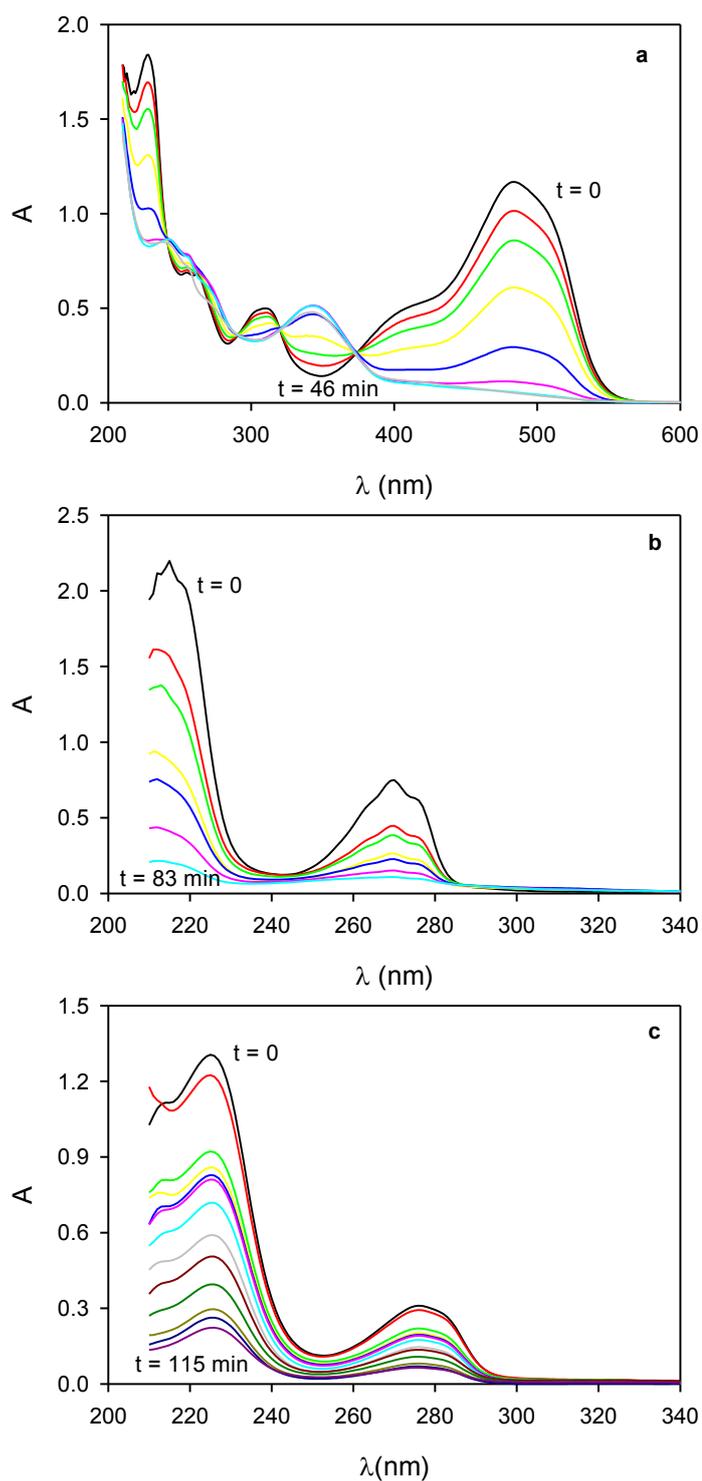


Figura 4.6. Cambio en el espectro UV/Vis durante la oxidación de) OII, b) fenol, y c) BPA.

Ver en Tabla 4.2 las condiciones experimentales.

Tabla 4.2. Comparación entre los valores Y_S calculados en la oxidación enzimática de distintos sustratos reductores (S). En todos los caso, la concentración de entrada de peróxido de hidrógeno (H_2O_{2in}) fue 1.8 mM, pH = 8, $HRP_T = 20$ mg/L, y el volumen inicial (V_0) fue 250 mL.

| Sustrato | Q_{in} (mL/min) | $[S]_0$ (mM) | t_C (min) | $t_{C(ORP)}$ (min) | $Y_{S/P}$ (mol/mol)* |
|--------------|-------------------|--------------|-------------|--------------------|----------------------|
| OII | 0.43 | 0.20 | 35 | 31 | 1.84 |
| Fenol | 0.73 | 0.50 | 58 | 55 | 1.64 |
| BPA | 0.37 | 0.48 | 85 | 82 | 2.20 |

$$* Y_S = \frac{V_0[S]_0}{Q_{in}H_2O_{2in}t_{C(ORP)}}$$

Por su parte, cuando se realizaron experimentos de oxidación utilizando al fenol o BPA como sustratos reductores, se observó la formación de un precipitado marrón oscuro o blanco, respectivamente (Fig. 4.7). Cabe señalar que varios autores informaron la formación de precipitados debido a la polimerización de compuestos fenólicos por HRP (Ayyagari y col., 1996; Valderrama y col., 2002; Gómez y col., 2008). Como se mencionó previamente (Sección 4.2.2), estos precipitados fueron separados por centrifugación y filtración de la mezcla de reacción antes de la medición del COD. En consecuencia, la disminución observada de los valores de COD durante la oxidación de fenol y BPA podría atribuirse a la formación de estos productos de polimerización insolubles.



Figura 4.7. Oxidación enzimática de a) fenol y b) BPA.

El cambio del espectro UV/Vis correspondiente al OII (Fig. 4.6a) contrasta con los obtenidos durante la oxidación de fenol y BPA (Fig. 4.6b, c). Como se observa en las Figuras 4.6b y 4.6c, la forma de los espectros UV/Vis para el fenol y BPA fueron prácticamente constantes en función del tiempo. Por lo tanto, los cambios en los espectros de UV/Vis estaban relacionados con la disminución de las concentraciones de fenol y BPA, además de una pequeña formación de productos de oxidación solubles. Estos productos de oxidación fueron los responsables de los valores de COD al final de la reacción de oxidación (Fig. 4.5b). Además, los resultados representados en las Figuras 4.5 y 4.6 demuestran que estos productos no pueden oxidarse bajo las condiciones experimentales probadas.

4.3.4. Oxidación de una mezcla binaria OII-BPA

Los resultados mostrados en las Figuras 4.4 y 4.5 demuestran que la señal ORP se puede usar para detectar el punto final de la oxidación enzimática con peróxido de hidrógeno de los compuestos estudiados en forma individual. Con el objeto de verificar la aplicabilidad de la señal de ORP para detectar el punto final de la oxidación de sistemas más complejos, se estudió la oxidación de una mezcla binaria compuesta por OII (0.2 mM) y BPA (0.5 mM). En este experimento se añadió continuamente peróxido de hidrógeno (1.8 mM) a razón de 0.20 mL/min y la concentración inicial de HRP fue de 20 mg/mL.

La Figura 4.8a muestra el cambio de absorbancias (A) a 275 y 485 nm (normalizado con relación a sus valores iniciales) en función del tiempo. Cabe destacar que, según las Figuras 4.2 y 4.6, el OII y sus productos de oxidación (en menor medida) son los responsables de la absorbancia a 485 nm. Por ejemplo, la Figura 4.6a muestra que para una absorbancia inicial correspondiente al OII de aproximadamente 1.2 u.a, después de la reacción de decoloración, la absorbancia disminuyó a 0.05 u.a. Esta absorbancia residual es debido a la presencia de productos de oxidación del OII. Por su parte, las Figuras 4.2 y 4.6b demuestran que a 485 nm la absorbancia correspondiente a BPA es prácticamente despreciable. Por el contrario, a 275 nm tanto OII, BPA y sus correspondientes productos de oxidación aportan a los valores de absorbancia. Sin embargo, la Figura 4.6a muestra que a esta longitud de onda, el cambio de absorbancia durante la oxidación de OII fue despreciable. En el ejemplo representado en la Figura 4.6a, la absorbancia inicial correspondiente a OII fue de 0.42 u.a, mientras que al final del experimento la absorbancia fue de 0.47 u.a. Por esta razón, durante la reacción de oxidación binaria, el cambio de absorbancia a 275 nm se atribuyó principalmente al cambio de la concentración de BPA.

La Figura 4.8b muestra que durante la oxidación de la mezcla OII-BPA, los valores de carbono orgánico disuelto (COD) disminuyeron en función del tiempo. Es importante

Monitoreo de la oxidación de compuestos xenobióticos con peróxido de hidrógeno en presencia de una peroxidasa de rábano picante mediante mediciones de ORP

destacar que cuando se estudió la oxidación de OII individualmente, los valores de COD se mantuvieron constantes (Fig. 4.5a). Por el contrario, cuando se estudió la oxidación de BPA se obtuvo una disminución notable en los valores de COD debido a la formación de un producto insoluble (Fig. 4.5b). De la Figura 4.8 se puede deducir que durante la oxidación de la mezcla OII-BPA, el cambio de la absorbancia a 275 nm (Fig. 4.8a) fue similar a la variación de los valores de COD en función del tiempo (Fig. 4.8b), lo que confirma que el cambio de absorbancia a 275 nm representaba el cambio de la concentración de BPA en la mezcla.

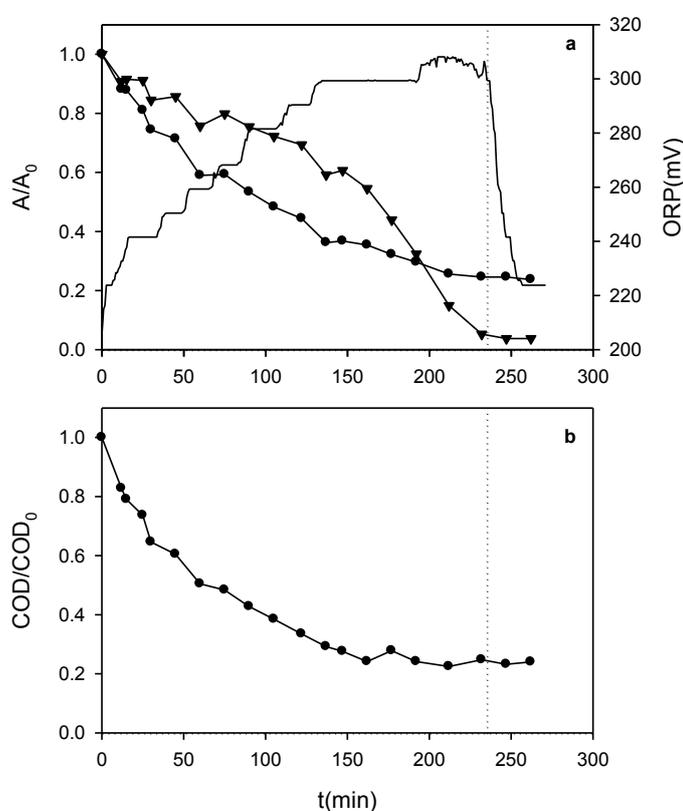


Figura 4.8. Oxidación de mezcla binaria de OII (0.2 mM) y BPA (0.5 mM) por adiciones continuas de peróxido de hidrógeno (1.8 mM) a 0.20 mL/min. La concentración inicial de HRP fue 20 mg/L, pH = 8 (buffer fosfato, 100 mM), y el volumen inicial fue. a) Absorbancia normalizada a 275 nm y (círculos) y 485 nm (triángulos), y valores de ORP (línea); b) Concentración de carbono orgánico disuelto (COD) normalizado. La línea vertical punteada indica el tiempo crítico (t_c).

Transcurridos los primeros 150 minutos, la absorbancia a 485 nm disminuyó abruptamente en función del tiempo (Fig. 4.8a). Debido a que a esta longitud de onda la absorbancia correspondiente al BPA es despreciable, este resultado indicó que se aceleraba la remoción de OII. Debe mencionarse que durante la oxidación de la mezcla OII-BPA se observó la formación de un producto insoluble de color naranja rojizo. Sin embargo, cuando se estudió la oxidación individual de BPA, solo se observó la formación de un precipitado blanco. En consecuencia, se puede concluir que el color anaranjado rojizo del precipitado formado durante la oxidación de la mezcla OII-BPA es debido a la presencia de OII en el precipitado. Es decir, la disminución de la absorbancia a 485 nm durante los primeros 150 minutos se podría atribuir al consumo de OII debido a la formación del precipitado rojizo. Por su parte, para tiempos de reacción superiores a 150 min, la absorbancia a 275 nm y los valores de COD fueron casi constantes, lo que indicó el final de la oxidación de BPA. Nótese que luego de 150 min de la reacción, la absorbancia a 485 nm disminuyó rápidamente (Fig. 4.8). Lo mencionado anteriormente sugiere que la HRP catalizó primero la oxidación de BPA y luego la oxidación de OII.

Debe observarse que la Figura 4.8a muestra que los cambios de ORP también mostraron dos fases. Durante los primeros 150 minutos, se observó un aumento notable de los valores de ORP desde 210 hasta, aproximadamente, 300 mV. Esta fase correspondió a la eliminación de BPA y OII por coprecipitación. Luego, de 150 a 230 min, se obtuvo un ligero aumento de los valores de ORP y una disminución bastante notable de la absorbancia a 485 nm, correspondiente a la oxidación de OII. Finalmente, a los 230 min se agotó el OII y, en consecuencia, disminuyeron los valores de ORP. Por lo tanto, se puede concluir que la señal de ORP también puede emplearse para detectar el punto final de la reacción de oxidación de una mezcla binaria compuesta por OII y BPA catalizada por HRP.

4.4. CONCLUSIONES

En este Capítulo se estudió el uso de mediciones de ORP para detectar el punto final de la oxidación de tres contaminantes modelo (orange II, fenol, BPA) utilizando peróxido de hidrógeno en presencia de HRP. Los resultados obtenidos demostraron que los valores de ORP aumentaron solo cuando ambos sustratos de la enzima (peróxido de hidrógeno y el sustrato reductor) estaban presentes en la mezcla de reacción. Para todos los contaminantes estudiados, el momento en que la ORP alcanzó un valor máximo fue similar al final de la reacción de oxidación. El valor máximo de ORP pudo detectarse fácilmente por medio de la derivada de ORP en función del tiempo (d_{ORP}/d_t). En todos los casos, cuando se agregó peróxido de hidrógeno en exceso, se observó una disminución de los valores de ORP. Este comportamiento también se observó durante la oxidación de una mezcla de OII y BPA. Este trabajo demostró que el ORP puede ser útil para controlar la adición de peróxido de hidrógeno durante la oxidación de OII, fenol y BPA catalizada por HRP, minimizando el tiempo y los costos del proceso.

Referencias

- Ali, L., Algaiithi, R., Habib, H. M., Souka, U., Rauf, M. A., y Ashraf, S. S. (2013). Soybean peroxidase-mediated degradation of an azo dye—a detailed mechanistic study. *BMC biochemistry*, 14(1), 35.
- Ayyagari, M., Akkara, J., y Kaplan, D. (1996). Enzyme-mediated polymerization reactions: Peroxidase-catalyzed polyphenol synthesis. *Acta polymerica*, 47(5), 193-203.
- Buchanan, I., y Han, Y. (2000). Assessment of the potential of *Arthromyces ramosus* peroxidase to remove phenol from industrial wastewaters. *Environmental technology*, 21(5), 545-552.
- Buchanan, I. D., y Nicell, J. A. (1997). Model development for horseradish peroxidase catalyzed removal of aqueous phenol. *Biotechnology and bioengineering*, 54(3), 251-261.
- Buchanan, I. D., y Nicell, J. A. (1999). A simplified model of peroxidase-catalyzed phenol removal from aqueous solution. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 74(7), 669-674.
- Contreras, E. M., Bertola, N. C., y Zaritzky, N. E. (2011). Monitoring the ozonation of phenol solutions at constant pH by different methods. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 50(16), 9799-9809.
- Foladori, P., Petrini, S., y Andreottola, G. (2018). Evolution of real municipal wastewater treatment in photobioreactors and microalgae-bacteria consortia using real-time parameters. *Chemical Engineering Journal*, 345, 507-516.

- Gómez, J., Bódalo, A., Gómez, E., Hidalgo, A., Gómez, M., y Murcia, M. (2008). A transient design model of a continuous tank reactor for removing phenol with immobilized soybean peroxidase and hydrogen peroxide. *Chemical Engineering Journal*, 145(1), 142-148.
- Kishimoto, N., Hatta, M., Kato, M., y Otsu, H. (2017). Effects of oxidation–reduction potential control and sequential use of biological treatment on the electrochemical Fenton-type process. *Process Safety and Environmental Protection*, 105, 134-142.
- Lackner, S., y Horn, H. (2012). Evaluating operation strategies and process stability of a single stage nitritation–anammox SBR by use of the oxidation–reduction potential (ORP). *Bioresource technology*, 107, 70-77.
- Modaressi, K., Taylor, K. E., Bewtra, J., y Biswas, N. (2005). Laccase-catalyzed removal of bisphenol-A from water: protective effect of PEG on enzyme activity. *Water Research*, 39(18), 4309-4316.
- Morales Urrea, D. A., Haure, P. M., Einschlag, F. S. G., y Contreras, E. M. (2018). Horseradish peroxidase-mediated decolourization of Orange II: modelling hydrogen peroxide utilization efficiency at different pH values. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(20), 19989-20002.
- Rauf, M. A., y Ashraf, S. S. (2012). Survey of recent trends in biochemically assisted degradation of dyes. *Chemical Engineering Journal*, 209, 520-530.
- Saratale, R. G., Saratale, G. D., Chang, J.-S., y Govindwar, S. P. (2011). Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: a review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42(1), 138-157.
- Valderrama, B., Ayala, M., y Vazquez-Duhalt, R. (2002). Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes. *Chemistry & biology*, 9(5), 555-565.

- Vitale, A. A., Bernatene, E. A., Vitale, M. G., y Pomilio, A. B. (2016). New Insights of the Fenton Reaction Using Glycerol as the Experimental Model. Effect of O₂, Inhibition by Mg²⁺, and Oxidation State of Fe. *The Journal of Physical Chemistry A*, 120(28), 5435-5445.
- Vongvichiankul, C., Deebao, J., y Khongnakorn, W. (2017). Relationship between pH, oxidation reduction potential (ORP) and biogas production in mesophilic screw anaerobic digester. *Energy Procedia*, 138, 877-882.
- Weißbach, M., Drewes, J. E., y Koch, K. (2018). Application of the oxidation reduction potential (ORP) for process control and monitoring nitrite in a Coupled Aerobic-anoxic Nitrous Decomposition Operation (CANDO). *Chemical Engineering Journal*, 343, 484-491.
- Wu, Y., Taylor, K. E., Biswas, N., y Bewtra, J. K. (1999). Kinetic model for removal of phenol by horseradish peroxidase with PEG. *Journal of Environmental Engineering*, 125(5), 451-458.
- Yu, R.-F., Chen, H.-W., Cheng, W.-P., Lin, Y.-J., y Huang, C.-L. (2014). Monitoring of ORP, pH and DO in heterogeneous Fenton oxidation using nZVI as a catalyst for the treatment of azo-dye textile wastewater. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 45(3), 947-954.

Capítulo 5

Inmovilización de la enzima peroxidasa
sobre membranas nanofibrosas de
poliuretano

5.1. INTRODUCCIÓN

En los Capítulos 3 y 4 se discutió acerca de la importancia de la catálisis enzimática como una alternativa eco amigable para la oxidación de diversos contaminantes orgánicos con peróxido de hidrógeno (P). En particular, se determinaron las condiciones experimentales más favorables para maximizar la actividad catalítica de una peroxidasa libre (HRP) en la oxidación de orange II (OII), un colorante azo muy utilizado en la industria en general que se caracteriza por ser recalcitrante en condiciones naturales.

La catálisis enzimática se ha perfilado recientemente como una de las tecnologías más prometedoras para la remoción de contaminantes orgánicos. Sin embargo, el uso de enzimas libres implica altos costos de proceso debido a la imposibilidad de reutilización. La inmovilización de enzimas favorece la reusabilidad del catalizador, permitiendo desarrollar bioprocesos económicamente viables (Mateo y col., 2007; Wang y col., 2016; Bilal y col., 2018). En general, las enzimas pueden unirse al soporte mediante adsorción, entrapamiento, encapsulación, unión covalente y reticulación (Sheldon y van Pelt, 2013; Zdarta y col., 2018a,b). La selección de la técnica de inmovilización más adecuada depende del material de soporte, el tipo de enzima y del proceso biocatalítico (Zdarta y col., 2018a).

El uso de materiales orgánicos como soportes para la inmovilización de enzimas ha sido muy utilizado debido a que, en general, contienen un gran número de grupos funcionales reactivos, son biocompatibles y tienen alta afinidad por los péptidos (Zdarta y col., 2018a). En particular, se han inmovilizado peroxidases sobre polímeros sintéticos por diferentes métodos, tales como adsorción (Peralta-Zamora y col., 1998), encapsulación (Gassara-Chatti y col., 2013) y unión covalente (Rodríguez-de Luna y col., 2017). Típicamente, la formación de uniones covalentes entre el biocatalizador y el soporte es más conveniente ya que las fuertes uniones covalentes reducen la lixiviación de la enzima durante

su aplicación, lo que aumenta su reusabilidad con relación a otros métodos, como por ejemplo la inmovilización por adsorción (Bilal y col., 2018).

En los últimos años se ha intensificado el uso de membranas electrohiladas como soporte para la inmovilización de enzimas debido a que son materiales nanofibrosos que, además de favorecer a la formación de uniones químicas con el biocatalizador, cuentan con una alta superficie específica y porosidad entre las fibras que también permiten la inmovilización de la enzima por adsorción (Xu y col., 2013; Zhang y col., 2014). Además, este tipo de membranas son de fácil manejo y tienen alta resistencia mecánica, lo que las hace ideales para su empleo en reactores de membrana (Xu y col., 2013; Tang y col., 2014). En la literatura se pueden encontrar varios trabajos relacionados con la inmovilización de HRP mediante unión covalente sobre matrices poliméricas electrohiladas de poliacrilatos (Xu y col., 2013) y polialcoholes (Xu y col., 2015), así como por adsorción sobre nanofibras de poliimida (Zhang y col., 2014), para la remoción de bisfenol A y paracetamol (Xu y col., 2013, Xu y col., 2015).

En el presente Capítulo se estudió la inmovilización de HRP por adsorción física y mediante unión covalente sobre membranas nanofibrosas de poliuretano. Dichas membranas son un material no tóxico, de fácil manipulación y disponibilidad. Con este fin, se trabajó en conjunto con el grupo Polímeros Biomédicos del INTEMA. En particular, se adaptó la técnica desarrollada por dicho grupo relacionada con la producción de membranas con elevada porosidad interconectada en las que se inmovilizaba heparina a través de los grupos epoxi del material (Caracciolo y col., 2017). Debe destacarse que a la fecha no existen en la literatura antecedentes de inmovilización de HRP sobre membranas electrohiladas de poliuretano y su utilización como biocatalizadores para la remoción de contaminantes orgánicos en medio acuoso.

5.2.MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1.Reactivos

El Orange II (OII), la peroxidasa de rábano picante (HRP) Tipo I, la *N,N*-dimetilformamida (DMF) y el tetrahidrofurano (THF) fueron adquiridos de Sigma Aldrich. Se empleó el poliuretano comercial Avalon 65 DB (amablemente donado por Huntsman Polyurethanes). El hipoclorito de sodio (NaClO) se obtuvo de Química Industrial Kubo. El hidrosulfito de sodio (Na₂S₂O₄) y el alil glicidil éter (AGE) se obtuvieron de Acros Organics (NJ, USA). Todos los demás reactivos utilizados en este trabajo fueron de Anedra (San Fernando, Argentina). Para más detalles, revisar lista de sustancias y reactivos del Capítulo 2.

5.2.2. Síntesis de las membranas nanofibrosas de poliuretano

Se prepararon matrices nanofibrosas (M) mediante el electrohilado de una solución de poliuretano comercial Avalon 65 DB (Huntsman Corp.) 18% m/v en DMF y THF (50/50 v/v). El electrohilado se realizó a temperatura ambiente según la configuración descrita en Caracciolo y col. (2017). El equipo de electrohilado consta de una jeringa programable (Activa A22 ADOX S.A., Argentina), una fuente de alimentación de alto voltaje (ES30P, Gamma High Voltage Research Inc., EE. UU.) y una placa colectora de aluminio con conexión a tierra. Las soluciones fueron inyectadas a una velocidad de flujo de 0.7 mL/h, una distancia de boquilla a colector de 15 cm y una tensión de 10 kV. Las matrices recolectadas se secaron a vacío y temperatura ambiente (20 °C) para eliminar el solvente residual. Las membranas fueron segmentadas en cuadrados de 1.0 ± 0.1 cm² y su espesor fue medido con un calibre Digimatic Series 573 (Mitutoyo Corp., Kawasaki, Japón).

El estudio de inmovilización covalente de HRP sobre membranas nanofibrosas de poliuretano se llevó a cabo en tres etapas. En tubos de ensayo herméticamente cerrados y agitación constante se pusieron en contacto 6 porciones de $1 \pm 0.1 \text{ cm}^2$ de membranas nanofibrosas (M) durante diferentes tiempos (35, 95, 155 y 215 min) con hipoclorito de sodio (NaClO) al 0.3% (m/v) en buffer fosfato (BF) 150 mM, pH 6, a temperatura ambiente. Luego, las membranas fueron lavadas tres veces con solución BF 150 mM, pH 8. De acuerdo a varios autores, durante la funcionalización de materiales poliuretánicos el cloro sustituye al grupo H-uretano (Klement y col., 2002; Caracciolo y col., 2017) (Fig. 5.1a). Posteriormente, la función Cl-uretano introducida sobre la membrana, fue activada mediante epoxidación con alil glicidil éter (AGE) a temperatura ambiente. En este paso se buscó que la superficie del material fuera reactiva a la enzima (Fig.5.1b). Para esto, las membranas se sumergieron durante 48 h en una solución de BF 150 mM (pH 8) que contenía hidrosulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) al 0.1% m/m y AGE 5% m/m. Pasado este tiempo, las membranas activadas (MA) fueron lavadas 10 veces con BF 150 mM (pH 8) y secadas a vacío durante toda la noche.

Finalmente, la HRP se inmovilizó sobre las membranas activadas (MA) haciendo reaccionar los grupos amino de la HRP con los grupos epoxi de la superficie de la membrana (Fig. 5.1c). Para esto, diferentes soluciones de HRP (100 - 500 mg/L) fueron preparadas en buffer fosfato 100 mM, pH 8. Luego, 6 porciones de MA de $1.0 \pm 0.1 \text{ cm}^2$ se sumergieron en 9 mL de HRP dentro de tubos de ensayos herméticamente cerrados y con agitación constante. Se estudiaron diferentes temperaturas (20 y 40 °C) y distintos tiempos de inmovilización (4 - 60 h) (Fig. 5.2). Finalmente, las membranas fueron lavadas con cloruro de sodio 2M (NaCl) por 2 h y luego lavadas 5 veces con buffer fosfato pH 8. Asimismo, también se sintetizaron biocatalizadores sobre las membranas electrohiladas por medio de inmovilización de HRP por adsorción (ME). Para ello, 6 porciones de membranas electrohiladas nativas (M) fueron sumergidas en 9 mL de HRP (500 mg/L) durante 60 h a pH

8 y a diferentes temperaturas (20 y 40 °C). Con el objeto de evaluar la inmovilización de HRP sobre las membranas, se monitoreó la concentración de enzima en solución de inmovilización mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). La cantidad de enzima inmovilizada se calculó empleando un balance de masa para la enzima. En el Capítulo 2 se describe en detalle el procedimiento para determinación de proteína (Secc. 2.2.3) y los cálculos realizados (Secc. 2.2.4) para determinar la carga específica de enzima sobre las membranas (Q , mgHRP/cm²).

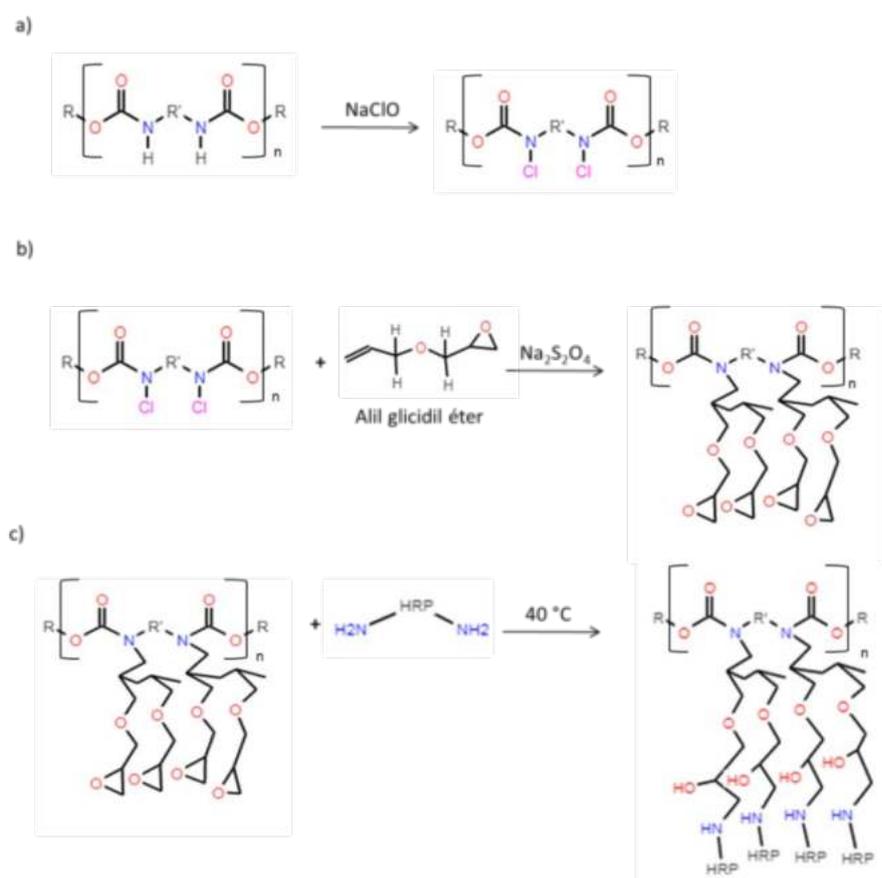


Figura 5.1. Inmovilización covalente de HRP sobre membranas de poliuretano: a) Funcionalización de los grupos uretano. b) Activación con grupos epoxi. c) Inmovilización de la HRP.

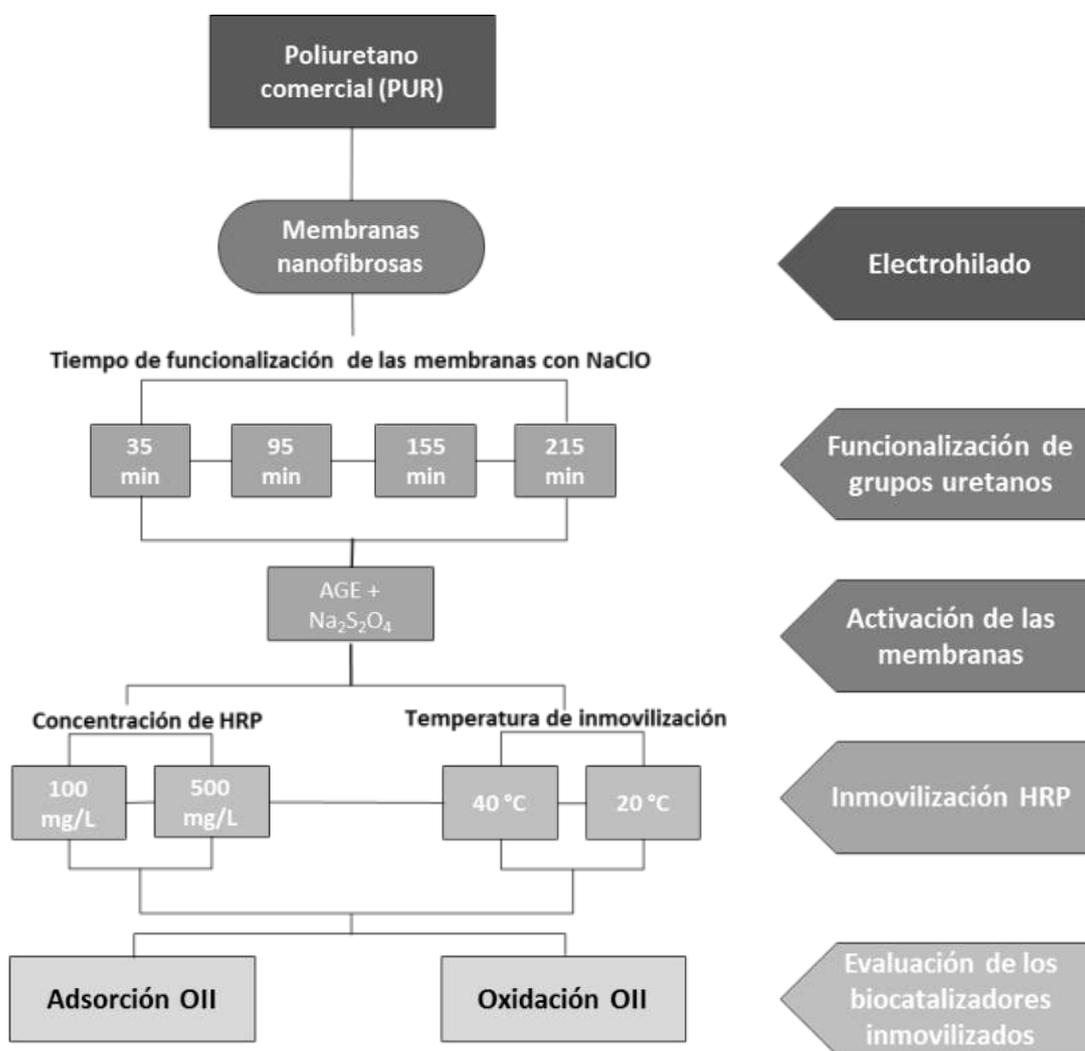


Figura 5.2. Representación esquemática de las variables estudiadas en el procedimiento de inmovilización covalente de HRP sobre nanofibras de poliuretano electrohiladas.

5.2.3 Remoción de orange II en presencia de biocatalizadores inmovilizados sobre membranas nanofibrosas

Se emplearon 4 tipos de membranas de nanofibras de poliuretano en ensayos de decoloración de orange II: 1) membrana sola (M), 2) membrana activada (MA), 3) membrana con la enzima adsorbida (ME), y 4) membrana activada con la enzima inmovilizada covalentemente (MAE). En todos los casos, se realizaron experimentos de adsorción y de oxidación enzimática de orange II (OII). Para evaluar la adsorción del colorante, se puso en contacto la membrana en estudio, con una solución de OII en ausencia de peróxido de hidrógeno (P). Por otra parte, para evaluar la oxidación, las membranas (con y sin la enzima) se pusieron en contacto con OII y peróxido de hidrógeno. Los ensayos de decoloración OII con P en presencia de los biocatalizadores inmovilizados (oxidación enzimática) fueron llevados a cabo a temperatura ambiente (20 ± 2 °C). Básicamente, una porción de membrana de 1.0 ± 0.1 cm² era sumergida en un tubo de ensayo que contenía 4 mL de solución buffer fosfato 100 mM (pH 5, 7 y 9) y 0.2 mL de OII (1 mM). La reacción se iniciaba mediante el agregado de 0.2 mL de H₂O₂ (2 mM). Asimismo, bajo las condiciones mencionadas anteriormente, se realizaron ensayos de decoloración de OII con P en presencia de membranas solas (M o MA), es decir, sin enzima. Por su parte, durante la decoloración de OII sin P, una porción de M, MA, ME o MAE (1.0 ± 0.1 cm²) fue sumergida en 4.4 mL de OII (0.045 mM) dentro de tubos de ensayo herméticamente cerrados y con agitación constante. La Figura 5.3 muestra un esquema de los ensayos realizados.

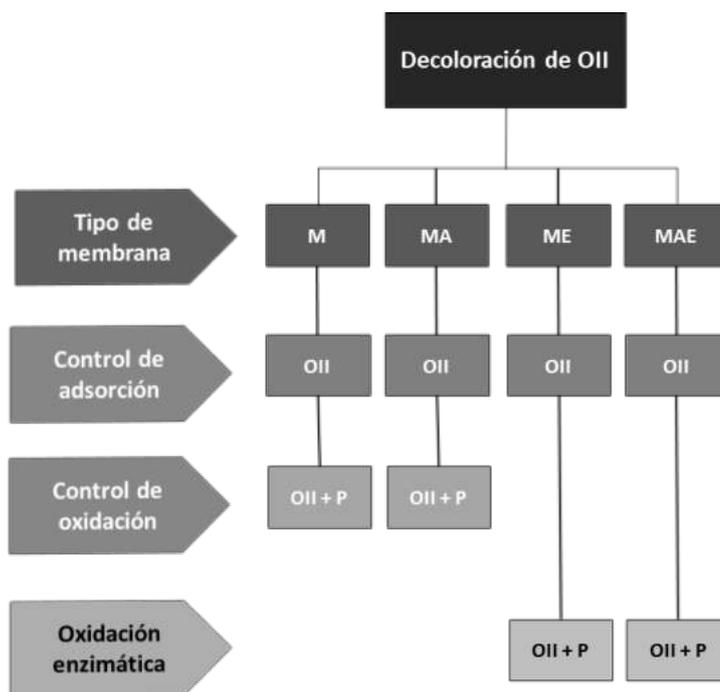


Figura 5.3. Remoción de Orange II (OII) con y sin peróxido de hidrógeno (P) en presencia de membranas nanofibrosas de poliuretano sin (M o MA), y con (ME o MAE) la enzima inmovilizada.

Cabe destacar que las condiciones de decoloración de OII con P fueron seleccionadas a partir de los resultados obtenidos en el Capítulo 3, en donde se demuestra que para obtener remociones de OII cercanas al 90%, el peróxido debía estar en exceso. La relación P_0/S_0 (mol/mol) necesaria depende del pH, y es equivalente a 1.5, 1.0 y 0.5 mol/mol para pH 5, 7 y 9, respectivamente. Nótese que de acuerdo a las condiciones experimentales empleadas en el presente Capítulo, P_0/S_0 fue igual a 2 mol/mol. Es decir que P siempre estuvo en exceso, respecto a OII. Por su parte, es preciso resaltar que en el Capítulo 3 se demostró que la velocidad de decoloración también es función de la concentración inicial de OII. Por tal motivo, las concentraciones iniciales de OII (0.045 mM) y P (0.09 mM) en la

mezcla de reacción siempre fueron las mismas en todos los experimentos. Por lo tanto, en principio la velocidad de decoloración de OII debería ser solo función de la cantidad de enzima en el sistema. Los biocatalizadores fueron evaluados mediante la velocidad inicial de decoloración. Los valores de velocidad inicial de decoloración de OII se calcularon mediante un modelo de pseudo primer orden utilizando el programa SigmaPlot (Versión 14.0/2018, Systat Software Inc.), como se describe en el Capítulo 2. Luego, se calculó la velocidad específica inicial de decoloración del biocatalizador (V_{eD0} , mM/h/cm²) como el cociente entre V_{D0} y el área de la membrana electrohilada (cm²). Finalizado cada ensayo de oxidación enzimática, las membranas utilizadas (ME y MAE) se lavaron tres veces con la solución de buffer fosfato. Luego, fueron reutilizadas en ensayos de oxidación de OII con P (pH = 9). Este procedimiento se repitió durante una semana. Además, cada vez que la reacción finalizaba, se determinó la actividad peroxidasa en la mezcla de reacción (AP, mM/h) para verificar la lixiviación de la enzima desde la membrana hacia la fase homogénea. Para ello, al finalizar cada ensayo de oxidación de OII, se tomó 1 mL del sobrenadante de la reacción. Luego, este sobrenadante se hizo reaccionar con 0.05 mL de OII (1 mM) y 0.05 mL de P (2 mM) en una celda de metacrilato. Las soluciones fueron preparadas en BF 100 mM a pH 9. La actividad peroxidasa del sobrenadante (AP, mM/h) se obtuvo a partir de la pendiente de la curva de absorbancia (A, a.u.) en función del tiempo (t, h) medida en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800. El coeficiente de extinción molar del OII en las condiciones experimentales fue de 19.5 u.a./cm/mM. Cabe aclarar que todos los experimentos descriptos en el presente Capítulo se realizaron por triplicado.

5.2.4. Caracterización de las membranas (M, MA) y los biocatalizadores (ME, MAE)

Se realizó la caracterización morfológica de las membranas producidas antes de la inmovilización, y finalizados los ensayos de decoloración de OII, mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) en un equipo JEOL modelo JSM-6460LV. El diámetro de las

fibras (Cap. 2) fue determinado mediante el software Image Pro (Versión 6). El diámetro de las fibras fue analizado mediante un test de diferencia de medias empleando el programa SigmaPlot (Versión 14.0/2018. Systat Software Inc.). En el Capítulo 2 (Secc. 2.3.1) se describe a detalle la técnica SEM empleada.

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1. Caracterización de los materiales

La Figura 5.4 muestra algunos ejemplos de las membranas nanofibrosas producidas. El equipo empleado generaba membranas circulares de aproximadamente 12 cm de diámetro de espesor medio de 0.06 ± 0.01 cm. Las membranas eran cortadas en tiras de 1 cm de ancho, y luego fraccionadas en cuadrados de 1 cm de lado para su uso posterior.



Figura 5.4. Membrana electrohilada de poliuretano.

La Figura 5.5 muestra las micrografías SEM de las membranas antes (Fig. 5.5a) y después (Fig. 5.5b-e) de los tratamientos de funcionalización y activación. En términos generales, se observan fibras continuas, lisas, sin perlas y con una distribución al azar. La Figura 5.5f-j muestra micrografías SEM de los biocatalizadores después de su utilización en 3 ciclos de oxidación de OII con P. A modo general, en las Figura 5.5f-j se observa que la nanoestructura de las membranas no tuvo cambios notorios después del uso.

Para confirmar que no se afectaba el diámetro de las fibras con el uso, se cuantificó el diámetro de las fibras. En el Apéndice A2 se muestra que el diámetro de las fibras (d) seguía una distribución log-normal. La Tabla 5.1 muestra la media y el desvío estándar (SD) para $\text{Log}(d)$ de las membranas estudiadas. Los resultados mostrados en la Tabla 5.1 indican que no hubo grandes diferencias entre las medias de las muestras m1 a m10. Los resultados del análisis estadístico del diámetro de las nanofibras de las membranas (Apéndice A2) sugieren que los procedimientos de funcionalización y activación de las membranas, en términos generales, no afectaron la integridad de las fibras, que se mantuvo incluso después de la inmovilización de la HRP y luego de tres ciclos de oxidación de OII con peróxido de hidrógeno.

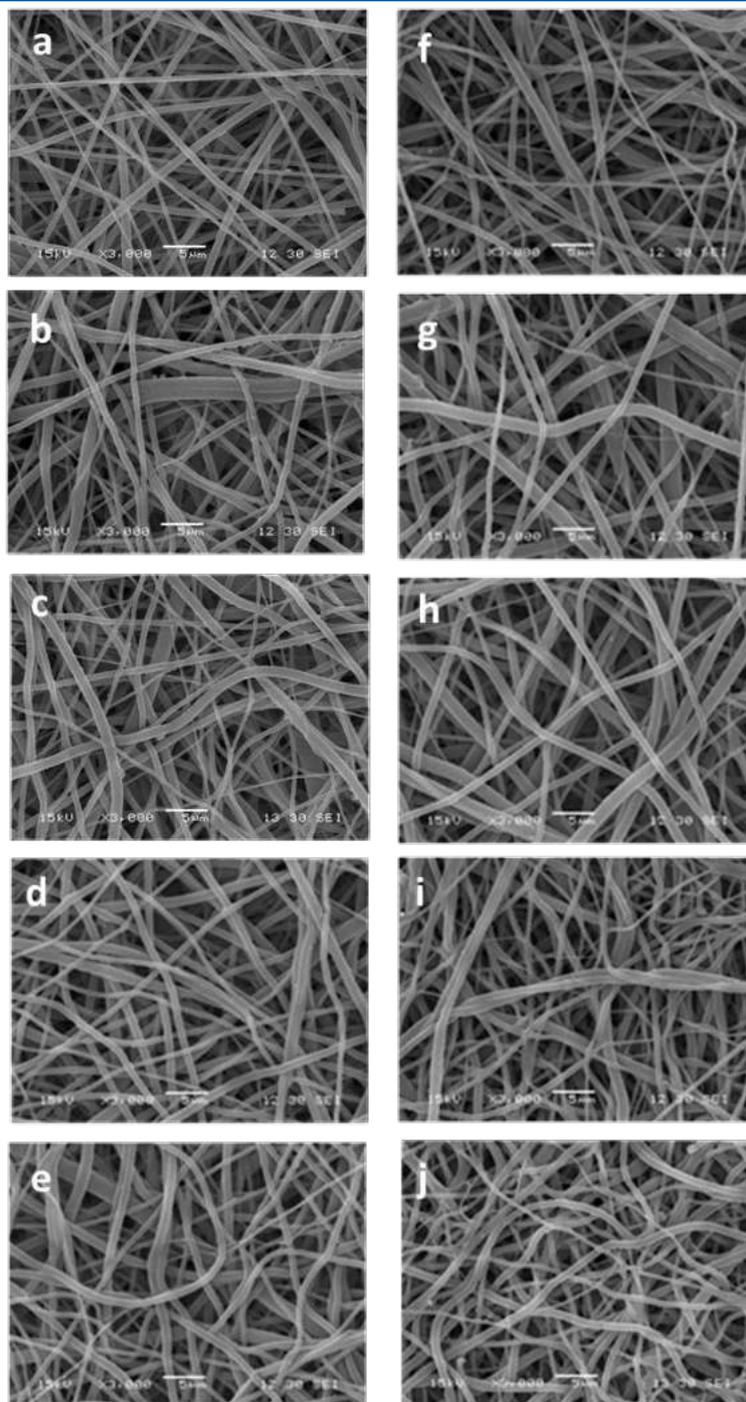


Figura 5.5. Micrografías SEM de membranas nanofibrosas: a) nativa, b-e) activadas con AGE luego de funcionalización con NaClO, f-j) luego de inmovilización de la HRP y tres ciclos de oxidación de OII con P. Tiempos de funcionalización: a, f (sin tratamiento de modificación superficial) b, g (35 min), c, h (95 min), d, i (155 min), e, j (215 min).

Tabla 5.1. Valores de la media y el desvío estándar (SD) para Log(d) calculados a partir del diámetro de las nanofibras de membranas electrohiladas con y sin tratamiento de activación, y con la HRP inmovilizada y 3 usos en la decoloración de OII con P.

| t_f (min) | Nombre | Sin HRP | | Nombre | Con HRP y 3 usos | |
|-------------|--------|------------|------|--------|------------------|------|
| | | Media (nm) | SD | | Media (nm) | SD |
| 0 | m1 | 2.86 | 0.13 | m2 | 2.82 | 0.14 |
| 35 | m3 | 2.91 | 0.21 | m4 | 2.89 | 0.21 |
| 95 | m5 | 2.88 | 0.20 | m6 | 2.89 | 0.20 |
| 155 | m7 | 2.91 | 0.16 | m8 | 2.82 | 0.19 |
| 215 | m9 | 2.83 | 0.19 | m10 | 2.82 | 0.17 |

t_f : Tiempo de funcionalización de la membrana. SD: Desviación estándar. $t_f = 0$ corresponde a la membrana electrohilada nativa, sin modificaciones.

La inmovilización de HRP sobre las membranas fue verificada cualitativamente mediante el método colorimétrico con azul de toluidina (Caracciolo y col., 2017). Primero se funcionalizaron 6 porciones de 1.0 cm² de membranas nanofibrosas durante 35 min con NaClO, activadas con alil glicidil éter. Posteriormente, las membranas funcionalizadas fueron puestas en contacto con 9 mL de una solución de HRP (100 mg/L) durante 60 h a pH 8 y 40 °C. Finalmente, las membranas activadas y con la enzima (MAE) fueron lavadas con una solución de NaCl (2 M) para eliminar la enzima lábil luego del procedimiento de inmovilización. Con el objeto de verificar la presencia de enzima, muestras del biocatalizador inmovilizado (MAE) y de la membrana nativa (M) fueron sumergidas en 10 mL de una solución 0.08 % m/v de azul de toluidina, pH 10. La Figura 5.6 muestra que mientras que la membrana nativa (M) presentaba una coloración blanquecina, la MAE tenía un fuerte color azulado, revelando la presencia de enzima, aún después del lavado con NaCl (2M).



Figura 5.6. Verificación cualitativa de la inmovilización de HRP sobre la membrana de poliuretano. Izquierda: membrana nativa. Derecha: HRP inmovilizada sobre la membrana.

Una vez verificada la presencia de enzima inmovilizada, se utilizó un segmento de MAE en un ensayo típico de decoloración de orange II (OII) con peróxido de hidrógeno (P). Para esto, una porción de MAE se depositó en el fondo de una cubeta de cuarzo de 3 mL y 1 cm de ancho, junto con 2 mL de buffer fosfato (100 mM, pH 9), 0.1 mL de OII (1 mM), 0.1 mL de P (2 mM). Además, se realizó un ensayo control de adsorción sumergiendo MAE en 2.1 mL del buffer fosfato y 0.1 mL de OII (1 mM), en ausencia de peróxido. Los resultados mostraron que las velocidades iniciales de decoloración de OII con y sin P fueron similares ($V_{D0} = 2 \pm 1 \times 10^{-3}$ mM/h), sugiriendo que la decoloración se debía principalmente a la adsorción del colorante sobre MAE. Teniendo en cuenta que se verificó la presencia de enzima inmovilizada sobre la membrana (Fig. 5.6), este resultado sugería la desactivación de la enzima, probablemente, a causa del lavado final con NaCl (2 M).

El efecto inhibitorio del NaCl sobre algunas enzimas ha sido reportado por varios autores (Mammarella, 2001; López, 2005). En general, el NaCl afecta la actividad y estabilidad de las enzimas en función de la concentración y el tiempo de contacto con la sal. Para estudiar el efecto del NaCl sobre la HRP, se hizo reaccionar 2 mL de enzima (100 mg/L) preparada en diferentes soluciones de NaCl (0 a 2 M) en buffer fosfato 100 mM a pH 8, con 0.1 mL de OII (1 mM) y 0.1 mL de P (2 mM). La Figura 5.7 muestra que en un medio con NaCl 0.5 M o 2M, la actividad peroxidasa disminuyó hasta el 60 % cuando aumentaron la concentración y el tiempo de contacto con la sal. De acuerdo a este resultado, se decidió eliminar el lavado final de la membrana con NaCl, reemplazándolo con un lavado más suave con agua destilada. En la Tabla 5.2 se comparan los valores de V_{D0} en presencia P empleando MAE con y sin lavado con NaCl. La Tabla 5.2 muestra que las MAE sin el lavado con NaCl tenían una actividad aproximadamente 3 veces mayor que los MAE lavadas con NaCl. Además, los valores de V_{D0} calculados utilizando uno o dos segmentos de MAE sin lavado con NaCl fueron $(6 \pm 1) \times 10^{-3}$ y $(19 \pm 7) \times 10^{-3}$ mM/h, respectivamente, indicando que la velocidad de decoloración se incrementaba con la cantidad de biocatalizador.

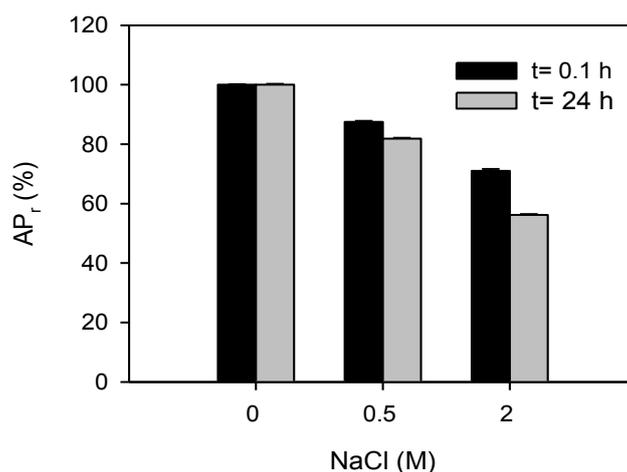


Figura 5.7. Efecto del NaCl sobre la actividad peroxidasa en fase homogénea. Tiempos de contacto de la HRP con NaCl: 0.1 h (negro), 24 h (gris).

Tabla 5.2. Velocidades iniciales de decoloración de OII (V_{D0}) con P en presencia de uno o dos segmentos de MAE, con y sin lavado con NaCl. Condiciones de inmovilización: 40 °C, pH 8 por 60 h. Tiempo de funcionalización: 35 min. Concentración de enzima en la mezcla de inmovilización: 100 mg/L. Condiciones de decoloración de OII: $OII_0 = 0.045$ mM, $P_0 = 0.090$ mM. $V_T = 2.2$ mL. pH = 9. Tiempo de reacción: 1 h.

| Muestra | Lavado con NaCl | Volumen de MAE (cm ²) | $V_{D0}(\text{mM/h}) \times 10^{-3}$ |
|---------|-----------------|-----------------------------------|--------------------------------------|
| MAE-1 | Sí | 1 | 2 ± 1 |
| MAE-2 | No | 1 | 6 ± 1 |
| MAE-3 | No | 2 | 19 ± 7 |

5.3.2. Optimización del procedimiento de inmovilización de la HRP

En la Sección anterior se determinó que la técnica propuesta por Caracciolo y col (2017) fue exitosa para inmovilizar la HRP, y que la velocidad inicial de decoloración de OII con P dependía de la cantidad de enzima en el sistema. Sin embargo, para obtener biocatalizadores con alguna relevancia económica, es necesario que los mismos tengan una alta actividad catalítica, o sea, una alta carga específica de enzima inmovilizada sobre la membrana (Q , mgHRP/cm²). Con este objetivo en mente, se estudió el efecto de las siguientes variables:

- Tiempo de inmovilización
- Concentración de HRP en la mezcla de inmovilización
- Tiempo de funcionalización de las membranas
- Temperatura de inmovilización

5.3.2.1. Tiempo de inmovilización. Estos ensayos de inmovilización se realizaron sumergiendo 6 porciones de membranas (todas ellas funcionalizadas a 35 min y activadas con alil glicidil éter) en 9 mL de HRP (100 mg/L) a pH 8 y 40 °C. La carga específica de enzima inmovilizada (Q) se evaluó en función del tiempo, según se describe en el Capítulo 2 (Secciones: 2.2.3 y 2.2.4). La Figura 5.8 muestra que la inmovilización de enzima fue despreciable para tiempos menores a 10 horas. Posteriormente, la carga de enzima inmovilizada aumentó con el tiempo, alcanzando un máximo valor de aproximadamente 0.08 ± 0.01 mgHRP/cm² entre las 35 y 60 h de inmovilización. Resultados similares fueron reportados por Caracciolo y col. (2017), quienes inmovilizaron heparina sobre membranas nanofibrosas de poliuretano mediante unión covalente. Según esos autores, la carga de heparina soportada fue mayor cuando la inmovilización fue llevada a cabo durante 60 h a pH 8 y 40 °C. Debe destacarse que aunque estas condiciones pueden ser apropiadas para la inmovilización de heparina, las altas temperaturas y tiempos prolongados pueden afectar negativamente a la actividad de las enzimas. Por esta razón, es deseable reducir tanto el tiempo como la temperatura de inmovilización.

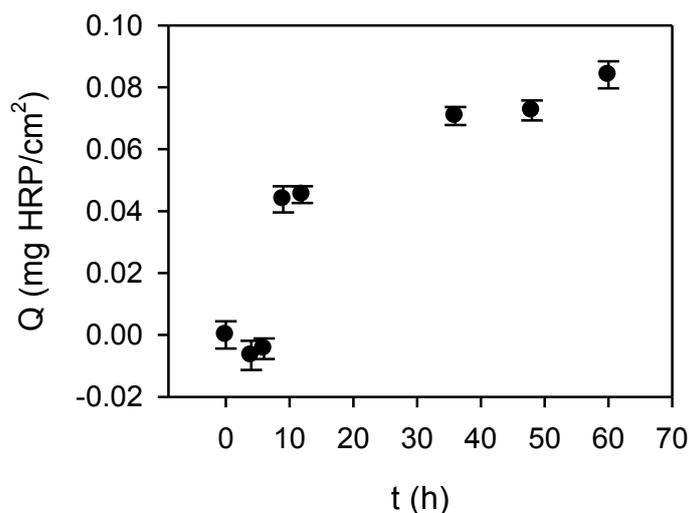


Figura 5.8. Cambio de la carga específica de enzima (Q) en función del tiempo de inmovilización. Condiciones de inmovilización: 40 °C, pH 8 por 60 h. Tiempo de funcionalización: 35 min. Concentración de enzima en la mezcla de inmovilización: 100 mg/L. Las barras indican la desviación estándar.

5.3.2.2. Efecto de la concentración de HRP en la mezcla de inmovilización. Se estudió el efecto de la concentración de enzima en la mezcla de inmovilización sobre la carga enzimática de las membranas (Q). En todos los casos, las condiciones de inmovilización empleadas fueron similares a las descritas en la Sección 5.3.2.1, salvo que la concentración de HRP se incrementó a 500 mg/L. La Tabla 5.3 muestra que aunque la concentración de enzima en la mezcla de inmovilización se multiplicó por 5, Q solo se incrementó 2.5 veces. En este sentido, Gomez y col. (2006) obtuvieron resultados similares durante la inmovilización de peroxidasa de soja y HRP sobre capas de vidrio. A partir de los resultados obtenidos, se decidió que la síntesis de MAE fuera llevada a cabo durante 60 h a 40 °C, pH 8 y utilizando 500 mg/L de HRP. Asimismo, como el aumento de Q no era proporcional al incremento de concentración de enzima en la mezcla de inmovilización, se decidió no aumentar más la concentración de enzima. Esto además reducía los costos asociados al uso de enzima, el cual es el insumo más costoso del procedimiento.

Tabla 5.3. Efecto de la concentración de enzima en la mezcla de inmovilización sobre los valores de carga específica enzimática (Q). Condiciones de inmovilización: 40 °C, pH 8 por 60 h. Los valores de Q se expresan con su correspondiente desviación estándar.

| Inmovilización HRP | | |
|----------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| t_f (min) | C_{HRP} (mg/L) | Q (mgHRP/cm²) |
| 35 | 100 | 0.084 ± 0.004 |
| 35 | 500 | 0.200 ± 0.030 |

t_f: Tiempo de funcionalización de la membrana. C_{HRP}: Concentración de enzima en la mezcla de inmovilización. Q: Carga específica de enzima inmovilizada.

5.3.2.3. Efecto del tiempo de funcionalización. Otra variable importante para incrementar la carga de enzima sobre la membrana (Q) es el número de sitios disponibles de la membrana para la unión de la enzima. Estos sitios son función del número de grupos uretanos que se logran activar con NaClO insertando una función Cl en lugar de H (Fig. 5.1a). Esto se puede conseguir incrementando el tiempo de funcionalización (t_f), es decir, el tiempo de contacto entre las membranas nativas y la solución de NaClO. Es importante destacar que de acuerdo a Caracciolo y col. (2017), un tiempo de funcionalización excesivo pueden provocar el deterioro de las propiedades mecánicas de las membranas. Por lo tanto, es muy importante no llegar a esta condición límite de ruptura de la estructura membrana.

La Tabla 5.4 muestra que los valores de Q aumentaron cuando t_f se incrementó de 35 a 95 minutos. Sin embargo, tiempos superiores a 95 min no ocasionaron aumentos significativos en Q. Por otra parte, aunque las membranas tomaban un leve color amarillento a medida que se incrementaba t_f debido a la oxidación por el NaClO, en ningún caso se observaron cambios apreciables en la textura de las membranas. Resultados similares fueron obtenidos por Caracciolo y col. (2017) quienes observaron que el aumento del tiempo de

funcionalización (t_f) de la membrana incrementó significativamente la sustitución de los grupos H-uretano sobre la superficie, maximizando la epoxidación del material y, en consecuencia, incrementando la carga de proteína soportada.

Tabla 5.4. Efecto del tiempo de funcionalización (t_f) de grupos uretano sobre los valores de carga específica de la membrana (Q). Condiciones de inmovilización: 40 °C, pH 8 por 60 h.

Concentración de enzima en la mezcla de inmovilización: 500 mg/L. Los valores de Q se expresan con su correspondiente desviación estándar

| t_f (min) | Q (mgHRP/cm ²) |
|-------------|----------------------------|
| 35 | 0.20 ± 0.03 |
| 95 | 0.30 ± 0.02 |
| 155 | 0.28 ± 0.03 |
| 215 | 0.29 ± 0.03 |

5.3.2.4. Efecto de la temperatura de inmovilización. Otro punto importante en la obtención de biocatalizadores con alta actividad es la temperatura de inmovilización de la enzima sobre el soporte. Por esta razón, se realizaron ensayos de inmovilización a dos temperaturas (20 y 40 °C) a pH 8 por 60 h. La concentración de enzima en la mezcla de inmovilización fue de 500 mg/L. En ambos casos, la activación de las membranas se hizo empleando un tiempo de funcionalización (t_f) de 95 min con NaClO. Con el objeto de evaluar la contribución de la inmovilización de la enzima por adsorción, se realizaron ensayos de inmovilización sobre membranas nativas empleando en las mismas condiciones de inmovilización, pero sin hacer previamente la funcionalización y activación de las membranas.

La Figura 5.9 muestra los valores de Q obtenidos para las membranas de poliuretano con la HRP inmovilizada por adsorción (ME) o sobre membranas activadas (MAE) en función de la temperatura de inmovilización. En general, se observa que la HRP pudo inmovilizarse mediante las dos técnicas estudiadas, siendo mayor la inmovilización por unión covalente (MAE) respecto de la adsorción (ME). Nótese además que en ambos casos los valores de Q fueron más altos cuando la inmovilización de HRP se realizó a 40 °C respecto de los resultados obtenidos a temperatura ambiente. En este sentido, Cabrera y col. (2017) obtuvieron resultados similares durante la inmovilización de una invertasa sobre nanopartículas de diatomitas magnetizadas.

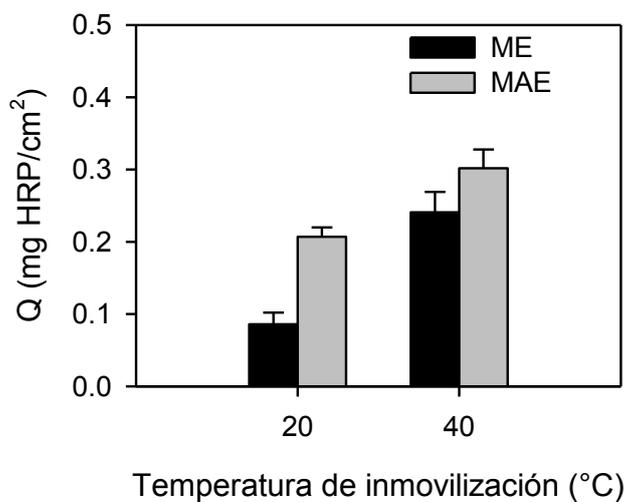


Figura 5.9. Efecto de la temperatura de inmovilización en la carga enzimática específica (Q) de membranas obtenidas por adsorción (ME, barras negras) o unión covalente (MAE, barras grises). Tiempo de funcionalización de MAE: 95 min. Condiciones de inmovilización: 500 mg/L HRP, pH 8, 60 h.

Los resultados obtenidos demuestran que para maximizar la carga de enzima soportada sobre las membranas de poliuretano (Q), la inmovilización debía realizarse empleando las siguientes condiciones:

- Tiempo de funcionalización con NaClO (0.3% m/v) = 95 min
- Concentración de HRP en la mezcla de inmovilización = 500 mg/L
- Tiempo de inmovilización = 60 h
- Temperatura de inmovilización = 40 °C

5.3.3. Estudio de la decoloración de orange II empleando HRP inmovilizada sobre membranas de poliuretano

Una vez definidas las mejores condiciones de inmovilización covalente la HRP sobre las membranas de poliuretano (membranas MAE), se estudió la actividad de los biocatalizadores empleando la reacción de decoloración de orange II (OII). A efectos comparativos, se realizaron los mismos ensayos de decoloración pero empleando membranas de poliuretano nativas (M), activadas (MA), y con la HRP inmovilizada por adsorción (ME). Asimismo, se realizaron ensayos de decoloración de OII en ausencia de peróxido (P) con el objeto de evaluar la adsorción del colorante sobre los diferentes tipos de membranas estudiadas, y ensayos en presencia de peróxido, en los cuales se evaluaba la remoción del colorante tanto por adsorción como por oxidación. En la Figura 5.9 se muestran los resultados obtenidos.

En las Figuras 5.10a,c se observa que cuando se realizaron ensayos de decoloración de OII empleando la membrana nativa (M) y la activada (MA), los valores de C_{OII} disminuyeron lentamente, alcanzando valores de alrededor de 0.04 mM al cabo de 4 horas. Asimismo, los resultados obtenidos con M y MA en ausencia de P fueron similares a los obtenidos cuando se agregó P al medio de reacción. Debido a que ambas membranas (M, MA) no contenían enzima, este resultado es muy importante, ya que indicaba que las membranas por sí solas no tenían la capacidad de catalizar la oxidación de OII por P. Además, la Figura 5.10 muestra también que se obtuvieron resultados similares cuando se realizaron ensayos de decoloración de OII empleando ME (Fig. 5.10b) o MAE (Fig. 5.10d) en ausencia de P. Teniendo en cuenta que el volumen total de la mezcla era de 4.4 mL, y considerando que se empleaban porciones de 1 cm^2 de membranas, a partir de los datos mostrados en la Figura 10 respecto de la remoción de OII por adsorción, se estimó que las membranas podían adsorber entre 0.01 y $0.02 \mu\text{moles}$ de OII por cm^2 de membrana. De acuerdo a la literatura revisada, lamentablemente no se encontraron datos como para comparar este resultado con otros autores. Es importante destacar que en la mayoría de los estudios relacionados con el uso de enzimas inmovilizadas reportados en literatura no se pone énfasis en la discriminación de los procesos de adsorción y reacción del compuesto removido, informando solamente el proceso de remoción conjunta (Niu y col., 2013; Xu y col., 2013, 2015).

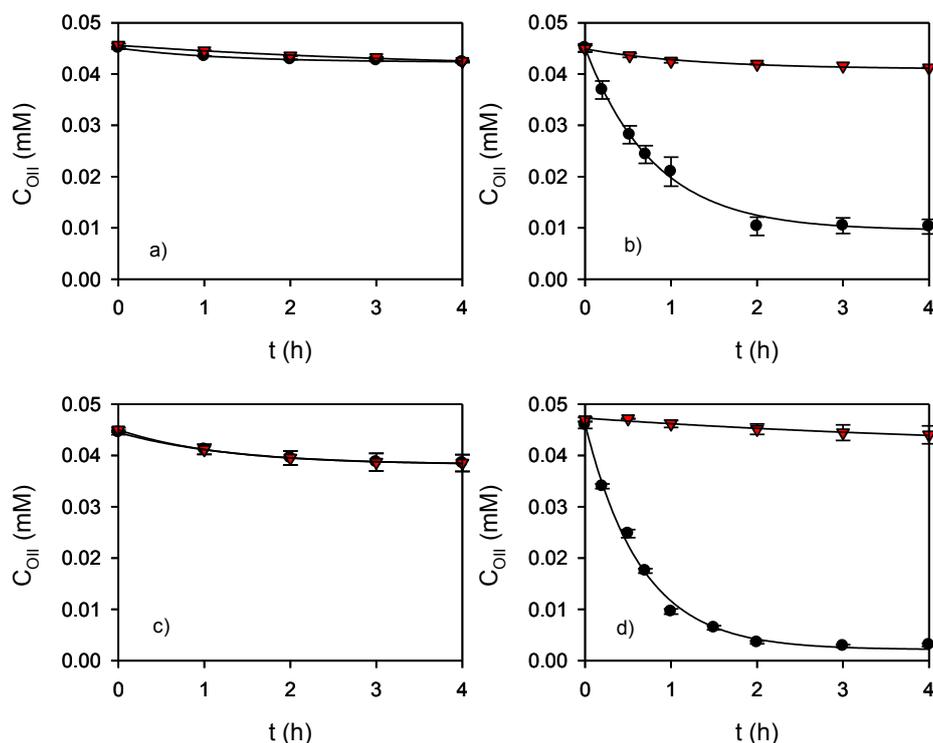


Figura 5.10. Decoloración de OII en presencia de M (a), ME (b), MA (c) y MAE (d) con (círculos negros) y sin (triángulos rojos) peróxido de hidrógeno. Las condiciones de inmovilización de la enzima y de reacción se detallan en el texto. Las barras indican la desviación estándar.

Los resultados de decoloración de soluciones de OII en ausencia de P demuestran que todos los tipos de membranas estudiadas (M, MA, ME, MAE) se comportaban en forma similar respecto de la adsorción del colorante. En contraste, cuando la remoción de OII se realizó en presencia de P empleando membranas con enzima unida por adsorción (ME, Fig. 5.10b) o covalentemente (MAE, Fig. 5.10d), la concentración de OII (C_{OII}) disminuyó rápidamente desde 0.045 mM hasta estabilizarse luego de 2 horas de reacción en un valor mínimo cercano a 0.01 mM para ME y 0.003 mM en el caso de MAE. Se observa además que no solo la decoloración total fue mayor, sino que también la velocidad inicial de

decoloración empleando la MAE en relación a la ME. Este resultado es consistente con la mayor carga enzimática de MAE respecto de ME (Fig. 5.9).

Con el objeto de confirmar si la remoción observada se debía a procesos de adsorción o adsorción/oxidación, se analizó el cambio de los espectros UV/Visible en cada caso. La Figura 5.11 muestra que cuando se emplearon M (Fig. 5.11a) y MA (Fig. 5.11c) en los ensayos de decoloración, no se observaron cambios en la forma de los espectros luego de 4 horas. Se observó una leve disminución de toda la intensidad del espectro, lo que indicaba que solo había una disminución de la concentración de OII, característico de un proceso de adsorción. Asimismo, debido a que no aparecían nuevas bandas ni se deformaban los espectros, esto indicaba que no había oxidación del colorante para formar otros productos. Considerando que los experimentos se realizaron en presencia de peróxido, estos resultados confirmaban que las membranas M y MA por sí solas no podían catalizar la oxidación de OII por P. Por el contrario, cuando se emplearon membranas con la enzima inmovilizada, ya sea por adsorción (ME, Fig.5.11b) o por unión covalente (MAE, Fig. 5.11d), los espectros UV/Visibles mostraron tres aspectos importantes: 1) una disminución de las bandas de absorción características del OII, 2) la formación de una nueva banda alrededor de 340 nm, y 3) la presencia de al menos 3 puntos pseudoisobásticos a 290, 320 y 375 nm. Estos resultados, que son similares a los mostrados en el Capítulo 3 en donde se estudió la oxidación de OII con peróxido de hidrógeno en presencia de la HRP en fase homogénea, demuestran claramente la capacidad de las membranas ME y MAE para catalizar la oxidación de OII por P.

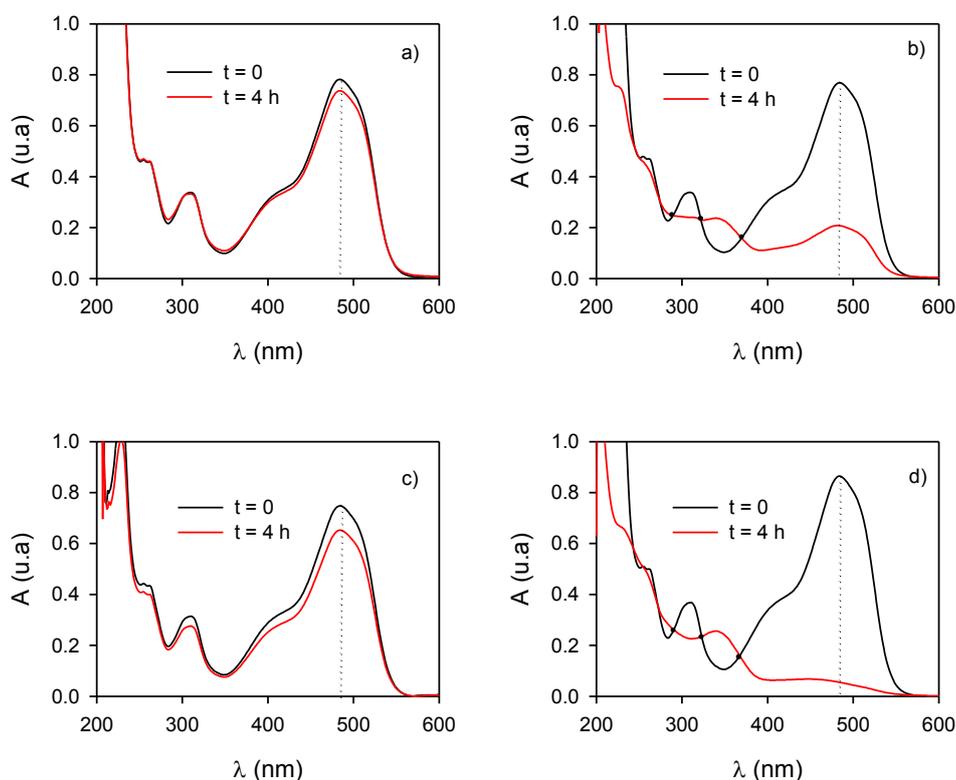


Figura 5.11. Espectros UV/Visible durante experimentos de decoloración de OII en presencia de peróxido de hidrógeno empleando M (a), ME (b), MA (c), y MAE (d). Las condiciones de inmovilización de la enzima y de reacción se detallan en el texto. Las líneas continuas indican el espectro a diferentes tiempos: $t = 0$ (línea negra), $t = 4$ h (línea roja). Las líneas discontinuas indican $\lambda = 485$ nm. Los símbolos negros en b) y d) indican los puntos pseudoisobésticos.

5.3.3.1. Efecto de la temperatura de inmovilización sobre la actividad catalítica. En la Sección 5.3.2.4 se demostró que la temperatura de inmovilización afectaba la carga enzimática (Q) de las membranas. La Figura 5.9 muestra que tanto para una inmovilización por adsorción (ME) como por unión covalente (MAE), los valores de Q se incrementaban

con el aumento de temperatura de inmovilización. Sin embargo, un alto valor de Q no implica una alta actividad enzimática, ya que es posible que la enzima inmovilizada a altas temperaturas no conserve su actividad. Por esta razón, se evaluó el efecto de la temperatura de inmovilización de la HRP sobre la actividad catalítica de las membranas ME y MAE.

La Figura 5.12 muestra los perfiles de decoloración de OII con P en presencia de MAE y ME, ambos biocatalizadores sintetizados empleando temperaturas de inmovilización de 20 y 40°C. En general, se observa que durante la oxidación enzimática de OII utilizando los biocatalizadores sintetizados a 20°C, la concentración del colorante disminuyó rápidamente desde 0.045 mM hasta estabilizarse en un valor mínimo cercano a 0.005 mM, luego de 0.6 horas de iniciada la reacción. Por el contrario, cuando los biocatalizadores fueron sintetizados a 40°C, la concentración de OII solo alcanzó un valor de aproximadamente 0.02 mM en ese mismo tiempo.

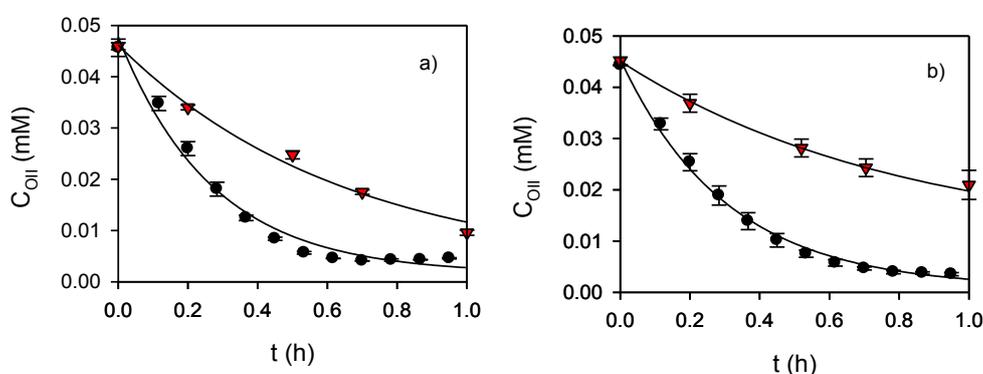


Figura 5.12. Decoloración de OII con P en presencia de MAE (a) y ME (b) sintetizados a 20°C (círculos negros) y 40 °C (triángulos rojos). Las condiciones de inmovilización de la enzima y de reacción se detallan en el texto. Las barras indican el desvío estándar.

A partir de los datos de la Figura 5.12 se calculó velocidad específica inicial de decoloración (V_{eD0} , mM/h/cm²) para cada caso. La Figura 5.13 muestra que con los materiales sintetizados a 20°C se obtuvieron valores aproximadamente tres veces mayores de V_{eD0} con relación a los sintetizados a 40°C. Nótese que este resultado contrasta con los datos mostrados en la Figura 5.9 respecto de la carga enzimática (Q), en donde se muestra que a 40°C los valores de Q eran entre un 50 y un 100% mayores que a 20 °C. Por lo tanto, resulta evidente el efecto negativo que tiene una temperatura de incubación de 40°C en la pérdida de actividad de la enzima inmovilizada.

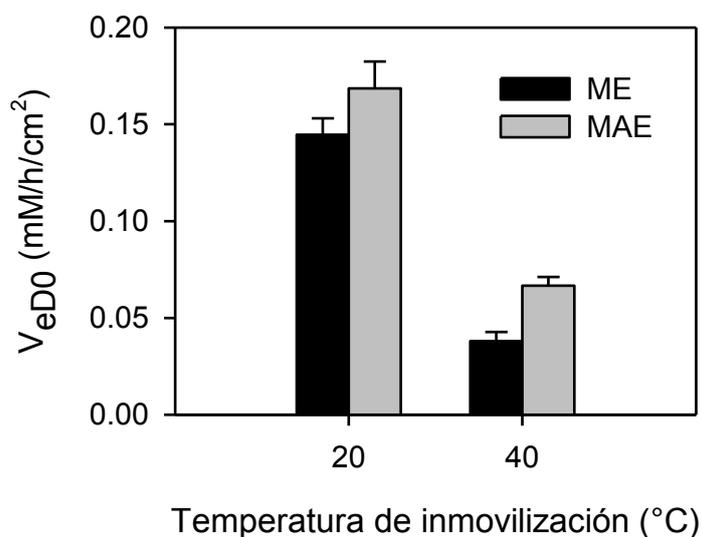


Figura 5.13. Efecto de la temperatura de inmovilización en la velocidad específica inicial de decoloración de OII (V_{eD0}) de las ME (barras negras) y MAE (barras grises). Las condiciones de inmovilización de la enzima y de reacción se detallan en el texto.

Para confirmar lo observado en la Figura 5.13, se estudió el cambio de la actividad de la HRP en fase homogénea en función del tiempo de incubación a 40 °C. Se preparó una solución de HRP (100 mg/L) en buffer fosfato (100 mM). Luego, esta solución se mantuvo a 40 °C. A diferentes tiempos se sacaron muestras, se termostató a 20 °C, y se determinó la actividad peroxidasa de la muestra mediante el ensayo estándar de decoloración de OII con P. La Figura 5.14 muestra que la actividad peroxidasa relativa al inicio del experimento (AP_r) resultó aproximadamente constante durante las primeras siete horas. A partir de entonces, se observó un paulatino descenso de AP_r , llegando a obtenerse apenas un 25% del valor inicial a las 60 h. El efecto de la temperatura en la actividad enzimática es muy variable y depende de cada enzima en particular. Por ejemplo, Altunkaya y Gökmen (2011) reportaron que temperaturas superiores a 30 °C afectaron negativamente la actividad de una peroxidasa de lechuga. Sin embargo, la temperatura óptima de las peroxidases puede variar entre diferentes especies de plantas (Hu y col., 2012).

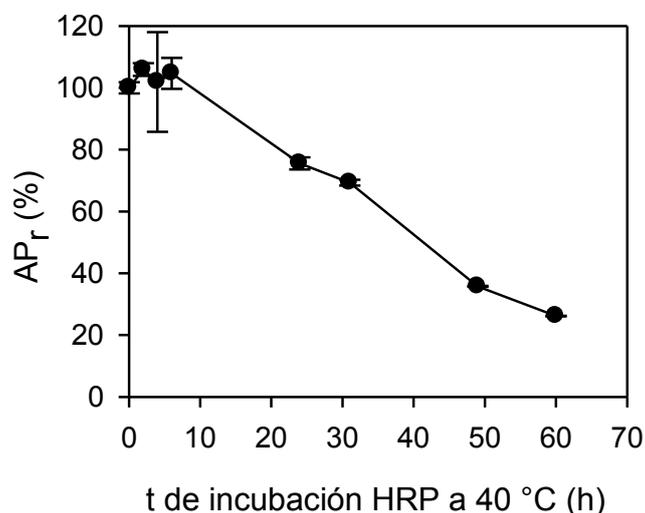


Figura 5.14. Efecto del tiempo de incubación a 40°C en la actividad peroxidasa relativa (AP_r). Los resultados se expresan como porcentaje del valor inicial. Las barras indican los valores de la desviación estándar.

5.3.3.2. Efecto del pH en la actividad catalítica de ME y MAE. Como se trató en el Capítulo 3, el pH del medio de reacción influye significativamente en la actividad catalítica de la HRP en fase homogénea. En esta Sección se estudió el efecto del pH en la actividad de los biocatalizadores obtenidos por inmovilización por adsorción (ME) o unión covalente (MAE). De acuerdo a los resultados de la Sección anterior, se empleó una temperatura de 20°C durante la inmovilización de la HRP sobre las membranas. La Figura 5.15 muestra el efecto del pH en la velocidad específica inicial de decoloración (V_{eD0}) correspondiente a ME y MAE. En contraste con la oxidación a pH 5 y 7, se observa que V_{eD0} aumentó aproximadamente 10 veces cuando la oxidación se realizó a pH 9. Estos resultados son similares a los informados en el Capítulo 3 durante el estudio de la enzima en fase homogénea, donde se demostró que a pHs comprendidos entre 9 y 10 se obtenía la mayor actividad de la enzima. Esto indica que el pH condiciona a la enzima inmovilizada de la misma forma que si estuviera libre en solución.

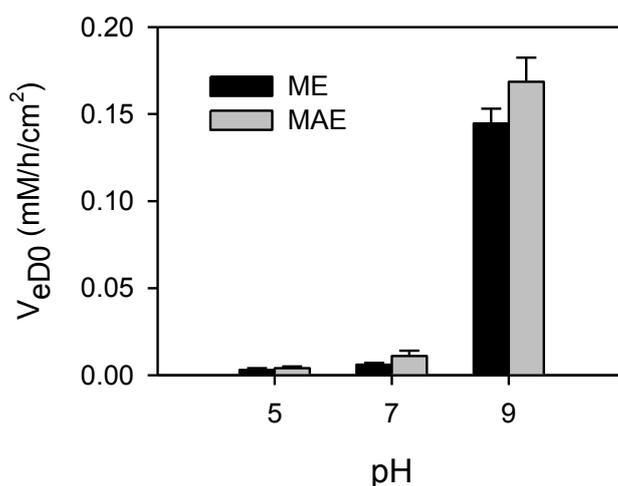


Figura 5.15. Efecto del pH en la velocidad inicial específica de decoloración de OII (V_{eD0}) catalizada por ME (barras negras) y MAE (barras gris). En este caso la inmovilización se realizó a 20 °C. Condiciones de reacción: $OII_0 = 0.045$ mM, $P_0 = 0.090$ mM. $V_T = 4.4$ mL.

5.3.3.3. Ensayos de reutilización de los biocatalizadores ME y MAE. La retención de enzimas en medios sólidos insolubles permite su reutilización (Mateo y col., 2007; Zdarta y col., 2018a). Con el objetivo de evaluar su estabilidad frente a usos repetidos, los biocatalizadores ME y MAE sintetizados empleando una temperatura de inmovilización de 20 y 40°C, fueron utilizados en diferentes ciclos de oxidación de OII con P a pH 9. La Tabla 5.5 muestra que independientemente del método de inmovilización de la enzima (adsorción o unión covalente) y de la temperatura de inmovilización (20 o 40°C), los biocatalizadores mantuvieron actividad enzimática durante 2 ciclos de oxidación de OII. Además, la Tabla 5.5 muestra que tanto ME como MAE sintetizados empleando una temperatura de inmovilización de 20°C tenían una actividad de 3 a 5 veces mayor que cuando se sintetizaron a 40°C, en concordancia con lo comentado en la Sección 5.3.3.1 y confirmando el efecto negativo de esta temperatura en la actividad de la enzima inmovilizada. La Tabla 5.5 muestra además que luego del tercer uso en la reacción de decoloración de OII, los valores de velocidad específica de decoloración (V_{eD0}) fueron similares en todos los casos estudiados, sugiriendo que el proceso de decoloración en esta etapa se debía principalmente a la adsorción del OII sobre las membranas.

Tabla 5.5. Reutilización de los biocatalizadores inmovilizados en ensayos de oxidación de OII en presencia de peróxido de hidrógeno. V_{eD0} : actividad específica de las membranas. AP: actividad peroxidasa en la solución remanente.

| | | Temperatura de inmovilización | | |
|----------------|------------|---|---|--|
| | | 40°C | 20°C | |
| Muestra | Uso | V_{eD0} (mM/h/cm²) × 10⁻³ | V_{eD0} (mM/h/cm²) × 10⁻³ | AP (mM/h) × 10⁻³ |
| ME | 1 | 38 ± 4 | 145 ± 8 | 177 ± 13 |
| | 2 | 5 ± 2 | 27 ± 4 | 15 ± 4 |
| | 3 | 2 ± 2 | 2 ± 2 | 5 ± 1 |
| MAE | 1 | 66 ± 5 | 170 ± 14 | 216 ± 38 |
| | 2 | 18 ± 6 | 39 ± 3 | 25 ± 15 |
| | 3 | 3 ± 3 | 2 ± 1 | 4 ± 2 |

ME: HRP inmovilizada por adsorción. MAE: HRP inmovilizada por unión covalente.

La disminución de la actividad de biocatalizadores inmovilizados en función del uso y del tiempo de reacción es un problema muy común reportado en la literatura. Según diversos autores este problema se debe a la lixiviación de las enzimas desde el soporte hacia la solución (Niu y col., 2013; Xu y col., 2013; Panatdasirisuk y col., 2015). Para verificar esto, una vez finalizada la reacción de decoloración empleando los biocatalizadores, los mismos fueron retirados y se realizaron ensayos de actividad peroxidasa (AP) de la solución remanente. Nótese que la única fuente de HRP eran las membranas, por lo tanto, una vez retiradas las mismas de la solución, todo rastro de actividad enzimática en solución indicaba

lixiviación de enzima. Además se determinó la cantidad de HRP lixiviada hacia la fase homogénea mediante el método de Bradford, pero no hubo reproducibilidad en los resultados debido a la baja concentración de proteína en la mezcla de reacción.

En la Tabla 5.5 compara la actividad específica de las membranas ME y MAE (V_{eD0}) con la actividad peroxidasa (AP) en la mezcla de reacción al finalizar cada ciclo de uso en oxidación de OII. Se observa que existe una proporcionalidad entre la actividad de las membranas y la actividad peroxidasa del sobrenadante, sugiriendo que en realidad las membranas estaban actuando como dosificadores de enzima, es decir, liberando enzima hacia la solución. Los resultados de la Tabla 5.5 indican que luego del tercer uso las membranas dejaban de tener actividad catalítica apreciable y que además ya no liberaban enzima hacia la solución. Esto confirmaba que la pérdida de actividad de las membranas era principalmente por lixiviación de la HRP hacia la solución.

Diferentes autores informan que una HRP soportada sobre diferentes materiales poliméricos electrohilados mantenía alrededor del 50% de su actividad luego de seis a diez usos (Niu y col., 2013; Xu y col., 2013, 2015). Sin embargo, en los estudios mencionados la reusabilidad de los biocatalizadores inmovilizados no fue evaluada mediante una reacción de remoción completa de un cierto contaminante modelo (tal como el OII empleado en el presente trabajo), sino que solo fueron evaluados durante 5 minutos por vez empleando la oxidación de ABTS, un compuesto muy utilizado para determinar actividad enzimática, pero sin relevancia ambiental. Por lo tanto, esos autores en realidad usaron sus biocatalizadores solamente durante un tiempo total entre 30 y 60 minutos. Por el contrario, en el presente trabajo de Tesis la reusabilidad de los ME y MAE fue evaluada mediante ensayos de oxidación de OII hasta alcanzar la remoción completa del colorante. Dependiendo de la actividad de los mismos, cada ensayo duraba entre 1 a 6 h. Así, teniendo en cuenta solamente los dos primeros usos, el tiempo total de uso de los biocatalizadores desarrollados en el presente trabajo de Tesis estuvo comprendido entre 4 y 10 h. Por lo tanto, en términos del

tiempo total de uso, los biocatalizadores desarrollados en la presente Tesis resultaron muy superiores a los descritos por Niu y col. (2013) y Xu y col.(2013, 2015).

5.4. CONCLUSIONES

En el presente Capítulo se desarrollaron biocatalizadores basados en la inmovilización de la HRP sobre membranas nanofibrosas de poliuretano. Los biocatalizadores desarrollados fueron evaluados empleando la reacción de decoloración de orange II (OII) con peróxido de hidrógeno (P). Mediante la técnica de electrohilado se produjeron membranas nanofibrosas que mantuvieron la integridad de las fibras luego de tratamientos de funcionalización con hipoclorito de sodio y activación con alil glicidil éter, así como la inmovilización de la HRP y tres ciclos de oxidación de OII con P. Los resultados obtenidos demostraron que la enzima se podía inmovilizar tanto por adsorción (ME) como por unión covalente (MAE). La técnica de inmovilización covalente fue modificada con éxito para optimizar la velocidad de decoloración de OII. ME y MAE fueron utilizados con éxito hasta en dos ciclos de oxidación de OII durante un tiempo comprendido entre 4 y 10 h.

Referencias

- Altunkaya, A., y Gökmen, V. (2011). Purification and characterization of polyphenol oxidase, peroxidase and lipoxygenase from freshly cut lettuce (*L. sativa*). *Food Technology and Biotechnology*, 49(2), 249-256.
- Bilal, M., Rasheed, T., Zhao, Y., Iqbal, H. M., y Cui, J. (2018). “Smart” chemistry and its application in peroxidase immobilization using different support materials. *International journal of biological macromolecules*, 119, 278-290.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Cabrera, M., Assis, C. R., Neri, D. F., Pereira, C. F., Soria, F., y Carvalho Jr, L. B. (2017). High sucrolytic activity by invertase immobilized onto magnetic diatomaceous earth nanoparticles. *Biotechnology reports*, 14, 38-46.
- Caracciolo, P. C., Rial-Hermida, M. I., Montini-Ballarín, F., Abraham, G. A., Concheiro, A., y Alvarez-Lorenzo, C. (2017). Surface-modified bioresorbable electrospun scaffolds for improving hemocompatibility of vascular grafts. *Materials Science and Engineering: C*, 75, 1115-1127.
- Gassara-Chatti, F., Brar, S. K., Ajila, C. M., Verma, M., Tyagi, R. D., y Valéro, J. R. (2013). Encapsulation of ligninolytic enzymes and its application in clarification of juice. *Food chemistry*, 137(1-4), 18-24.
- Gomez, J., Bodalo, A., Gomez, E., Bastida, J., Hidalgo, A., y Gomez, M. (2006). Immobilization of peroxidases on glass beads: an improved alternative for phenol removal. *Enzyme and microbial technology*, 39(5), 1016-1022.

- Hu, Y., Wu, J., Luo, P., y Mo, Y. (2012). Purification and partial characterization of peroxidase from lettuce stems. *African Journal of Biotechnology*, 11(11), 2752-2756.
- Klement, P., Du, Y., Berry, L., Andrew, M., y Chan, A. (2002). Blood-compatible biomaterials by surface coating with a novel antithrombin–heparin covalent complex. *Biomaterials*, 23(2), 527-535.
- López, C. (2005). Oxidación del tinte azo Orange II mediante MnP en reactores enzimáticos operados en continuo. Tesis Doctoral: Universidad de Santiago de Compostela
- Mammarella, E. J. (2001). *Estudio del Sistema de Inmovilización de Enzimas para la Hidrólisis de Lactosa*. Tesis Doctoral: Universidad Nacional del Litoral
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., y Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and microbial technology*, 40(6), 1451-1463.
- Niu, J., Xu, J., Dai, Y., Xu, J., Guo, H., Sun, K., y Liu, R. (2013). Immobilization of horseradish peroxidase by electrospun fibrous membranes for adsorption and degradation of pentachlorophenol in water. *Journal of hazardous materials*, 246, 119-125.
- Panatdasirisuk, W., Vongsetskul, T., Sucharitakul, J., Chaiyen, P., y Tangboriboonrat, P. (2015). Functionalized electrospun regenerated cellulose fibers for immobilizing pyranose 2-oxidase. *Reactive and Functional Polymers*, 86, 47-51.
- Peralta-Zamora, P., Esposito, E., Pelegrini, R., Groto, R., Reyes, J., y Durán, N. (1998). Effluent treatment of pulp and paper, and textile industries using immobilised horseradish peroxidase. *Environmental technology*, 19(1), 55-63.

- Rodríguez-de Luna, S. E., Moreno-Cortez, I. E., Garza-Navarro, M., Lucio-Porto, R., López Pavón, L., y González-González, V. A. (2017). Thermal stability of the immobilization process of horseradish peroxidase in electrospun polymeric nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 134(19).
- Tang, C., Saquing, C. D., Sarin, P. K., Kelly, R. M., y Khan, S. A. (2014). Nanofibrous membranes for single-step immobilization of hyperthermophilic enzymes. *Journal of membrane science*, 472, 251-260.
- Sheldon, R. A., y van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6223-6235.
- Wang, S., Fang, H., Yi, X., Xu, Z., Xie, X., Tang, Q., . . . Xu, X. (2016). Oxidative removal of phenol by HRP-immobilized beads and its environmental toxicology assessment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 130, 234-239.
- Xu, R., Chi, C., Li, F., y Zhang, B. (2013). Immobilization of horseradish peroxidase on electrospun microfibrillar membranes for biodegradation and adsorption of bisphenol A. *Bioresource technology*, 149, 111-116.
- Xu, R., Si, Y., Li, F., y Zhang, B. (2015). Enzymatic removal of paracetamol from aqueous phase: horseradish peroxidase immobilized on nanofibrous membranes. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(5), 3838-3846.
- Zhang, T., Xu, X.-L., Jin, Y.-N., Wu, J., y Xu, Z.-K. (2014). Immobilization of horseradish peroxidase (HRP) on polyimide nanofibers blending with carbon nanotubes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 106, 56-62.

Capítulo 6

Inmovilización de la enzima peroxidasa
sobre diatomitas naturales

6.1. INTRODUCCIÓN

Diversos autores han estudiado la inmovilización de peroxidasas sobre diferentes materiales tanto orgánicos (Niu y col., 2013; Xu y col., 2013; Zhang y col., 2014) como inorgánicos (Takahashi y col., 2000; Wei y col., 2002; Gomez y col., 2006; Chouyyok y col., 2009; Jain y col., 2016). Entre los materiales inorgánicos se destacan las diatomitas, el cual es un material económico debido a que hay abundantes yacimientos en Argentina (Takai, 2003). En general, las diatomitas poseen una estructura porosa con elevada área superficial, características deseables en soportes para la inmovilización de enzimas (Okita, 2007; Caliskan y col., 2011; Inchaurredo y col., 2017; Cacciotti y col., 2019).

Las diatomitas son acumulaciones sedimentarias de esqueletos silíceos (frústulas) o plantas acuáticas microscópicas conocidas como diatomeas (Liu y col., 2012; Inchaurredo y col., 2016; De Tommasi y col., 2017). El material está compuesto principalmente por sílice opal, pero también contiene alúmina, hierro, óxidos de metales alcalinos, y pequeñas cantidades de impurezas tales como P_2O_5 y TiO_2 (Inchaurredo y col., 2016; Cabrera y col., 2017; Zheng y col., 2018; Cacciotti y col., 2019). Aunque las diatomitas han sido utilizadas como soportes de catalizadores para diversas reacciones de química orgánica y como adsorbentes (Caliskan y col., 2011; Inchaurredo y col., 2016; Inchaurredo y col., 2017; Deng y col., 2019), su empleo como soporte de enzimas ha sido poco estudiado (Cabrera y col., 2017; Cabrera y col., 2018). En particular, de acuerdo a la revisión bibliográfica realizada, no se encontraron estudios de inmovilización de peroxidasas sobre diatomitas.

En el presente Capítulo se estudió la inmovilización de la enzima HRP sobre diatomitas funcionalizadas con 3-(aminopropil)trimetoxisilano (APTES) y activadas con glutaraldehído (G). Este procedimiento tiene como objetivo incrementar el contenido de proteína inmovilizada sobre el soporte y reducir la lixiviación de la enzima (Shaw y col., 2006; Cabrera y col., 2017; Bilal y col., 2018). La técnica de inmovilización por silanización

del soporte empleando APTES y G fue seleccionada debido a que es muy versátil y se emplean reactivos de bajo costo y fácilmente disponibles (Zucca y Sanjust, 2014).

6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1. Sustancias químicas y reactivos

Las diatomitas empleadas fueron adquiridas en un comercio local. Las mismas fueron extraídas de un depósito del mineral situado en Ing. Jacobacci, Río Negro. La peroxidasa de rábano picante (HRP) Tipo I, el orange II (OII), (3-aminopropil)triétoxisilano (APTES) y glutaraldehído (G) eran de Sigma-Aldrich. Todos los demás reactivos utilizados en este trabajo fueron de Anedra (San Fernando, Argentina). Para más detalles, revisar lista de sustancias y reactivos del Capítulo 2.

6.2.2. Procedimiento de inmovilización

En la Figura 6.1 se esquematiza el procedimiento de síntesis de los biocatalizadores inmovilizados. Debe destacarse que el mecanismo de la reacción de silanización es complejo y aún es objeto de discusión (Brüning y Grobe, 1995; Pasternack y col., 2008; J. Huang y col., 2009; Vashist y col., 2014). La Figura 6.2 muestra el mecanismo propuesto por Vashist y col. (2014) para la unión del APTES a los grupos silanol superficiales. Por su parte, el G es un compuesto muy utilizado como agente bifuncional para los soportes funcionalizados mediante los grupos amino ($-NH_2$) incorporados al soporte a los amino de la enzima. De acuerdo a la literatura, aún no es claro el mecanismo de unión G-soporte y G-proteína (X.-J. Huang y col., 2008; Zucca y Sanjust, 2014) (Fig. 6.3).

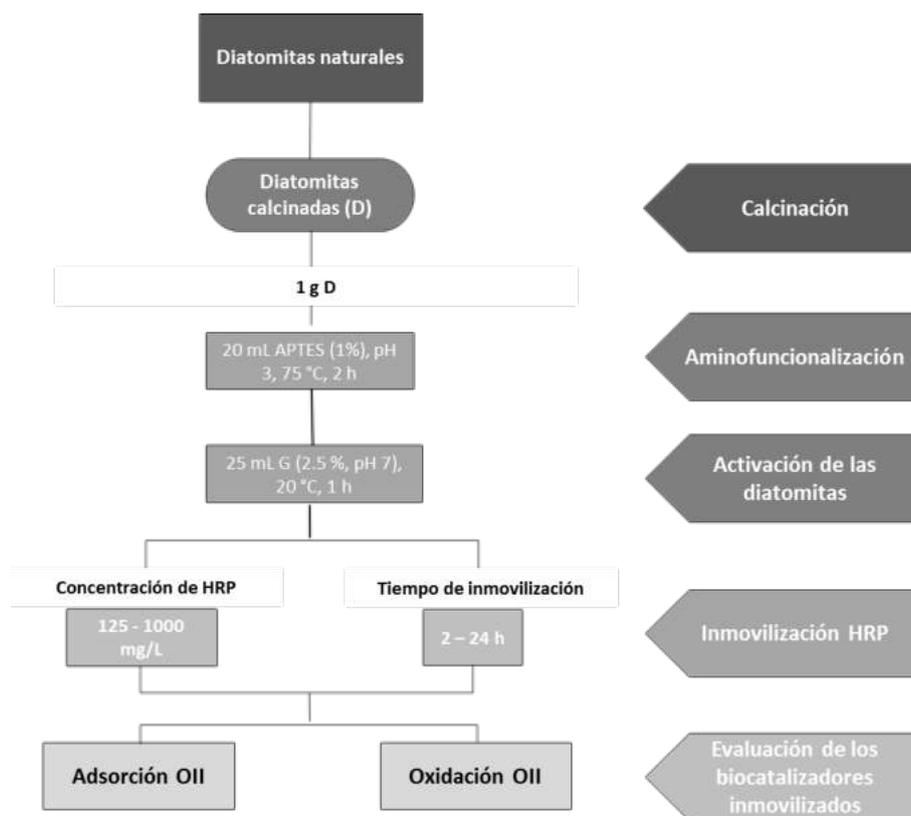


Figura 6.1. Procedimiento de inmovilización covalente de HRP sobre diatomitas.

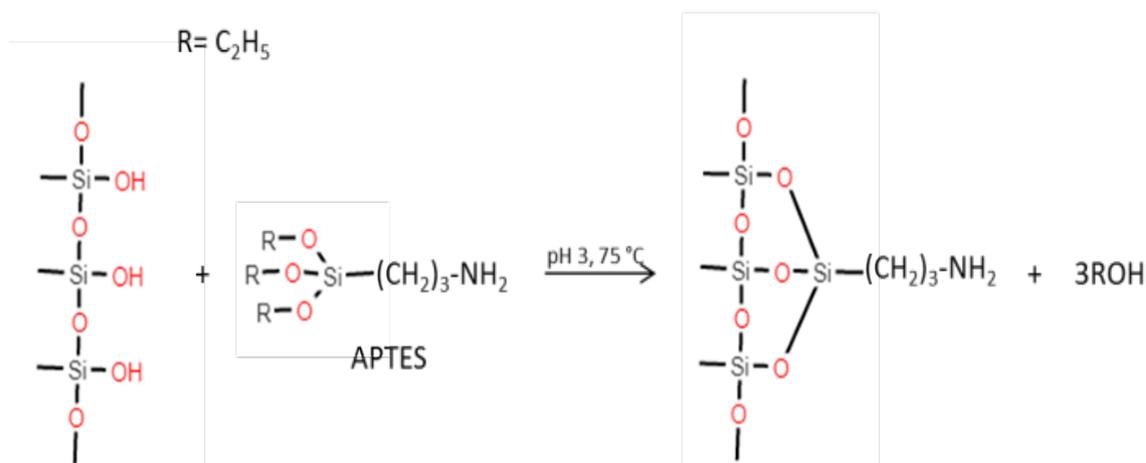


Figura 6.2. Mecanismo de silanización con APTES de materiales a base de sílice. Adaptado de Vashist y col. (2014).

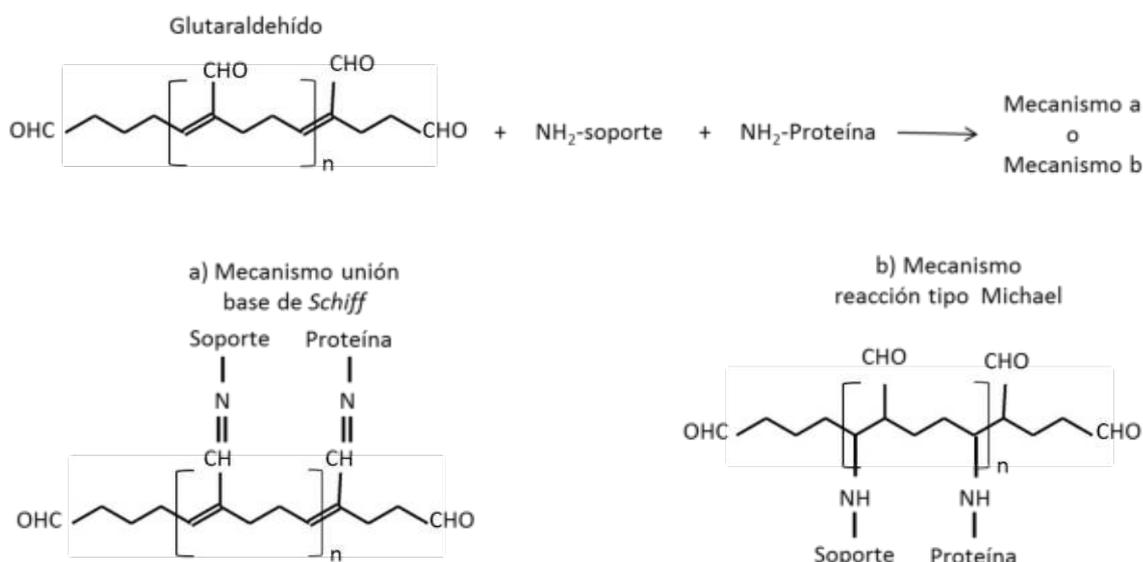


Figura 6.3. Mecanismos de activación e inmovilización de enzimas sobre materiales activados con glutaraldehído. Adaptado de Zucca y Sanjust (2014).

Las diatomitas naturales fueron molidas y tamizadas a partículas de 0.65 mm de tamaño medio. Luego fueron calcinadas a 550 °C durante 4 h para eliminar restos de materia orgánica y para mejorar su resistencia mecánica. Aunque la calcinación incrementa la resistencia mecánica de la superficie de las diatomitas mediante la formación de grupos siloxano (-Si-O-Si-), este procedimiento reduce el número de grupos silanol (-SiOH) de la superficie, necesarios para la unión del APTES (Fig.6.2), y por lo tanto, los potenciales sitios de unión de la enzima (Chaisena y Rangsiwatananon, 2004). Para incrementar los grupos silanol (-SiOH) y de este modo incrementar el número de sitios posibles de unión de la enzima, se realizó una hidrólisis ácida de las diatomitas calcinadas. Para ello, 1 g de diatomita calcinada (D) fue sumergido en 25 mL HNO₃ (5% v/v) a 85 °C durante 1 h. Finalmente, las diatomitas calcinadas e hidrolizadas (DH) fueron lavadas tres veces con agua destilada y se secadas a 105 °C durante una noche.

El estudio de inmovilización de la HRP se llevó a cabo en tres etapas, siguiendo el procedimiento descrito por Gómez y col. (2008). En principio, se injertaron grupos amino (-NH₂) a la superficie de la diatomita mediante su silanización con APTES (Fig. 6.2). El ensayo consistió en sumergir 1 g de diatomitas calcinadas (D) o calcinadas-hidrolizadas (DH) en 20 mL de APTES (1% v/v en agua destilada). El pH de la mezcla se ajustó a 3-4 con gotas de HCl 6N. Luego, se agitó lentamente durante 2 h a 75 °C. Las diatomitas silanizadas (DS, DHS) fueron lavadas con agua destilada y secadas durante la noche a 105 °C.

La función -NH₂ introducida sobre la superficie de la diatomita fue activada con glutaraldehído (Fig. 6.3). Para esto, 1 g de diatomitas silanizadas se mezcló con 25 mL de una solución de glutaraldehído (2.5% v/v) preparada en buffer fosfato (100 mM, pH 7) y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, las diatomitas activadas (DSG, DHSG) fueron lavadas con el mismo buffer para eliminar el exceso de glutaraldehído. Posteriormente, la HRP se inmovilizó haciendo reaccionar los grupos amino (-NH₂) de la enzima con los grupos aldehídos de la superficie de las diatomitas activadas (Fig. 6.3) poniéndolas en contacto con 25 mL de soluciones de HRP (125 – 1000 mg/L) preparadas en buffer fosfato (100 mM, pH 7) durante distintos tiempos a temperatura ambiente. Luego, las diatomitas con la enzima inmovilizada (DSGE, DHSGE) fueron lavadas para eliminar los restos de enzima lábil (no unida covalentemente). En paralelo, se llevaron a cabo estudios adicionales de inmovilización de la enzima por adsorción física sobre las diatomitas calcinadas (DE). Para ello, 1 g de diatomita calcinada (D) fue sumergido en 25 mL de una solución de HRP (1000 mg/L) bajo las condiciones descriptas previamente. En todos los casos, los biocatalizadores obtenidos (DSGE, DHSGE, DE) fueron secados a vacío durante toda la noche y almacenados a 4 °C.

6.2.3. Determinación de proteína inmovilizada

La carga específica de enzima inmovilizada sobre las diatomitas (Q, mgHRP/gD) fue calculada a partir de la diferencia de concentración de proteína en la mezcla de inmovilización antes y después del agregado de las diatomitas activadas con glutaraldehído. La concentración de proteína en la mezcla de inmovilización se midió empleando el método de Bradford (Bradford, 1976). En el Capítulo 2 se describe a detalle el procedimiento para determinación de proteína (Sección 2.2.3) y los cálculos realizados (Sección 2.2.4).

6.2.4. Caracterización de las diatomitas y de los biocatalizadores

El material soporte (D), así como los biocatalizadores (DSGE, DHSGE, DE) fueron caracterizados mediante las técnicas tradicionales de caracterización de materiales: DRX, FRX, FTIR, SEM/EDX, TGA y área superficial BET. En el Capítulo 2 (Sección 2.3) se describen en detalle las técnicas empleadas.

6.2.5. Evaluación de los biocatalizadores

6.2.5.1. Ensayos de actividad catalítica. La actividad catalítica de los biocatalizadores se evaluó empleando la reacción de decoloración de orange II (OII) con peróxido de hidrógeno (P). Diferentes cantidades (40 – 140 mg) de biocatalizador (DE, DSGE, DHSGE) fueron sumergidas en tubos de ensayo que contenían 4 mL de buffer fosfato (BF) 100 mM (pH 9). Luego eran adicionados 0.2 mL de OII (1 mM) y la reacción se iniciaba con el agregado de 0.2 mL de H₂O₂ (2 mM). Cabe destacar que, al igual que en el Capítulo 5, las condiciones iniciales fueron seleccionadas de tal forma que el peróxido siempre estuviera en exceso respecto a OII. De acuerdo a las concentraciones iniciales de P y OII, la relación P₀/S₀ fue en todos los casos igual a 2 mol/mol. Una vez finalizado cada ensayo de oxidación de OII con P, los biocatalizadores (DE, DSGE, DHSGE) eran lavados tres veces con la solución de

buffer fosfato (pH 9) con el objeto de eliminar restos de reactivos y se almacenaban a temperatura ambiente. Al siguiente día, eran utilizados en ensayos de remoción de OII con P (pH 9). Este procedimiento se repitió durante una semana. Cada vez que finalizaba la reacción, se retiraba el biocatalizador y se determinaba la actividad peroxidasa en solución (AP, mM/h) para evaluar la lixiviación de la enzima hacia la fase homogénea. Finalizado cada ensayo de la oxidación de OII en presencia de DE, DSGE, DHSGE, se tomaba 1 mL del sobrenadante de cada reacción. Luego, este sobrenadante se hacía reaccionar con 0.05 mL de OII (1 mM) y 0.05 mL de P (2 mM). Todas las soluciones fueron preparadas en BF 100 mM a pH 9. La actividad peroxidasa (AP, mM/h) se obtuvo a partir de la pendiente de la curva de absorbancia (A, a.u.) en función del tiempo (t, h) medida en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800. Como experimentos control de oxidación se realizaron ensayos de decoloración de OII con P en presencia de la diatomita calcinada (D) bajo las condiciones mencionadas anteriormente.

6.2.5.2. Estudios de adsorción. Se evaluó la capacidad de adsorción de OII sobre la diatomita calcinada (D) y sobre los biocatalizadores estudiados (DE, DSGE, DHSGE). Los ensayos de adsorción se llevaron a cabo en buffer fosfato 100 mM, pH 9. Se pusieron en contacto soluciones de OII (0.045 mM) con 40 mg del material en estudio y se agitó de forma continua durante 6 h. Todos los ensayos fueron realizados a temperatura ambiente (20 ± 2 °C).

6.2.5.3. Ensayos en reactor tipo columna de flujo ascendente. Se realizaron ensayos en un reactor tipo columna de flujo ascendente (Fig. 6.4) rellena con el biocatalizador DSGE. Como columna se empleó un tip de 10 mL al cual se le colocó una base de aproximadamente 20 mm de esferas de vidrio de 2 mm de diámetro y 5 g de DSGE. La parte superior se cerró con un tapón de silicona el cual era atravesado por un tubo para permitir la salida del líquido.

Los experimentos consistieron en recircular 200 mL de una solución de OII (0.1 mM, buffer fosfato 100 mM pH 9) hacia la columna empleando una bomba peristáltica con un caudal de 900 mL/h. A diferentes tiempos se obtuvieron los espectros UV/Visible de la mezcla de reacción. Se recirculó la solución hasta que se observó una concentración constante de OII, y se tomó una muestra para evaluar la actividad peroxidasa (AP) en fase homogénea. La oxidación de OII se inició alimentando el peróxido de hidrógeno (2.6 mM) con un caudal de 20 mL/h. Nuevamente, se obtuvieron los espectros UV/Visible de la mezcla de reacción en función del tiempo. Al finalizar la etapa de reacción, se tomó una muestra de líquido para evaluar la actividad peroxidasa (AP) de la solución debido a la lixiviación de la enzima. Finalmente, la columna fue lavada con 100 mL de buffer fosfato para ser reutilizada en otro experimento.

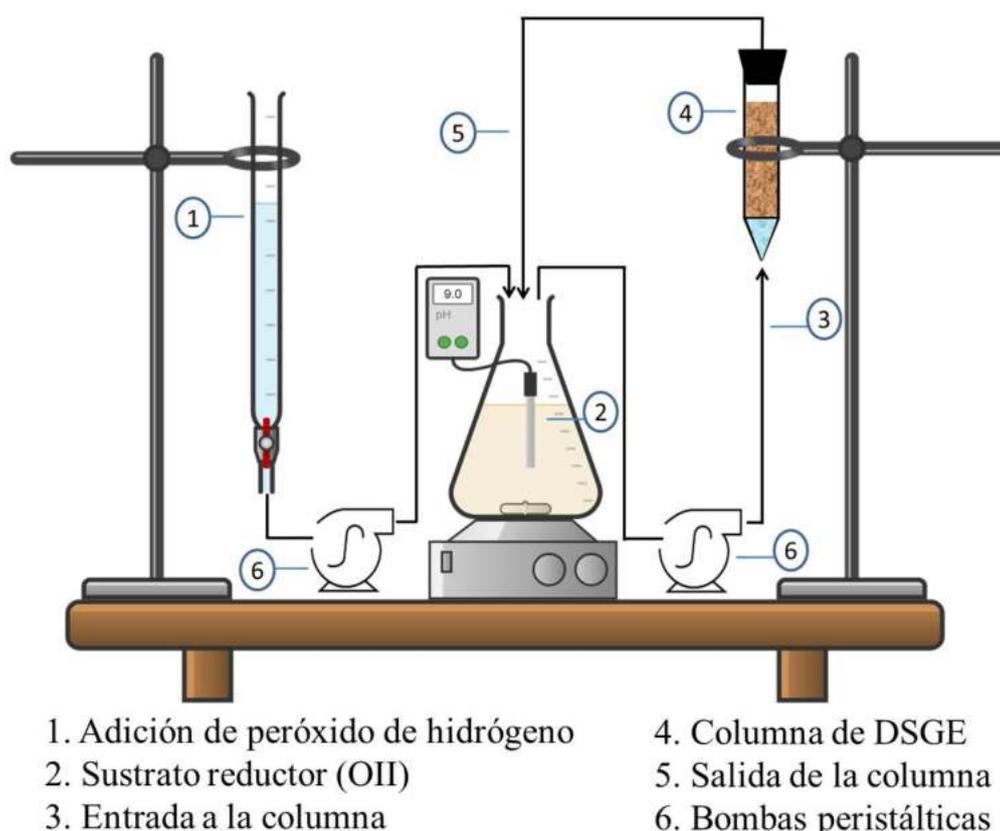


Figura 6.4. Esquema del reactor tipo columna de flujo ascendente empleado en los estudios de oxidación de Orange II con peróxido de hidrógeno catalizada por DSGE.

6.2.5.4. Estabilidad de los biocatalizadores. Se estudió la estabilidad de los biocatalizadores durante el almacenamiento seco a 4 °C. Para ello se evaluó la actividad de los biocatalizadores recién preparados y luego de un mes de almacenamiento empleando el ensayo típico de decoloración de OII (0.045 mM) en presencia de P (0.09 mM) en BF a pH9. Se evaluó también la estabilidad del biocatalizador DSGE en medio húmedo. En este caso, DSGE fue almacenado a 4 °C durante un mes en un medio húmedo (40 mg DSGE en 5 mL de BF 100mM, pH 9). Pasado este tiempo se evaluó la actividad del DSGE utilizando el ensayo de decoloración de OII (0.045 mM) con P (0.09 mM).

6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.3.1. Inmovilización de la enzima sobre diatomitas calcinadas

Las diatomitas acondicionadas por calcinación (D) (Fig. 6.5) fueron utilizadas como soporte para la inmovilización de la enzima HRP siguiendo la técnica descrita por Gómez y col. (2008). De acuerdo a esos autores, con el objeto de maximizar la carga específica de enzima inmovilizada (Q, mgHRP/gD) se deben estudiar las siguientes variables:

- Tiempo de inmovilización
- Concentración de enzima en la mezcla de inmovilización
- Hidrólisis ácida superficial del soporte

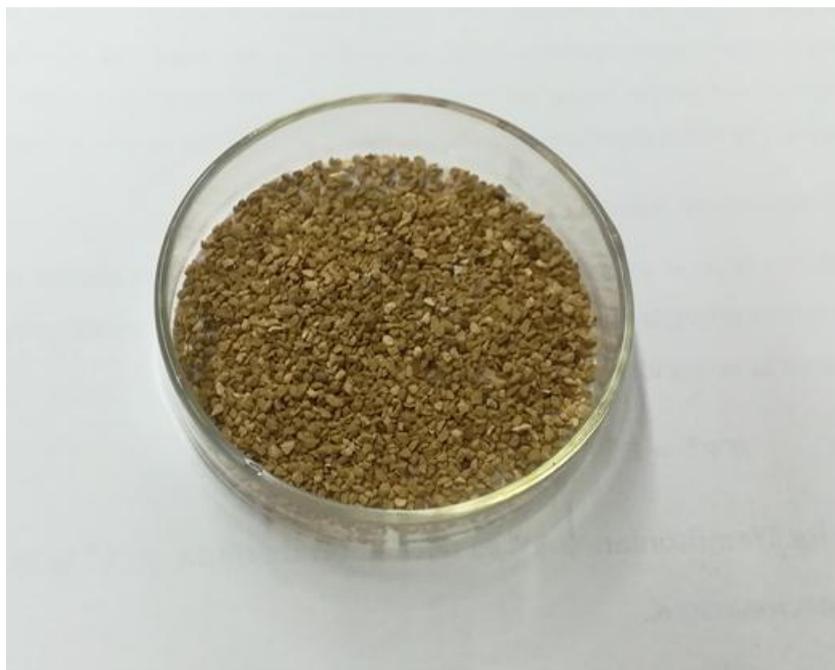


Figura 6.5. Diatomitas calcinadas (D), soporte para la inmovilización de la enzima HRP.

6.3.1.1. Tiempo de inmovilización. La Figura 6.6 muestra el cambio de la carga específica de enzima inmovilizada (Q , mgHRP/gD) en función del tiempo de inmovilización. Se observa que bajo las condiciones ensayadas los valores de Q alcanzaron un máximo de aproximadamente 8.4 mgHRP/gD entre las 15 y 24 h de contacto a temperatura ambiente. De acuerdo a este resultado, por comodidad operativa todos los ensayos siguientes se realizaron empleando un tiempo de inmovilización de 24 h.

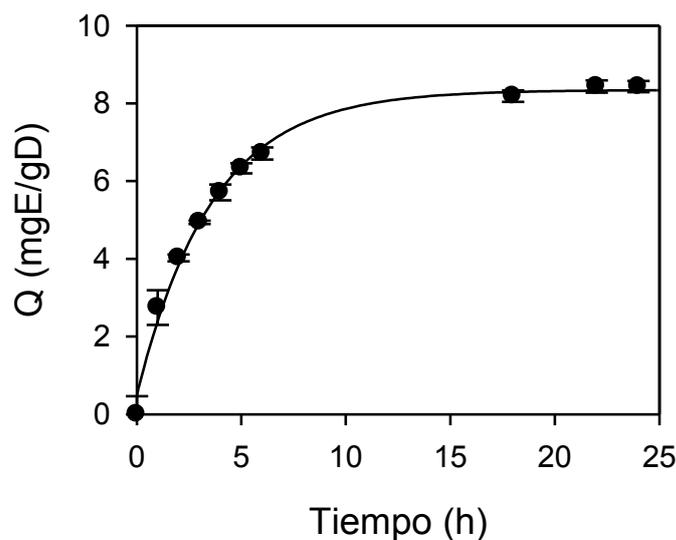


Figura 6.6. Carga enzimática específica (Q) en función del tiempo de inmovilización.

Condiciones: 1g DSG, 20 °C, pH 7. Concentración de enzima en la mezcla de inmovilización: 1000 mg/L. Los valores de Q se expresan con su correspondiente desviación estándar.

6.3.1.2. Concentración de enzima en la mezcla de inmovilización. De acuerdo a la literatura (Gomez y col., 2006; Bilal y col., 2018), así como lo comentado en el Capítulo 5, el aumento de concentración de HRP en la mezcla de inmovilización produce un incremento de Q y en consecuencia, una mayor actividad catalítica del material. Por tal motivo, se estudió la inmovilización de la enzima durante 24 h empleando diferentes concentraciones de enzima en la mezcla de inmovilización. La Figura 6.7 muestra que Q aumentó de forma aproximadamente lineal en función de la concentración de HRP en la inmovilización, alcanzando un máximo de 8.9 ± 0.4 mgHRP/gD.

A partir de los resultados obtenidos se decidió que los siguientes experimentos de inmovilización de HRP sobre diatomitas se llevarían a cabo por 24 h empleando 1000 mg/L de HRP en la mezcla de inmovilización. Cabe mencionar que para no incrementar demasiado

los costos asociados al uso de enzima, la concentración de HRP en la mezcla de inmovilización nunca fue superior a 1000 mg/L.

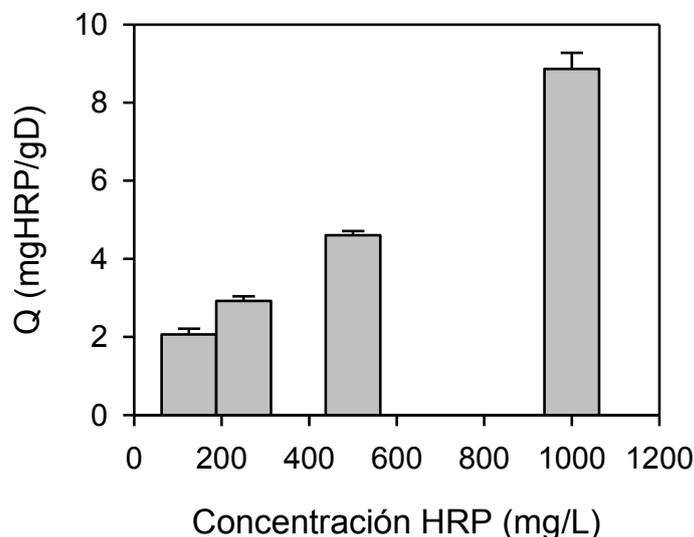


Figura 6.7. Efecto de la concentración de enzima en la mezcla de inmovilización sobre los valores de Q. Condiciones de inmovilización: 1g DSG, 20 °C, pH 7 por 24 h. Los valores de Q se expresan con su correspondiente desviación estándar.

6.3.1.3. Efecto de la hidrólisis superficial del soporte sobre la carga enzimática. Los grupos silanol (-SiOH) sobre la superficie de materiales a base de sílice son indispensables para la inmovilización de enzimas mediante unión covalente empleando APTES (Caliskan y col., 2011; Zucca y Sanjust, 2014; Zdarta y col., 2018). Aunque el proceso de calcinación de las diatomitas incrementa su resistencia mecánica, también favorece la formación de grupos siloxano (-Si-O-Si-) en la superficie de las diatomitas, reduciendo el número de sitios de unión del APTES. La literatura indica que este problema puede revertirse, al menos en parte, mediante un pretratamiento ácido el cual favorece la ruptura de los puentes siloxano, restableciendo los grupos -SiOH superficiales (X.-J. Huang y col., 2008; Inchaurredo y

col., 2016; Cabrera y col., 2017; Inchaurredo y col., 2017). Por lo tanto, durante la síntesis de los biocatalizadores se introdujo un paso de hidrólisis ácida de las diatomitas calcinadas (D) con el objetivo de incrementar los grupos silanol y de este modo incrementar Q.

En la Figura 6.8 se comparan los resultados obtenidos de carga enzimática de los biocatalizadores a base de diatomitas calcinadas con la enzima unida covalentemente (DSGE) y con el paso intermedio de hidrólisis (DHSGE). A efectos comparativos, también se muestra la carga enzimática correspondiente a los biocatalizadores obtenidos por adsorción de la HRP sobre diatomitas calcinadas (DE). Cuando la HRP se inmovilizó por unión covalente sobre las diatomitas calcinadas (DSGE), los valores de Q fueron prácticamente el doble con relación a la inmovilización por adsorción (DE). Esto era de esperarse, ya que mediante la funcionalización y activación de los soportes se puede incrementar el contenido de proteína inmovilizada (Shaw y col., 2006; Cabrera y col., 2017). Sin embargo, la carga de enzima inmovilizada sobre diatomitas pretratadas con ácido nítrico (DHSGE) fue menor a DSGE y prácticamente similar a la obtenida por adsorción (DE). Según varios autores, esto podría deberse a que los soportes muy reactivos provocan un injerto masivo del APTES, lo que conlleva la acumulación excesiva de grupos funcionales inestables, afectando la activación del material y posterior inmovilización de las enzimas. Otra posibilidad es que el ácido nítrico haya provocado un bloqueo de los sitios de unión, por nitración ácida de los grupos silanol (Zucca y Sanjust, 2014; Zdarta y col., 2018).

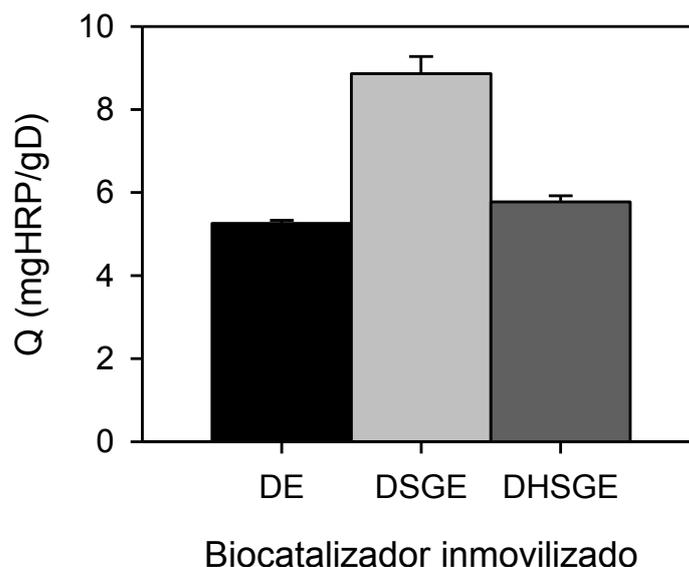


Figura 6.8. Carga enzimática (Q) correspondiente a los biocatalizadores obtenidos mediante diferentes técnicas de inmovilización: adsorción (DE), inmovilización covalente (DSGE), inmovilización covalente con pretratamiento ácido (DHSGE). Condiciones de inmovilización: concentración de enzima = 1000 mg/L, 20 °C, pH 7, 24 h. Los valores de Q se expresan con su correspondiente desviación estándar.

6.3.2. Caracterización de las diatomitas naturales y los biocatalizadores obtenidos

6.3.2.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM). Las Figuras 6.9 y 6.10 muestran ejemplos de micrografías SEM de la diatomita calcinada (D), funcionalizada (DSG), y con la enzima inmovilizada (DSGE) empleadas en el presente trabajo de Tesis. En general, se observaron frústulas simétricas con estructura porosa y formas que se asemejan a un disco o a un cilindro, de diámetros entre 8 y 16 μm . En un trabajo anterior (Inchaurrondo y col., 2016), las diatomitas fueron identificadas como *Aulacoseira alpigena* y *Fragilaria*.

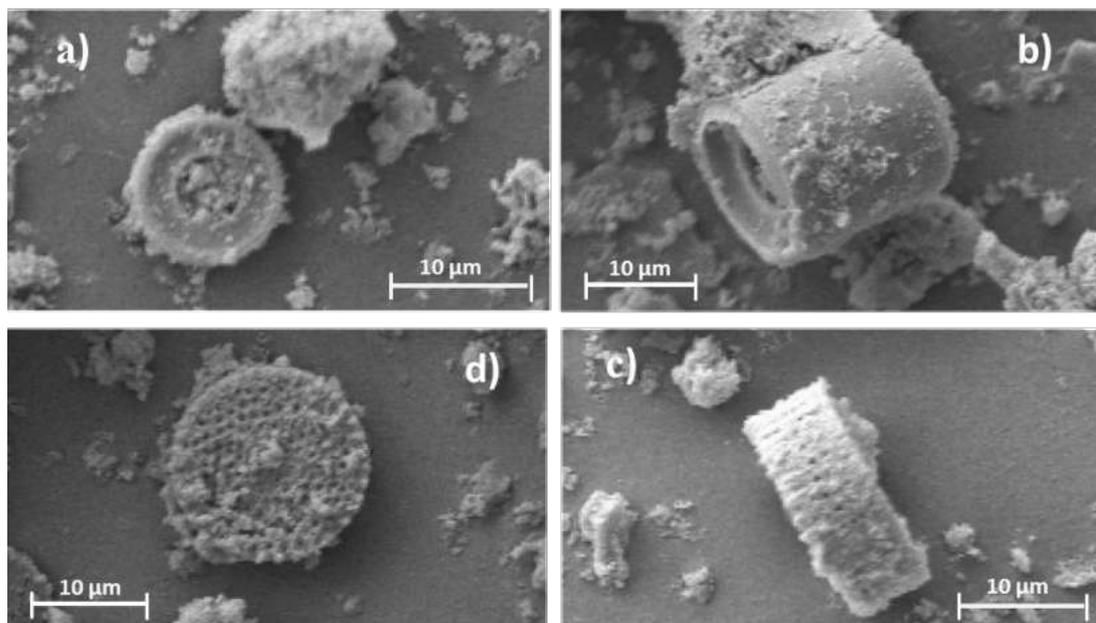


Figura 6.9. Micrografías SEM de las frústulas identificadas en las muestras de a) diatomitas calcinadas (D), b,c) funcionalizada (DSG), y d) con la enzima inmovilizada (DSGE).

Magnificación de las micrografías: 1500 X. Condiciones de inmovilización: Ver la Fig. 6.8.

La Figura 6.10 muestra que las frústulas parecen mantener su estructura luego de la modificación superficial y la inmovilización de la enzima. Además, se observan algunos aglomerados sobre la superficie de las frústulas, obstruyendo posiblemente los poros del material. Diferentes autores han reportado la presencia de aglomerados sobre los poros de diferentes materiales inorgánicos (montmorillonita, diatomita) a causa de la aminofuncionalización e inmovilización de distintas enzimas (Gopinath y Sugunan, 2007; Cabrera y col., 2017).

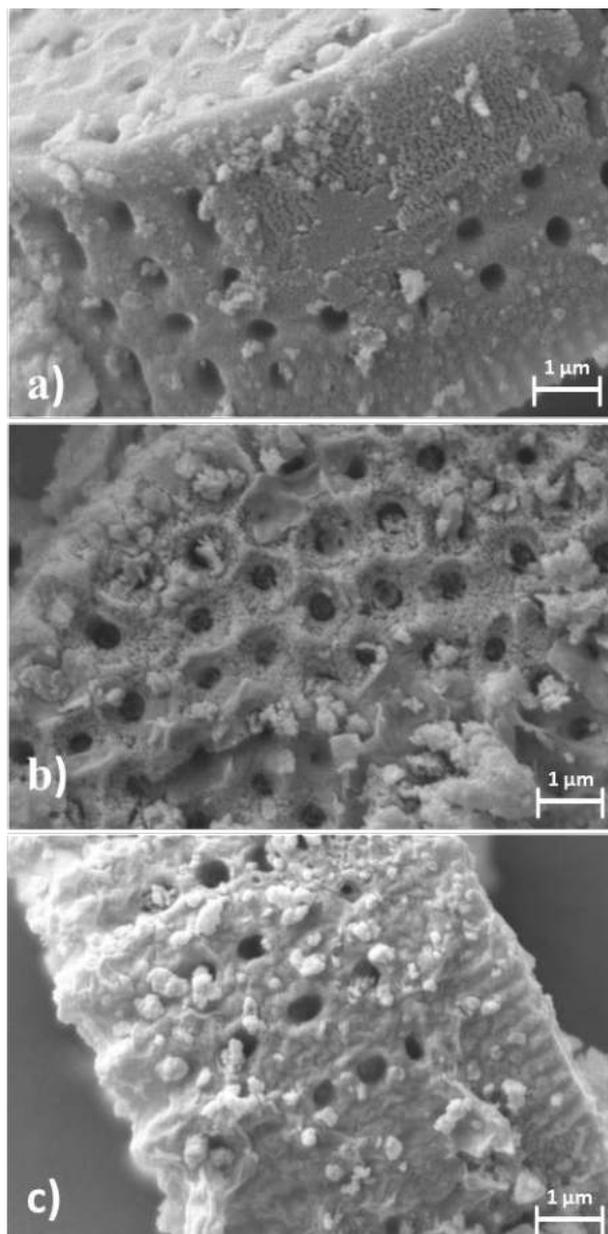


Figura 6.10. Micrografías SEM de: a) diatomitas calcinadas (D), b) activadas (DSG), y c) con la enzima inmovilizada (DSGE). Magnificación de las micrografías: 30000 X.

Condiciones de inmovilización: Ver la Fig. 6.8.

6.3.2.2. Área BET. La Figura 6.11 muestra las isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno gaseoso (N_2) para las muestras de diatomita con enzima inmovilizada (DE, DSGE,

DHSGE) y sin enzima (D, DSG). Como regla general, la Figura 6.11 muestra isothermas con un incremento pronunciado del volumen adsorbido de N₂ a una presión relativa (P/P₀) alrededor de 0.90, y una fase de histéresis evidente durante la etapa de desorción que se inicia cerca a P/P₀ = 0.45. De acuerdo a la clasificación IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada), estas isothermas corresponden al Tipo IVa, típicas de adsorbentes mesoporosos (Asouhidou y col., 2009; Thommes y col., 2015). La Figura 6.11 también muestra que el volumen adsorbido a P/P₀ = 0.98 y 0.45 disminuyó cuando la diatomita fue modificada con APTES y glutaraldehído (Fig. 6.11c), y también en los casos en que se inmovilizó la enzima (Fig. 6.11b,d,e). Estos resultados sugieren que se produjo una alteración de la distribución del tamaño de poro de la diatomita luego del procedimiento de inmovilización. Dicha distribución del tamaño de poro fue estudiada graficando la derivada (DVA) del volumen adsorbido de N₂ en función del ancho medio de poro (Fig. 6.12). En términos generales, los perfiles DVA (Fig. 6.12) mostraron un comportamiento similar en todas las muestras, con una distribución de poros centradas en 3.8 y 9.5 nm. Sin embargo, fue evidente una disminución en el volumen de los poros a medida que se iba incorporando fracción orgánica a las diatomitas (D).

La Tabla 6.1 muestra los valores del área superficial BET (A), el volumen (V), y ancho medio de poro (b) de las muestras de diatomita antes y después de la inmovilización de la peroxidasa. De acuerdo a la Tabla 6.1, los valores de A, V y b para la muestra D fueron 95.73 cm²/g, 0.37 cm³/g y 10.63 nm, respectivamente. Nótese que, en contraste con D, el valor de A (84.08 cm²/g) para DE (enzima adsorbida sobre D) resultó inferior, mientras que V (0.36 cm³/g) y b (10.87 nm) fueron prácticamente similares. Chouyyok y col. (2009) reportaron disminuciones de hasta un 40 % en el área de superficie BET en materiales mesoporosos de sílica (MCM-41, SBA-15 y MCF) luego de la adsorción de una HRP. Por su parte, en la Tabla 6.1 también se observa que cuando la diatomita fue funcionalizada con APTES y glutaraldehído (DSG), los valores de A (50.71 cm²/g) y V (0.29 cm³/g)

disminuyeron marcadamente. Mientras que b (12.61 nm) tuvo un leve aumento. Asouhidou y col. (2009), reportaron disminuciones alrededor del 50% en los valores de A y V luego de silanizar con APTES una sílica mesoporosa. Gopinath y Sugunan (2007) informaron descensos cercanos al 30% en A y V luego de funcionalizar con APTES y glutaraldehído una montmorillonita.

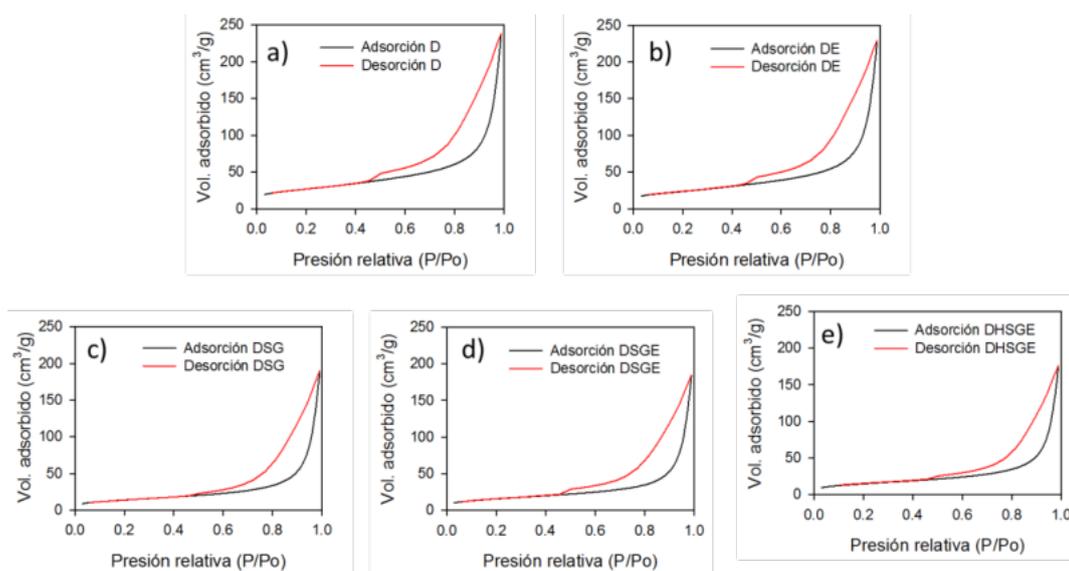


Figura 6.11. Isothermas de adsorción-desorción de N_2 para: a) D, b) DE, c) DSG, d) DSGE, e) DHSGE. Condiciones de inmovilización: Ver la Fig. 6.8.

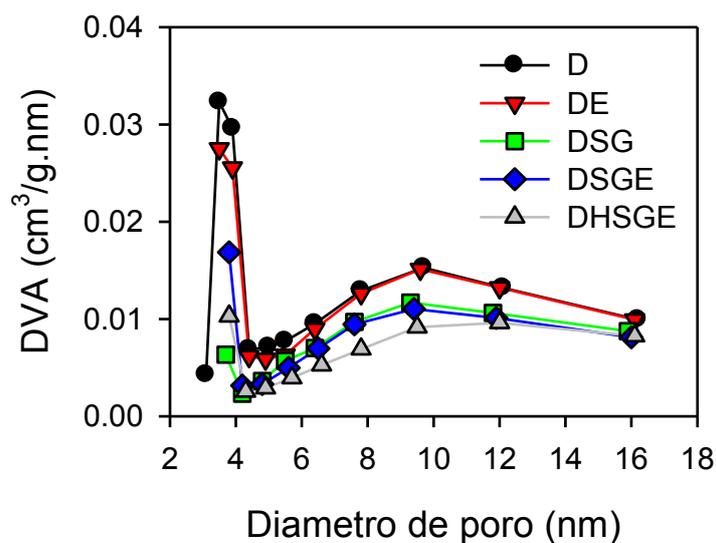


Figura 6.12. Distribución de diámetro de poro para D (círculos negros), DE (triángulos rojos), DSG (cuadrados verdes), DSGE (rombos azules), y DHSGE (triángulos grises).

Condiciones de inmovilización: Ver la Fig. 6.8.

Tabla 6.1. Área de superficie BET (A), volumen (V) y ancho (b) de poro para las muestras de diatomita calcinada (D) y activada (DSG), y con la HRP inmovilizada (DE, DSGE,

DHSGE). Condiciones de inmovilización: Ver la Fig. 6.8.

| Muestra | A (m ² /g) | V (cm ³ /g) | b (nm) |
|---------|-----------------------|------------------------|--------|
| D | 95.73 | 0.37 | 10.63 |
| DE | 84.08 | 0.36 | 10.87 |
| DSG | 50.71 | 0.29 | 12.62 |
| DSGE | 57.03 | 0.29 | 11.54 |
| DHSGE | 53.79 | 0.27 | 12.79 |

6.3.2.3. Difracción de rayos X (DRX). La Figura 6.13 muestra los diagramas DRX de la diatomita calcinada antes (D) y después de la inmovilización de la HRP mediante las diferentes técnicas estudiadas (DE, DSGE, DHSGE). En términos generales, se observa una banda ancha alrededor de 25° , relacionada con la fase amorfa de la sílice (Zheng y col., 2018; Cacciotti y col., 2019; Deng y col., 2019). Además, los difractogramas demuestran la presencia de cuarzo (27°), albita (28° , 24° , 22°), calcita (29°) y nontronita ($5-6^\circ$). Por su parte, no se observaron grandes cambios en la estructura de la diatomita luego de la inmovilización de la enzima. Se observa solamente un pico cercano a 9° , el cual aumenta levemente en intensidad para DSGE y DHSGE respecto de D o DE. De acuerdo con An y col. (2015), la inmovilización de enzimas en el espacio entre capas de minerales arcillosos produce la aparición de un pico a 8.9° , el cual aumenta en intensidad con el incremento de enzima inmovilizada. Gopinath y Sugunan (2007), reportaron cambios en la distancia interplanar cuando inmovilizaron una α -invertasa, tanto por adsorción como por unión covalente, sobre una montmorillonita funcionalizada con APTES y glutaraldehído. Resultados similares fueron reportados por Mansilla y col. (2018), quienes inmovilizaron por adsorción y unión covalente una superóxido dismutasa sobre bentonita.

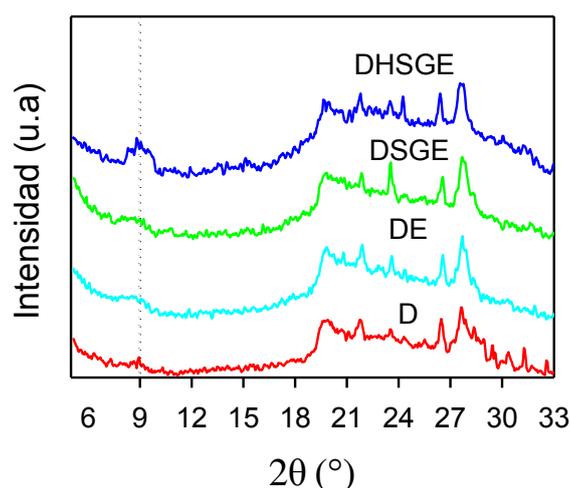


Figura 6.13. Difractogramas DRX correspondientes a D (rojo), DE (celeste), DSGE (verde) y DHSGE (azul). Condiciones de inmovilización: Ver la Fig. 6.8.

6.3.2.4. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier de reflectancia difusa (DRIFT). Se empleó la técnica DRIFT para identificar los grupos funcionales contenidos en la superficie de la diatomita antes y después de la inmovilización de la enzima. La Figura 6.14 muestra el efecto de las diferentes modificaciones superficiales realizadas sobre la diatomita en el espectro IR. Cuando la diatomita calcinada (D) se silanizó con APTES (DS), se observó la aparición de un pico alrededor de 1520 cm^{-1} , el cual está relacionado a los modos de deformación del grupo -NH_2 (Hu y col., 2013; Majoul y col., 2015; Nayak y col., 2019). Según Majoul y col. (2015), el espectro FTIR del APTES muestra dos picos característicos alrededor de 1600 y 2960 cm^{-1} , relacionados con la vibración del grupo terminal -NH_2 (1600 cm^{-1}) y las vibraciones de estiramiento asimétricas y simétricas de la cadena hidrocarbonada (2960 cm^{-1}). Nótese que en las muestras DS y DG (o sea, D en contacto con glutaraldehído), el pico correspondiente a la cadena carbonada (2960 cm^{-1}) no se percibió con claridad. No obstante, este pico fue muy notorio cuando D fue silanizada con APTES y activada con glutaraldehído (DSG) debido al aumento de la fracción orgánica sobre la diatomita. Además, en DSG no se observó el pico correspondiente al terminal -NH_2 del APTES (1520 cm^{-1}). Esto podría ser un indicador de la eficiente aminofuncionalización y posterior activación de la diatomita calcinada.

Por otra parte, la Figura 6.14 también muestra que en comparación con D, las bandas de absorción a 1630 y 3600 cm^{-1} , correspondientes a la vibración del O-H (Ye y col., 2015; Deng y col., 2019), aumentaron en intensidad en DSG. Esto podría deberse a la absorción de agua a causa de la modificación superficial de la diatomita. En este sentido, según Zucca y Sanjust (2014), el APTES es un organosilano que hace que los soportes funcionalizados sean más hidrófilos.

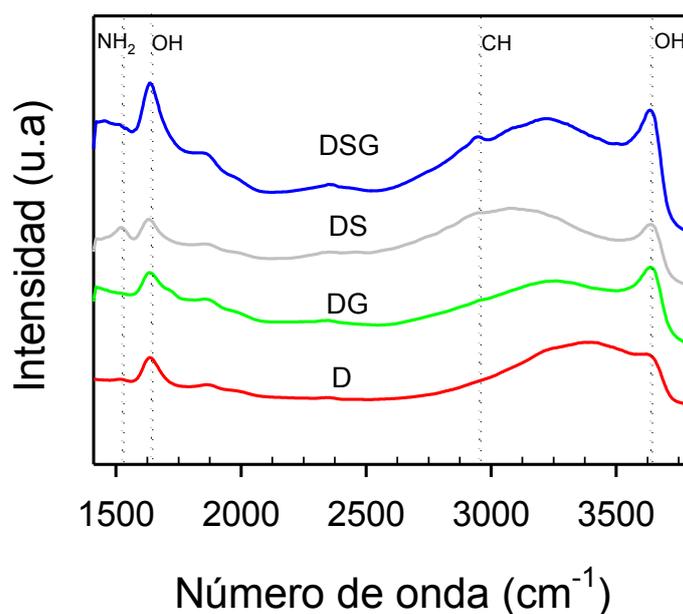


Figura 6.14. Espectros de absorbancia IR (DRIFT) de la diatomita calcinada (D), tratada con glutaraldehído (DG), silanizada con APTES (DS) y activada con glutaraldehído (DSG).

La Figura 6.15 muestra los perfiles de absorción IR de la peroxidasa inmovilizada. En principio, para la muestra de HRP son evidentes dos picos alrededor de 1500 y 2960 cm^{-1} , los cuales se relacionan con el grupo amino ($-\text{NH}_2$) y la cadena carbonada de la enzima, respectivamente. Nótese de la Figura 6.15 que a diferencia de D, el pico relacionado con el grupo $-\text{NH}_2$ de la enzima (1500 cm^{-1}) fue notorio cuando la HRP fue inmovilizada sobre las diatomitas (DE, DSGE, DHSGE).

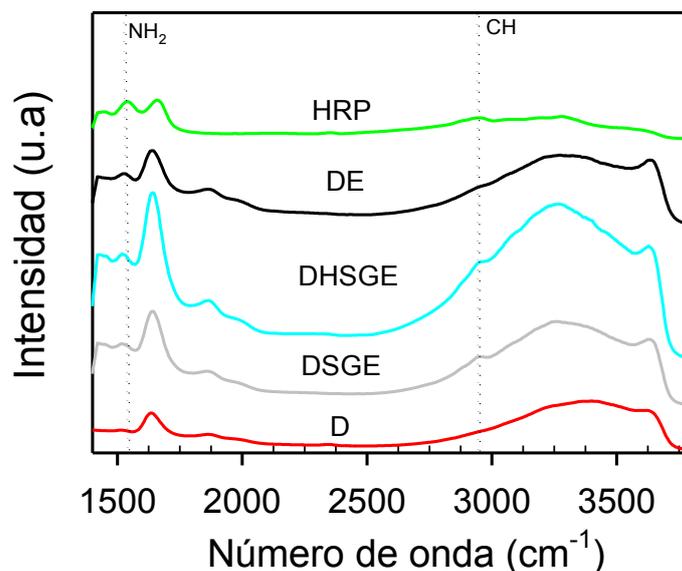


Figura 6.15. Espectros de absorción IR (DRIFT) de la HRP (verde), la diatomita calcinada (D, rojo) y la diatomita con la HRP inmovilizada por diferentes métodos: DE (negro), DSGE (gris) y DHSGE (celeste). Condiciones de inmovilización: Ver la Fig. 6.8.

6.3.2.5. Fluorescencia de rayos X (FRX). El análisis elemental por FRX (Tabla 6.2) mostró que la diatomita contenía principalmente hierro (Fe) y silicio (Si), y otros elementos típicos de las diatomitas, como calcio (Ca) y aluminio (Al). Estos resultados son similares a los reportados por Antonides (1998), quien informa que las diatomitas calcinadas contienen un 80 - 90% de SiO₂, 2 - 4% de alúmina (debido a la presencia de arcillas) y 0.5 - 2% de hematita.

Con relación al potasio (K), en la Tabla 6.2 se observa que este elemento se incrementa significativamente en los biocatalizadores (DE, DSGE, DHSGE) respecto de la diatomita calcinada (D). Esto se debe a que durante la síntesis de los biocatalizadores, la diatomita activada con glutaraldehído se pone en contacto con una solución de enzima, la

cual esta disuelta en un buffer fosfato de potasio. Durante este paso, parte del K del buffer se introduce en la estructura del soporte, incrementando así su presencia respecto de D.

Por otra parte, los resultados de la Tabla 6.2 muestran que entre los elementos que se pueden detectar con esta técnica, la HRP contenía principalmente azufre (S) y calcio (Ca), así como hierro (Fe), plata (Ag) y cloro (Cl). Mientras que Cl y Ag podrían provenir de residuos de reactivos empleados en las diferentes etapas de purificación de la enzima, S, Fe y Ca son elementos que están siempre presentes en las peroxidases. Por un lado, el S forma parte de ciertos aminoácidos de la cadena polipeptídica de las HRP, mientras que el Fe está presente en el sitio catalítico. Por su parte, el Ca tiene una función estructural, muy importante en la estabilidad de la actividad catalítica de la enzima (Laberge y col., 2003).

Las peroxidases se caracterizan por tener dos centros de protoporfirina IX, los cuales contienen Fe(III) (Hiner y col., 1996; Veitch, 2004; Malvi y col., 2012). De esta forma, cada molécula de enzima contiene dos átomos de Fe. Por otra parte, a partir de la secuencia de aminoácidos de las diferentes peroxidases disponibles en la base de datos BRENDA, cada molécula de enzima posee entre 17 y 18 átomos de S (Bartonek-Roxa y col., 1991; Naatsaari y col., 2014). De acuerdo a esta información, la relación S/Fe para las peroxidases debería estar comprendida entre 8.5 y 9 moles de S por mol de Fe. A partir de los datos mostrados en la Tabla 6.2 para la HRP y teniendo en cuenta los pesos atómicos de S y Fe, la relación S/Fe obtenida para la peroxidasa empleada en el presente trabajo de Tesis es de 9.1 mol/mol, la cual es similar a la calculada en base a los datos de literatura.

Tabla 6.2. Composición química (% en masa) determinada por FRX del material soporte (D), los diferentes biocatalizadores desarrollados (DE, DSGE, DHSGE) y la enzima sola (HRP). Condiciones de inmovilización: Ver la Fig. 6.8.

| Elemento | D | DE | DSGE | DHSGE | HRP |
|-----------------|----------|-----------|-------------|--------------|------------|
| Al | 6.2 | 5.5 | 5.1 | 5.5 | n.d. |
| Si | 28 | 27 | 26 | 31 | n.d. |
| Cl | 0.62 | 0.53 | 0.56 | 0.58 | 10 |
| K | 2.9 | 6.4 | 6.7 | 9.3 | n.d. |
| Ca | 9.4 | 9 | 8.3 | 5.8 | 26 |
| Ti | 2.7 | 2.6 | 2.6 | 3.2 | n.d. |
| Fe | 50 | 49 | 51 | 44 | 8.0 |
| S | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 42 |
| Ag | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 14 |

Diatomita calcinada (D). Biocatalizador inmovilizado por adsorción (DE), unión covalente con (DHSGE) y sin pretratamiento ácido (DSGE). n.d.: no detectado.

6.3.2.6. Microscopía electrónica de barrido y análisis de dispersión de rayos X (SEM/EDX). La Tabla 6.3 muestra la composición química (como porcentaje en masa) obtenida por EDX correspondientes a las muestras D, DSG y DSGE. Como regla general, los espectros EDX mostraron la presencia mayoritaria de silicio (Si), oxígeno (O) y carbono (C), así como otros elementos minoritarios tales como hierro (Fe), calcio (Ca), aluminio (Al), azufre (S), sodio (Na), cloro (Cl), potasio (K), cobre (Cu) y magnesio (Mg). Cabe mencionar que el nitrógeno (N) no se detectó en una cantidad cuantificable. Nótese de la Tabla 6.3 que, cuando la diatomita fue tratada con APTES y glutaraldehído (DSG), el contenido de Si y O aumentaron sustancialmente. Además, también se observa que con relación a D y DSG, el

contenido de Fe y Ca fue prácticamente duplicado cuando la enzima fue inmovilizada (DSGE). Esto puede ser un indicador de que la enzima fue inmovilizada, ya que, como se vio en los resultados de análisis por FRX (Tabla 6.2), la HRP contenía Ca y Fe en su composición (Hiner y col., 1996; Veitch, 2004; Malvi y col., 2012).

Tabla 6.3. Composición química (% , masa) determinados por EDX de la diatomita antes y después de la modificación superficial y la inmovilización de HRP. Condiciones de inmovilización: Ver la Fig. 6.8.

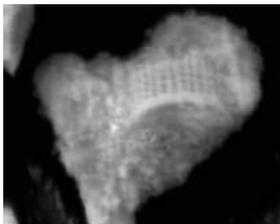
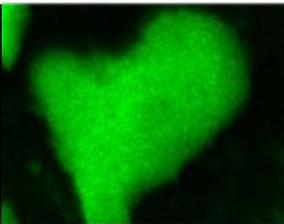
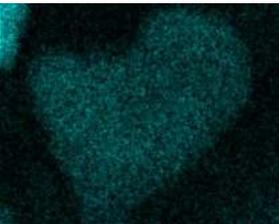
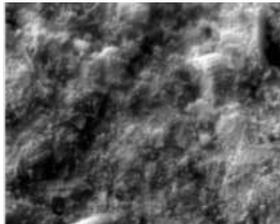
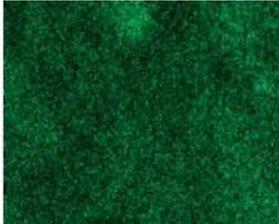
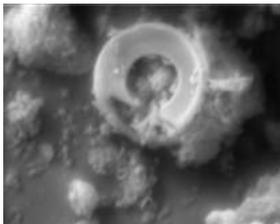
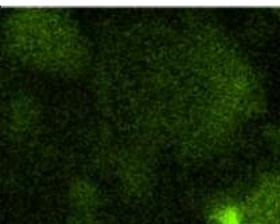
| Elementos | D | DSG | DSGE |
|------------------|-----------|------------|-------------|
| C | 55 ± 5 | 28 ± 5 | 14 ± 2 |
| O | 27 ± 5 | 39 ± 5 | 39 ± 1 |
| Na | 0.9 ± 0.2 | n.d. | n.d. |
| Al | 0.9 ± 0.2 | 4 ± 1 | 6 ± 0.3 |
| Si | 4 ± 2 | 19 ± 6 | 25 ± 2 |
| S | 1 ± 0.1 | n.d. | n.d. |
| Cl | 1 ± 0.5 | n.d. | n.d. |
| K | 1 ± 1 | 0.4 ± 0.2 | 0.8 ± 0.1 |
| Cu | 7 ± 1 | 6 ± 1 | 8 ± 0.4 |
| Fe | 0.4 ± 0.1 | 2 ± 1 | 3 ± 0.4 |
| Ca | 0.4 ± 0.1 | 0.4 ± 0.1 | 1 ± 0.1 |
| Mg | 0.3 ± 0.1 | 1 ± 1 | 2 ± 1 |

D: Diatomita calcinada. DSG: Diatomita silanizada con APTES y activada con glutaraldehído. DSGE: Inmovilización de HRP por unión covalente.

Las micrografías de la Tabla 6.4 muestran ejemplos típicos de la distribución de los elementos Si, Fe y Ca sobre la superficie de las muestras D, DSG y DSGE. A modo general, el mapeo de Si, Fe y Ca mostró una dispersión bastante homogénea en todas las muestras estudiadas, con menor atenuación en la coloración de los elementos Ca y Fe. No obstante, con relación a la distribución de Fe, en la muestra DSGE se observaron algunos aglomerados de color verde intenso, relacionados con el aumento del contenido de Fe tras la inmovilización de la HRP, en concordancia con los resultados mostrados en Tabla 6.3.

Tabla 6.4. Mapas de la distribución de los elementos Si, Fe y Ca para D, DSG y DSGE.

Condiciones de inmovilización: Ver la Fig. 6.8.

| Micrografía original | Distribución de Si | Distribución de Fe | Distribución de Ca |
|---|---|--|---|
|  |  |  |  |
| D | | | |
|  |  |  |  |
| DSG | | | |
|  |  |  |  |
| DSGE | | | |

6.3.2.7. Análisis termogravimétrico (TGA). La estabilidad térmica del soporte con y sin la enzima fue analizada mediante TGA. A partir de las curvas de descomposición térmica (TGA) se calculó la derivada de la pérdida de masa (DTGA) como función de la temperatura de descomposición (Fig. 6.16). El perfil de DTGA durante la degradación de la HRP (Fig. 6.16a) muestra dos picos característicos a 268 y 520 °C. Estos resultados son similares a los reportados en la descomposición de albúmina de suero bovino (Chen y Gu, 2008). Por su parte, durante la descomposición térmica de D (Fig. 6.16b) se observan tres picos alrededor de 40, 420 y 850 °C. Según varios autores (Caliskan y col., 2011; Inchaurredo y col., 2017), estos picos están relacionados con la pérdida de agua libre absorbida en la superficie de la diatomita (40 °C), la deshidroxilación de grupos externos de silanol y pérdida de agua en los poros (420 °C), y el colapso de los poros o la deshidroxilación de grupos silanol en la superficie interna de la diatomita (850 °C). La Figura 6.16c muestra la pérdida de masa de la diatomita sometida a aminofuncionalización con APTES y posterior activación con glutaraldehído (DSG). Nótese de la Figura 6.16c que, con relación a D, durante la descomposición térmica de DSG se observó una banda ancha adicional alrededor de 600 °C, la cual se asocia con la degradación de la fracción orgánica (APTES y glutaraldehído) incorporada a la superficie de la diatomita (X.-J. Huang y col., 2008; Hu y col., 2013; Mansilla y col., 2018). Las Figuras 6.16d (DE), 6.16e (DSGE) y 6.16f (DHSGE) muestran la descomposición térmica de los biocatalizadores inmovilizados. Nótese que en comparación con las muestras sin enzima (D, DSG), en las Figuras 16d-f se observa un pico adicional a aproximadamente 300 °C, posiblemente debido a la descomposición de la HRP unida al soporte.

La Tabla 6.5 muestra la masa residual luego de la descomposición térmica a 900 °C de las diferentes muestras estudiadas. Como era de esperarse, las muestras completamente orgánica (HRP) y la inorgánica (D) tuvieron los valores más bajos (0%) y altos (95%) de masa residual, respectivamente. Además, la Tabla 6.5 muestra que conforme se iba

incorporando fracción orgánica sobre D, la masa residual iba disminuyendo. Los resultados obtenidos son compatibles con los del análisis de DRX, FTIR y EDX, los cuales sugieren la efectiva aminofuncionalización y activación de la diatomita, y la consecuente inmovilización de la peroxidasa.

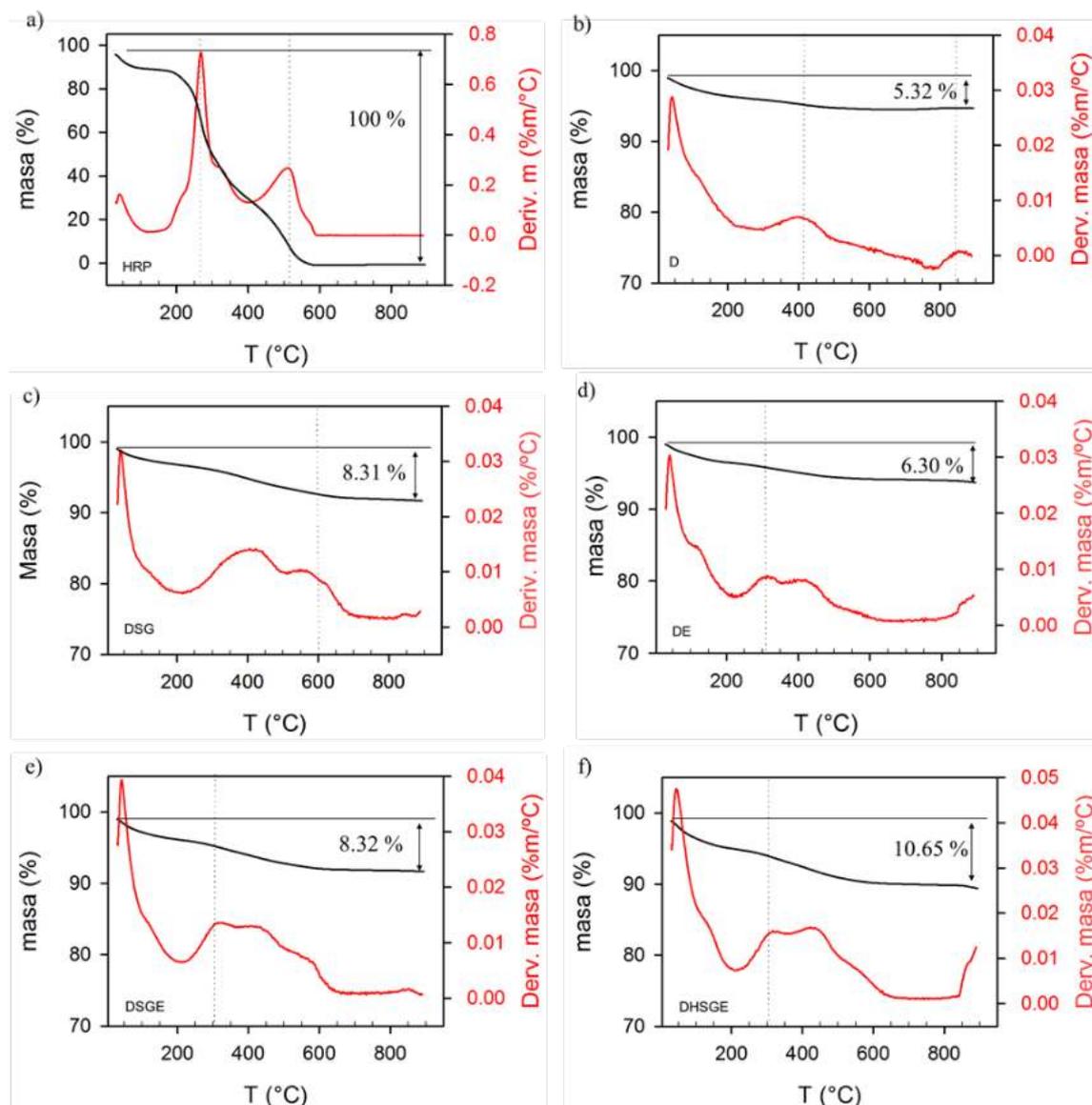


Figura 6.16. Masa residual y derivada de la masa residual (%) como función de la temperatura (°C) para: a) HRP. b) D. c) DSG. d) DE. e) DSGE. f) DHSGE. Condiciones de inmovilización: Ver la Fig. 6.8.

Tabla 6.5. Propiedades térmicas de la diatomita con y sin modificación superficial, y de los biocatalizadores estudiados. Datos extraídos de la Figura 6.16. Condiciones de inmovilización: Ver la Fig. 6.8.

| Muestra | Masa residual (%) | T _{deg} (°C) |
|---------|-------------------|------------------------|
| HRP | 0.00 | 40, 268, 520 |
| D | 94.68 | 40, 420, 850 |
| DE | 93.70 | 40, 300, 420, 850 |
| DSG | 91.69 | 40, 420, 600, 850 |
| DSGE | 91.68 | 40, 310, 420, 600, 850 |
| DHSGE | 89.35 | 40, 310, 420, 600, 850 |

T_{deg}: Temperatura de degradación. D: Diatomita calcinada. DSG: Diatomita silanizada con APTES y activada con glutaraldehído. Inmovilización de HRP por unión covalente con (DHSGE) y sin pretratamiento ácido (DSGE)

6.3.3. Evaluación de los biocatalizadores mediante la decoloración de OII

En los Capítulos 3 y 5 de la presente tesis Doctoral se demostró que la actividad catalítica de la HRP en la decoloración de orange II (OII) con peróxido de hidrógeno (P) es altamente eficiente a temperatura ambiente (20 °C) y pH 9. Empleando estas condiciones, en esta Sección se estudió la decoloración de OII en presencia de la diatomita calcinada (D) y de los biocatalizadores DE, DSGE, y DHSGE.

6.3.3.1. Influencia de la concentración de DSGE. La Figura 6.17 muestra un ejemplo del cambio del espectro UV/Visible (Fig. 6.17a) y de los perfiles de decoloración de OII con P (Fig. 6.17b) en presencia de distintas concentraciones de DSGE. En la Figura 6.17a se observa una notoria disminución del pico a 485 nm luego de 4 h de ensayo, así como la presencia de al menos 3 puntos isobésticos a 290, 320 y 375 nm, típicos de la oxidación

enzimática de OII (ver Capítulos 3 y 5). Por su parte, en la Figura 6.17b se observa que inmediatamente después de agregado el peróxido de hidrógeno, la concentración de OII disminuyó a medida que transcurría el tiempo. Además, la velocidad con que se consumió OII era función de la concentración de enzima en el sistema, la cual estaba relacionada con la concentración del biocatalizador. Estos resultados concuerdan con los reportados en los Capítulos 3 y 5.

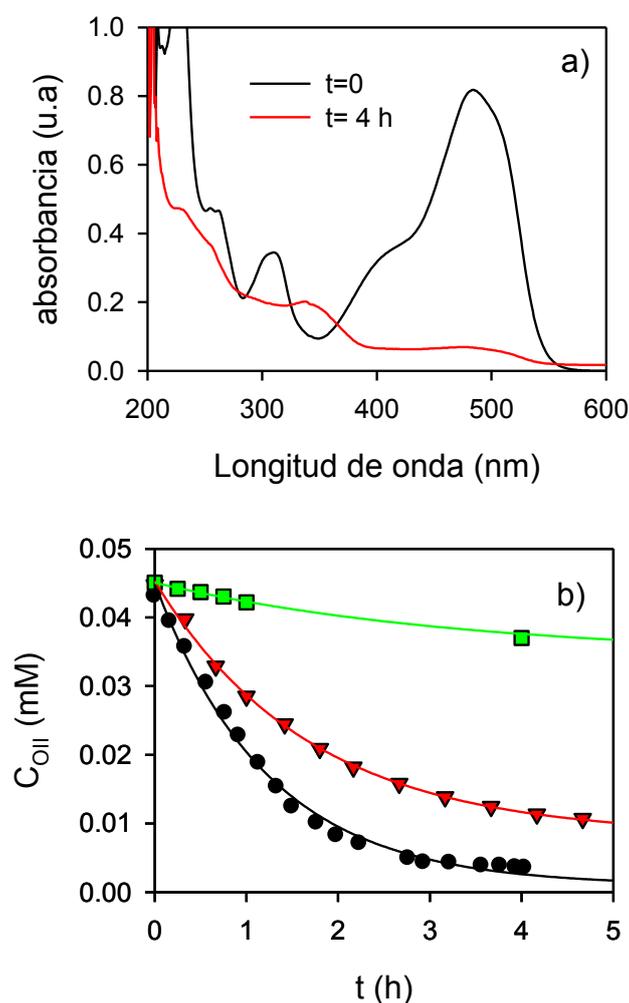


Figura 6.17. Ejemplo del a) cambio del espectro UV/visible, y b) perfiles de decoloración de OII con P en presencia de distintas concentraciones de DSGE: 32 gD/L (círculos negro), 18 gD/L (triángulos rojo) y 9 gD/L (cuadrados verde). En todos los experimentos: $OII_0 = 0.045$ mM, $P_0 = 0.090$ mM, $T = 20$ °C, pH 9.

6.3.3.2. Comparación de la cinética de decoloración de OII empleando los biocatalizadores DE, DHSGE, y DSGE, en presencia y ausencia de peróxido (P). En la Sección anterior se demostró que la peroxidasa inmovilizada mediante unión covalente (DSGE) tiene potencial para catalizar la oxidación de OII con P. Sin embargo, la remoción del colorante también pudo deberse a procesos de adsorción. Por lo tanto, se realizaron ensayos control de adsorción sobre D y DSGE. Además, se llevaron a cabo ensayos de decoloración de OII con y sin P en presencia de DE y DHSGE.

La Figura 6.18 muestra ejemplos del cambio del espectro UV/Visible durante la decoloración de OII con y sin P en presencia de D, y con los biocatalizadores DE, DSGE y DHSGE. Durante la decoloración de OII con P en presencia de los biocatalizadores se observó la aparición de al menos 3 puntos isosbéticos a 290, 320 y 375 nm, típicos de la oxidación enzimática de OII (Figs. 6.18c, e, g). Por su parte, en ausencia de P (Figs. 6.18d, f, h) los espectros UV/Visible del OII no cambiaron su forma tras 6 h de ensayo, aún en los sistemas con enzima inmovilizada, indicando que no había reacción de oxidación. Sin embargo, se observó una notoria disminución de todo el espectro asociado a la adsorción del colorante. Resultados similares se obtuvieron cuando se estudió la decoloración de OII en presencia de las diatomitas calcinadas (D), tanto en presencia (Fig. 6.18a) como en ausencia de peróxido (Fig. 6.18b).

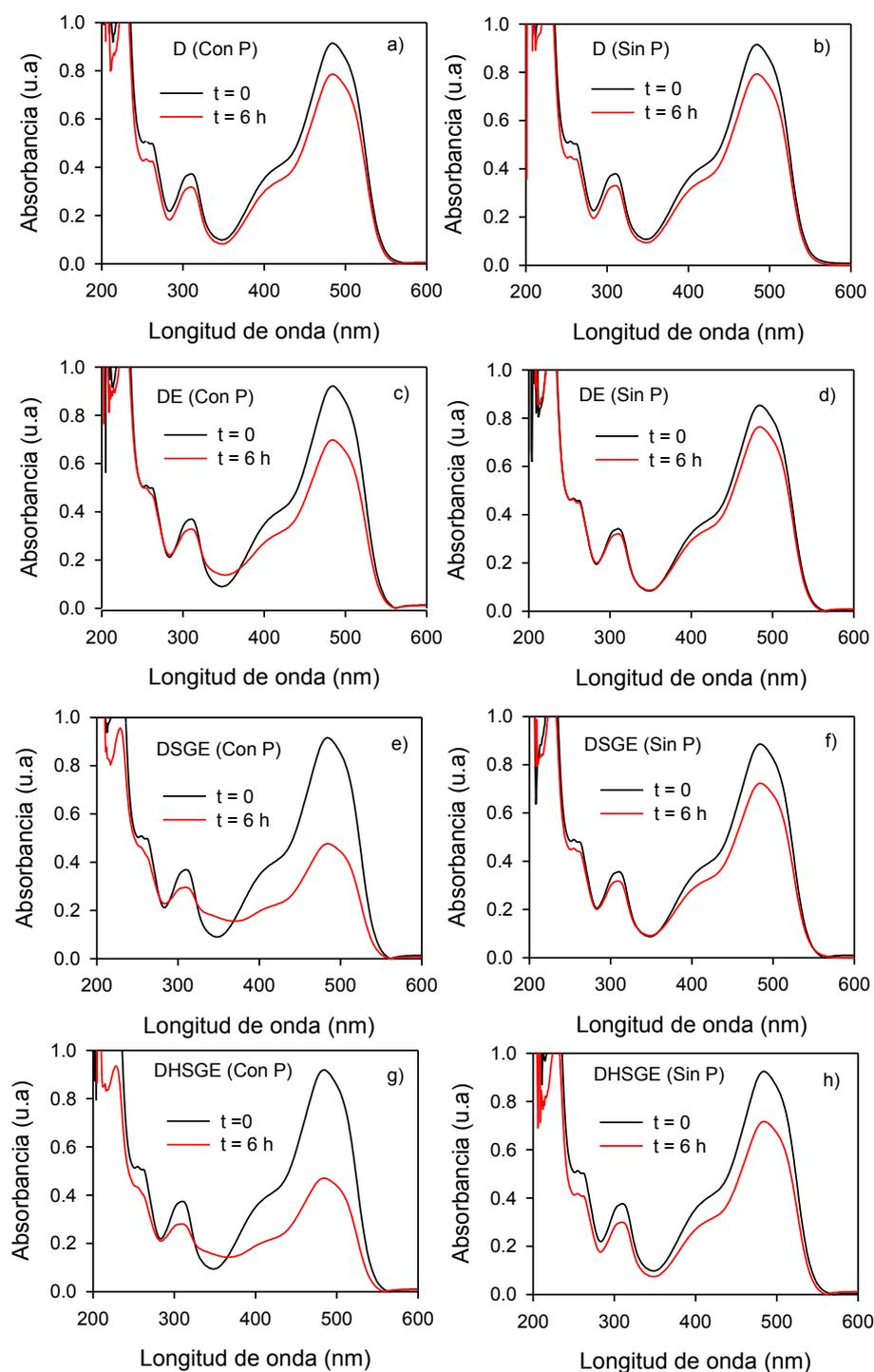


Figura 6.18. Ejemplos del cambio del espectro UV/Visible durante la decoloración de OII con y sin P en presencia de D (a, b), DE (c, d), DSGE (e, f), y DHSGE (g, h). Condiciones experimentales: 9 gBiocatalizador/L, $OII_0 = 0.045$ mM, $T = 20$ °C, pH 9. Cuando el ensayo se realizó en presencia de peróxido de hidrógeno, $P_0 = 0.090$ mM.

La Figura 6.19 muestra que la remoción del colorante (R_c) fue mayor cuando los ensayos de decoloración se realizaron con peróxido de hidrógeno en presencia de los biocatalizadores DE, DSGE y DHSGE. Cabe destacar que en estudios anteriores se concluyó que estas diatomitas no catalizan la oxidación de OII con P en las condiciones ensayadas (Inchaurrondo y col., 2016). Los resultados mostrados en la Figura 6.19 sugieren que la enzima soportada tenía actividad catalítica. Sin embargo, debe notarse que la remoción ocurrió simultáneamente por catálisis enzimática y adsorción de OII sobre el soporte. Es notorio el caso de DHSGE, donde aproximadamente la mitad de la remoción del colorante se debía a la acción catalítica de la HRP. Es importante resaltar que los reportes en materia de eliminación de contaminantes por enzimas inmovilizadas generalmente no discriminan entre la contribución enzimática y por adsorción, siendo únicamente informados datos globales u observables (Gomez y col., 2006; Chouyyok y col., 2009; J. Huang y col., 2009; Malvi y col., 2012; Niu y col., 2013; Jain y col., 2016; Cabrera y col., 2017; Cabrera y col., 2018).

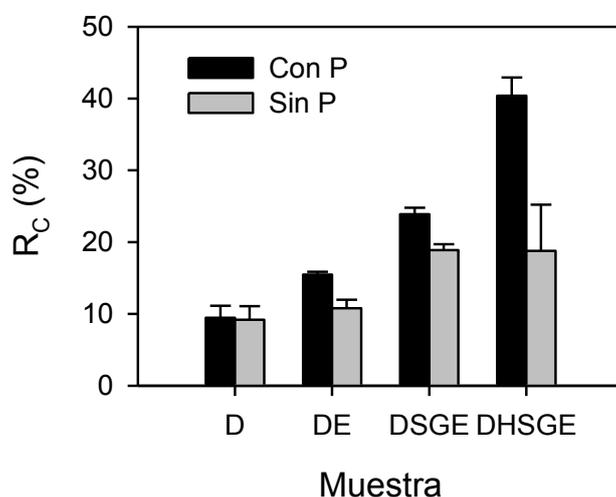


Figura 6.19. Remoción de OII (R_c) con y sin P en presencia de D, DE, DSGE y DHSGE.

Condiciones experimentales: 9 gBiocatalizador/L, $OII_0 = 0.045$ mM, $T = 20$ °C, pH 9.

Tiempo: 6 h. Cuando el ensayo se realizó en presencia de peróxido de hidrógeno, $P_0 = 0.090$ mM.

Según Wu y col. (2006) los grupos silanol sobre la superficie de materiales de sílica pueden formar puentes de hidrógeno con los grupos sulfonato ($-\text{SO}_3$) de colorantes orgánicos favoreciendo su adsorción. Teniendo en cuenta que la remoción de OII por adsorción sobre D y DE fue similar (Fig. 6.19), esto sugiere que la presencia de enzima adsorbida en DE prácticamente no alteraba la cantidad de grupos silanol disponibles respecto de D. Por su parte, tras la inmovilización covalente de la enzima (biocatalizadores DSGE y DHSGE), los valores de R_C en ausencia de P fueron prácticamente duplicados (19%) con relación a D y DE (10%). En este sentido, distintos autores reportaron aumentos significativos en la adsorción de colorantes orgánicos cuando trataron diferentes materiales adsorbentes con APTES (Wu y col., 2006; Asouhidou y col., 2009). De acuerdo a esos autores, este tipo de modificaciones superficiales podrían favorecer al aumento de las interacciones electrostáticas entre el colorante y el material adsorbente.

Según varios autores (Caliskan y col., 2011; Inchaurredo y col., 2016), los grupos silanol de la superficie de la diatomita ganan protones a bajos valores de pH, y viceversa. De acuerdo a Inchaurredo y col. (2016), el punto de carga cero de las diatomitas está comprendido entre 6 y 8. Por lo tanto, al pH empleado en los ensayos (pH 9) la superficie de la diatomita debería estar cargada negativamente. Por otra parte, de acuerdo a la literatura (Liang y col., 2010; Gil y col., 2011), el grupo naftol del OII tiene un pK_a de 11.4, mientras que el grupo $-\text{SO}_3\text{H}$ tiene un pK_a de aproximadamente 1 (ver Cap. 3. Secc. 3.2.1). Es decir que a pH 9, el OII se encontraría bajo su forma aniónica (Inchaurredo y col., 2016). Por lo tanto, las interacciones electrostáticas entre el grupo aniónico del colorante azoico ($-\text{SO}_3^-$) y la superficie de la diatomita no favorecerían la unión del colorante sobre la diatomita. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que al acidificar la diatomita y/o modificar su superficie con APTES, la superficie del material podría protonarse, aumentando las interacciones electrostáticas entre el anión del OII y la diatomita, y en consecuencia, incrementando la

adsorción del colorante. Además, teniendo en cuenta que la diatomita estudiada no está compuesta solamente por sílice, su superficie puede contener otros grupos funcionales ionizables ($-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{SH}$) que facilitarían la adsorción del colorante (Caliskan y col., 2011).

6.3.3.3. Ensayos de reutilización de los biocatalizadores. Como se ha discutido a lo largo de la presente Tesis Doctoral, la utilización de enzimas inmovilizadas es un factor clave para reducir costos asociados al consumo de la enzima. En esta Sección se evaluaron los biocatalizadores DE, DSGE y DHSGE, empleándolos durante 5 ciclos de remoción de OII con peróxido de hidrógeno. Cada ciclo de remoción del colorante consistió en hacer reaccionar OII con P en presencia de la HRP inmovilizada por adsorción (DE) o covalentemente (DSGE, DHSGE), a pH 9 y 20 °C, durante 6 h. De manera similar, los biocatalizadores inmovilizados fueron reutilizados en la decoloración de OII en ausencia de P con el objeto de evaluar la contribución por adsorción a la remoción global.

La Tabla 6.6 muestra la remoción del colorante (R_C , %) como función del número de usos de DE, DSGE y DHSGE en la decoloración de OII, tanto en presencia como en ausencia de P. En principio, nótese que durante el primer uso en presencia de P, DE removió cerca del 15% del colorante, mientras que DSGE y DHSGE removieron 24% y 40%, respectivamente. Este resultado sugiere que DSGE y DHSGE contenían mayor carga de enzima inmovilizada (Q , mgHRP/gD) en comparación con DE. Es interesante notar que los valores de R_C en DHSGE fueron más altos a los obtenidos con DSGE, a pesar de que DHSGE contenía menor carga enzimática que DSGE (Fig.6.8). Posteriormente, a medida que los biocatalizadores fueron usados en la decoloración de OII, en todos los casos R_C fue disminuyendo paulatinamente. Nótese que tras el segundo o tercer uso, los valores de R_C en presencia (oxidación+adsorción) y en ausencia (adsorción) de P fueron similares, indicando

que la remoción del colorante solamente era debida al proceso de adsorción sobre los biocatalizadores.

Tabla 6.6. Remoción del colorante (R_c , %) en función de la reutilización de los biocatalizadores DE, DSGE y DHSGE en presencia (oxidación+adsorción) y en ausencia (adsorción) de P. En todos los casos: 9 gBiocatalizador/L, $OII_0 = 0.045$ mM, $P_0 = 0.090$ mM, $T = 20$ °C, pH 9. Los valores de R_c se expresan con su correspondiente desviación estándar.

| Uso | DE | | DSGE | | DHSGE | |
|-----|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|
| | R_c (%) | | R_c (%) | | R_c (%) | |
| | Con P | Sin P | Con P | Sin P | Con P | Sin P |
| 1 | 15 ± 1 | 11 ± 1 | 24 ± 1 | 19 ± 1 | 40 ± 3 | 19 ± 6 |
| 2 | 4 ± 1 | 7 ± 2 | 10 ± 1 | 13 ± 3 | 14 ± 2 | 11 ± 1 |
| 3 | 3 ± 2 | 4 ± 4 | 8 ± 2 | 4 ± 1 | 14 ± 2 | 8 ± 1 |
| 4 | 4 ± 2 | 5 ± 3 | 6 ± 0 | 3 ± 6 | 7 ± 1 | 6 ± 2 |
| 5 | 2 ± 1 | 6 ± 4 | 5 ± 1 | 4 ± 3 | 12 ± 7 | 5 ± 1 |

La disminución del nivel de remoción de contaminantes en función del uso repetido de enzimas inmovilizadas es muy frecuente y está relacionada con la pérdida de actividad catalítica ya se a causa de la desnaturalización de la proteína de la enzima y/o debido a la lixiviación de la enzima hacia la fase homogénea (X.-J. Huang y col., 2008; Xu y col., 2013; Panatdasirisuk y col., 2015). Con el objeto de evaluar la lixiviación de la enzima desde el biocatalizador hacia la solución, se determinó la actividad peroxidasa en la mezcla de reacción (AP) una vez finalizada cada etapa de oxidación. De acuerdo a la Tabla 6.7, para todos los biocatalizadores estudiados (DE, DSGE, DHSGE), los valores de AP en fase homogénea solo fueron cuantificables tras los dos primeros usos. Este resultado es

consistente con los resultados mostrados en la Tabla 6.6, confirmando que luego de los dos primeros usos, la remoción del colorante solamente era debida al proceso de adsorción.

Tabla 6.7. Actividad peroxidasa (AP) de los sobrenadantes de reacción una vez finalizado cada ciclo de oxidación de OII. Los valores de AP se expresan con su correspondiente desviación estándar.

| | DE | DSGE | DHSGE |
|-----|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | AP | AP | AP |
| Uso | (mM/h)×10 ⁻³ | (mM/h)×10 ⁻³ | (mM/h)×10 ⁻³ |
| 1 | 28 ± 15 | 7 ± 1 | 4 ± 2 |
| 2 | 3 ± 1 | 2 ± 1 | 1 ± 1 |
| 3 | n.d. | 4 ± 4 | n.d. |
| 4 | n.d. | n.d. | n.d. |

6.3.3.4. Oxidación de orange II (OII) catalizada por las DSGE en un reactor tipo columna. Se realizaron ensayos de remoción de OII en un reactor tipo columna rellena con DSGE (Fig. 6.20). Se realizaron tres experimentos. Cada experimento consistía en una etapa inicial en donde se recirculaba OII (0.09 mM) por la columna hasta obtener una concentración aproximadamente constante de OII, seguida de una etapa de alimentación con peróxido. Este procedimiento permitía identificar la contribución de remoción de OII por adsorción (etapa inicial sin peróxido) y por adsorción/oxidación (etapa con peróxido).

La Figura 6.20 muestra que durante las primeras tres horas del Experimento 1 (Exp1) se observó una importante adsorción de OII a la columna. Una vez estabilizada la columna, se midió la actividad peroxidasa (AP) en el líquido de recirculación, obteniéndose un valor 72 mM/h. Esto indicaba que parte de la enzima había lixiviado desde el

biocatalizador DSGE en la columna hacia la solución. A las 3.5 h de operación se inició la adición de peróxido, observándose una rápida oxidación del OII. Hacia el final del experimento ($t = 4.5$ h) se obtuvo una remoción global de OII del 93%. Finalmente, se midió la AP resultando en 44 mM/h, lo que indicaba que la enzima no se estaba lixiviando.

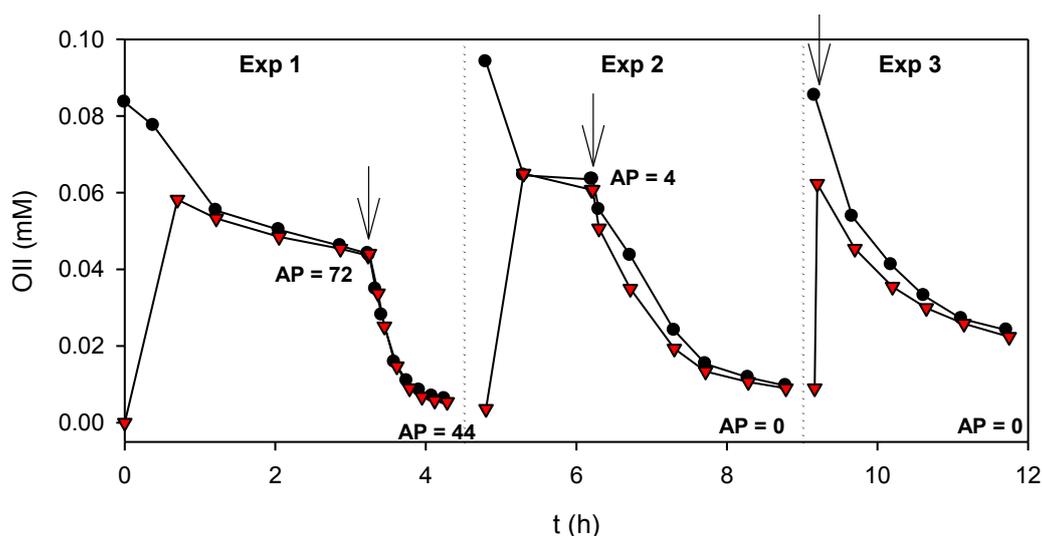


Figura 6.20. Remoción de OII mediante una columna rellena con DSGE. Los círculos negros indican la concentración de OII en la línea de recirculación, los triángulos rojos el OII a la salida de la columna. Las flechas indican el inicio de la alimentación con peróxido de hidrógeno (2.6 mM) con un caudal de 20 mL/h. AP (mM/h): actividad peroxidasa en la línea de recirculación. Todos los ensayos se realizaron en buffer fosfato 100 mM, pH 9, a temperatura ambiente.

Una vez finalizado el Exp1, la columna se lavó con buffer fosfato y se repitió el procedimiento. Como la columna ya tenía adsorbido OII del Exp1, durante el Exp2 el OII de la línea de recirculación se equilibró rápidamente con el adsorbido en la columna. En este punto, la AP del reciclo era de apenas 4 mM/h, el cual indicaba que la columna seguía perdiendo enzima. Al iniciar la alimentación con peróxido se observó un descenso del OII,

pero más lento que en el Exp1. Hacia el final del Exp2 la remoción global de OII fue del 90%. Debido a la pérdida de actividad enzimática, la etapa de oxidación en el Exp2 demoró aproximadamente el doble respecto del Exp1. Finalmente, durante el tercer ensayo la alimentación de peróxido fue desde el inicio del experimento. Esto se debió a que los resultados del Exp2 en la etapa de adsorción indicaban que la columna estaba equilibrada respecto de la concentración de OII en solución. Hacia el final de Exp3 se obtuvo una remoción de OII del 80%. Debe destacarse que al final del Exp2 y durante el Exp3 no se detectó AP en la solución de recicló. Este resultado indicó que la columna había dejado de liberar enzima y que el proceso observado de remoción de OII durante el Exp3 era una combinación de adsorción y oxidación del colorante catalizada por la DSGE en la columna.

6.3.3.5. Estabilidad de la actividad catalítica durante el almacenamiento. La inmovilización de enzimas busca reducir los costos asociados al uso del biocatalizador. Por tanto, es deseable que además de poder ser reutilizados en varios ciclos catalíticos, los biocatalizadores sean estables al almacenamiento. Por esta razón, se estudió la estabilidad de los biocatalizadores DE, DSGE y DHSGE durante el almacenamiento en seco durante un mes a 4 °C. Pasado este tiempo, fueron utilizados en típicos ensayos de decoloración de OII con P. La Tabla 6.8 muestra que los valores de remoción de colorante (R_C) fueron prácticamente similares a los medidos con los biocatalizadores recién preparados, demostrando la estabilidad de los biocatalizadores al almacenamiento en seco a 4 °C.

Algunas técnicas de inmovilización de enzimas favorecen su la estabilidad de almacenamiento. En solución acuosa las enzimas tienden a perder actividad rápidamente durante el almacenamiento, en especial a temperaturas superiores a 4 °C (J.-L. Huang y Tsai, 2009; Cabrera y col., 2017). Con el objetivo de verificar esto, se almacenaron dos muestras de DSGE, una en seco, y otra muestra de 40 mg de DSGE en 5 mL de BF (100mM, pH 9), ambas a 4 °C. La Figura 6.21 muestra un ejemplo del cambio de los espectros UV/visible

durante la decoloración de OII con P en presencia de DSGE almacenado en seco (Fig. 6.21a) y en solución (Fig. 6.21b) durante un mes. En la Figura 6.21a se observa el cambio de espectro típico de la oxidación enzimática de OII, es decir, la disminución de la banda a 485 nm y la presencia de los puntos pseudoisobásticos a 290, 320 y 375 nm. A partir de la absorbancia a 485 nm, se calculó que se removió un 85% del colorante con el biocatalizador DSGE almacenado en seco durante un mes a 4 °C. Por el contrario, en el caso del biocatalizador DSGE almacenado en solución los espectros de la Figura 6.21b indican claramente que no hubo oxidación enzimática. En este caso, solo se removió un 25% de colorante por adsorción sobre el biocatalizador. Los resultados demostraron que la técnica de inmovilización propuesta favoreció a la estabilidad de la enzima, debido a que permitió que el biocatalizador pueda ser almacenado en seco. Estos resultados son muy importantes ya que a pesar de que el biocatalizador pierde actividad en función de la reutilización, la técnica de inmovilización propuesta define un protocolo exitoso para soportar enzimas estables al almacenamiento, sobre un material ecoamigable, de gran disponibilidad en Argentina y bajo costo, como son las diatomitas.

Tabla 6.8. Porcentaje de remoción del colorante (R_c) en función del tiempo de almacenamiento (t_a) de los biocatalizadores estudiados. En todos los experimentos: 9

gBiocatalizador/L, $OII_0 = 0.045$ mM, $P_0 = 0.090$ mM, $T = 20$ °C, pH 9.

| | R_c (%) | R_c (%) |
|-------|-----------|---------------|
| | $t_a = 0$ | $t_a = 1$ mes |
| DE | 15 ± 1 | 22 ± 9 |
| DSGE | 24 ± 1 | 29 ± 5 |
| DHSGE | 40 ± 3 | 44 ± 5 |

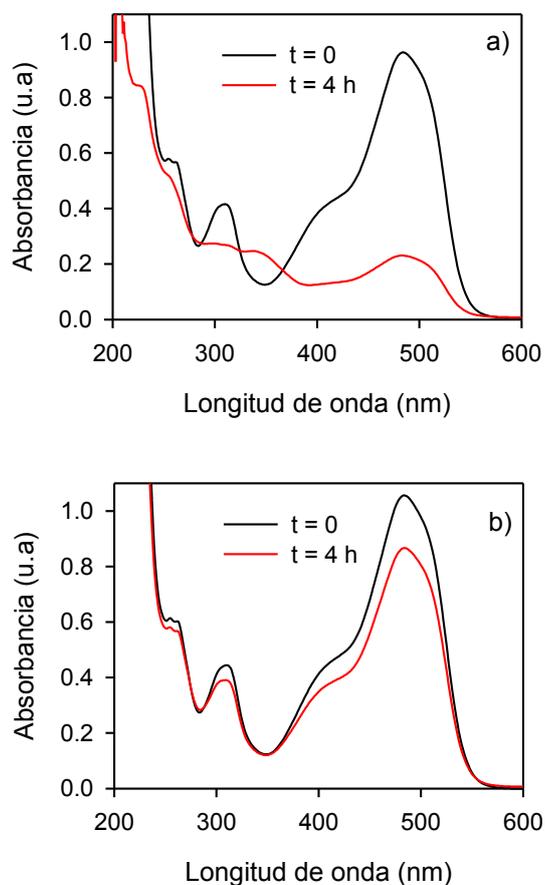


Figura 6.21. Ejemplos del cambio del espectro UV/Visible durante experimentos de decoloración de OII en presencia de DSGE almacenado en seco (a) y en solución (b) durante un mes a 4 °C. Condiciones experimentales: 18 gBiocatalizador/L, $OII_0 = 0.045$ mM, $P = 0.09$ mM, $T = 20$ °C, pH 9.

6.4. CONCLUSIONES

En el presente Capítulo se estudió la inmovilización de HRP por adsorción y unión covalente sobre diatomitas calcinadas. El protocolo de inmovilización covalente propuesto por Gómez y col (2006) fue adaptado con éxito para aumentar la carga de enzima soportada

por unión covalente (DSGE) comparación con la inmovilización por adsorción (DE). La hidrólisis superficial de las diatomitas no incrementó la carga de enzima inmovilizada (DHSGE).

Los resultados de la caracterización por DRIFT, DRX, EDX y TGA del material soporte (D) y de los biocatalizadores (DE, DSGE, DHSGE) demostraron que en todos los casos la HRP se inmovilizó exitosamente sobre el soporte.

Los resultados obtenidos durante las reacciones de evaluación de los biocatalizadores mostraron que la diatomita adsorbía el colorante. Sin embargo, la HRP inmovilizada tenía actividad. A pesar de que se observó una disminución de actividad debido a la lixiviación de la enzima, la HRP soportada por unión covalente retuvo la actividad catalítica durante 12 h de oxidación de OII con P.

La técnica de inmovilización propuesta definió un protocolo exitoso para soportar enzimas estables al almacenamiento durante al menos un mes. Los resultados obtenidos en la presente Tesis representan un punto de inicio para estudios futuros relacionados con la inmovilización de extractos de distintas enzimas con diversas aplicaciones industriales.

Referencias

- An, N., Zhou, C. H., Zhuang, X. Y., Tong, D. S., y Yu, W. H. (2015). Immobilization of enzymes on clay minerals for biocatalysts and biosensors. *Applied Clay Science*, *114*, 283-296.
- Antonides, L.E. (1998). Diatomite: U.S. Geological Survey Mineral Commodity Summaries 1998, p. 56-57.
- Asouhidou, D. D., Triantafyllidis, K. S., Lazaridis, N. K., y Matis, K. A. (2009). Adsorption of Remazol Red 3BS from aqueous solutions using APTES-and cyclodextrin-modified HMS-type mesoporous silicas. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *346*(1-3), 83-90.
- Bartonek-Roxa E., Eriksson H., Mattiasson B (1991). The cDNA sequence of a neutral horseradish peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta* *1088* 245-250.
- Bilal, M., Rasheed, T., Zhao, Y., Iqbal, H. M., y Cui, J. (2018). “Smart” chemistry and its application in peroxidase immobilization using different support materials. *International journal of biological macromolecules*, *119*, 278-290.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, *72*(1-2), 248-254.
- Brüning, C., y Grobe, J. (1995). Aldehyde-functionalized ethoxysilanes as new enzyme immobilization reagents. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*(22), 2323-2324.
- Cabrera, M., Assis, C. R., Neri, D. F., Pereira, C. F., Soria, F., y Carvalho Jr, L. B. (2017). High sucrolytic activity by invertase immobilized onto magnetic diatomaceous earth nanoparticles. *Biotechnology reports*, *14*, 38-46.

- Cabrera, M., da Fonseca, T. F., de Souza, R. V. B., de Assis, C. R. D., Marcatoma, J. Q., da Costa Maciel, J., . . . de Carvalho Jr, L. B. (2018). Polyaniline-coated magnetic diatomite nanoparticles as a matrix for immobilizing enzymes. *Applied Surface Science*, 457, 21-29.
- Cacciotti, I., Rinaldi, M., Fabbrizi, J., y Nanni, F. (2019). Innovative polyetherimide and diatomite based composites: influence of the diatomite kind and treatment. *Journal of Materials Research and Technology*, 8, 1737-1745.
- Caliskan, N., Kul, A. R., Alkan, S., Sogut, E. G., y Alacabey, I. (2011). Adsorption of Zinc (II) on diatomite and manganese-oxide-modified diatomite: A kinetic and equilibrium study. *Journal of hazardous materials*, 193, 27-36.
- Chaisena, A., y Rangriwatananon, K. (2004). Effects of thermal and acid treatments on some physico-chemical properties of Lampang diatomite. *Suranaree J. Sci Technol*, 11, 289.
- Chen, C.-C., y Gu, Y. (2008). Enhancing the sensitivity and stability of HRP/PANI/Pt electrode by implanted bovine serum albumin. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(6), 765-770.
- Chouyyok, W., Panpranot, J., Thanachayanant, C., y Prichanont, S. (2009). Effects of pH and pore characters of mesoporous silicas on horseradish peroxidase immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56(4), 246-252.
- De Tommasi, E., Gielis, J., y Rogato, A. (2017). Diatom frustule morphogenesis and function: a multidisciplinary survey. *Marine genomics*, 35, 1-18.
- Deng, L., Du, P., Yu, W., Yuan, P., Annabi-Bergaya, F., Liu, D., y Zhou, J. (2019). Novel hierarchically porous allophane/diatomite nanocomposite for benzene adsorption. *Applied Clay Science*, 168, 155-163.
- Gil, A., Assis, F., Albeniz, S., y Korili, S. (2011). Removal of dyes from wastewaters by adsorption on pillared clays. *Chemical Engineering Journal*, 168(3), 1032-1040.

- Gomez, J., Bodalo, A., Gomez, E., Bastida, J., Hidalgo, A., y Gomez, M. (2006). Immobilization of peroxidases on glass beads: an improved alternative for phenol removal. *Enzyme and microbial technology*, 39(5), 1016-1022.
- Gómez, J., Bódalo, A., Gómez, E., Hidalgo, A., Gómez, M., y Murcia, M. (2008). A transient design model of a continuous tank reactor for removing phenol with immobilized soybean peroxidase and hydrogen peroxide. *Chemical Engineering Journal*, 145(1), 142-148.
- Gopinath, S., y Sugunan, S. (2007). Enzymes immobilized on montmorillonite K 10: Effect of adsorption and grafting on the surface properties and the enzyme activity. *Applied Clay Science*, 35(1-2), 67-75.
- Hiner, A. N., Hernández-Ruíz, J., Arnao, M. B., García-Cánovas, F., y Acosta, M. (1996). A comparative study of the purity, enzyme activity, and inactivation by hydrogen peroxide of commercially available horseradish peroxidase isoenzymes A and C. *Biotechnology and bioengineering*, 50(6), 655-662.
- Hu, Z., Xu, L., y Wen, X. (2013). Mesoporous silicas synthesis and application for lignin peroxidase immobilization by covalent binding method. *Journal of Environmental Sciences*, 25(1), 181-187.
- Huang, J.-L., y Tsai, Y.-C. (2009). Direct electrochemistry and biosensing of hydrogen peroxide of horseradish peroxidase immobilized at multiwalled carbon nanotube/alumina-coated silica nanocomposite modified glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 140(1), 267-272.
- Huang, J., Liu, Y., y Wang, X. (2009). Silanized palygorskite for lipase immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 57(1-4), 10-15.
- Huang, X.-J., Yu, A.-G., y Xu, Z.-K. (2008). Covalent immobilization of lipase from *Candida rugosa* onto poly (acrylonitrile-co-2-hydroxyethyl methacrylate)

- electrospun fibrous membranes for potential bioreactor application. *Bioresource technology*, 99(13), 5459-5465.
- Inchaurredo, N., Font, J., Ramos, C. P., y Haure, P. (2016). Natural diatomites: efficient green catalyst for Fenton-like oxidation of Orange II. *Applied Catalysis B: Environmental*, 181, 481-494.
- Inchaurredo, N., Ramos, C. P., Žerjav, G., Font, J., Pintar, A., y Haure, P. (2017). Modified diatomites for Fenton-like oxidation of phenol. *Microporous and Mesoporous Materials*, 239, 396-408.
- Jain, A., Ong, V., Jayaraman, S., Balasubramanian, R., y Srinivasan, M. (2016). Supercritical fluid immobilization of horseradish peroxidase on high surface area mesoporous activated carbon. *The Journal of Supercritical Fluids*, 107, 513-518.
- Laberge, M., Huang, Q., Schweitzer-Stenner, R., Fidy, J. (2003). The endogenous calcium ions of horseradish peroxidase C are required to maintain the functional nonplanarity of the Heme. *Biophys J*, 2542–2552.
- Liang, X., Zhong, Y., Zhu, S., Zhu, J., Yuan, P., He, H., y Zhang, J. (2010). The decolorization of Acid Orange II in non-homogeneous Fenton reaction catalyzed by natural vanadium–titanium magnetite. *Journal of hazardous materials*, 181(1-3), 112-120.
- Liu, D., Yuan, P., Tan, D., Liu, H., Wang, T., Fan, M., . . . He, H. (2012). Facile preparation of hierarchically porous carbon using diatomite as both template and catalyst and methylene blue adsorption of carbon products. *Journal of colloid and interface science*, 388(1), 176-184.
- Majoul, N., Aouida, S., y Bessaïs, B. (2015). Progress of porous silicon APTES-functionalization by FTIR investigations. *Applied Surface Science*, 331, 388-391.

- Malvi, B., Panda, C., Dhar, B. B., y Gupta, S. S. (2012). One pot glucose detection by [Fe III (biuret-amide)] immobilized on mesoporous silica nanoparticles: an efficient HRP mimic. *Chemical Communications*, 48(43), 5289-5291.
- Mansilla, A. Y., Lanfranconi, M., Alvarez, V. A., y Casalengué, C. A. (2018). Development and characterization of bentonite/wGLP systems. *Applied Clay Science*, 166, 159-165.
- Naatsaari L., Krainer F.W., Schubert M., Glieder A., Thallinger G.G. (2014). Peroxidase gene discovery from the horseradish transcriptome. *BMC Genomics*, 15, 227-227.
- Nayak, N., Huertas, R., Crespo, J. G., y Portugal, C. A. (2019). Surface Modification of Alumina Monolithic Columns with 3-Aminopropyltetraethoxysilane (APTES) for Protein Attachment. *Separation and Purification Technology*, 115674.
- Niu, J., Xu, J., Dai, Y., Xu, J., Guo, H., Sun, K., y Liu, R. (2013). Immobilization of horseradish peroxidase by electrospun fibrous membranes for adsorption and degradation of pentachlorophenol in water. *Journal of hazardous materials*, 246, 119-125.
- Okita, F. (2007). Estudio sobre Cadenas Productivas Seleccionadas en la República Argentina. industria de los minerales no-metalíferos: Informe Inédito. Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA
- Panatdasirisuk, W., Vongsetskul, T., Sucharitakul, J., Chaiyen, P., y Tangboriboonrat, P. (2015). Functionalized electrospun regenerated cellulose fibers for immobilizing pyranose 2-oxidase. *Reactive and Functional Polymers*, 86, 47-51.
- Pasternack, R. M., Rivillon Amy, S., y Chabal, Y. J. (2008). Attachment of 3-(aminopropyl) triethoxysilane on silicon oxide surfaces: dependence on solution temperature. *Langmuir*, 24(22), 12963-12971.

- Shaw, S.-Y., Chen, Y.-J., Ou, J.-J., y Ho, L. (2006). Preparation and characterization of Pseudomonas putida esterase immobilized on magnetic nanoparticles. *Enzyme and microbial technology*, 39(5), 1089-1095.
- Takahashi, H., Li, B., Sasaki, T., Miyazaki, C., Kajino, T., y Inagaki, S. (2000). Catalytic activity in organic solvents and stability of immobilized enzymes depend on the pore size and surface characteristics of mesoporous silica. *Chemistry of Materials*, 12(11), 3301-3305.
- Takai M., Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA), Secretaría de Industria Comercio y Minería, Estudio sobre Cadenas Productivas Seleccionadas en la República Argentina: Industria de los minerales no-metalíferos, Fundación Okita (2003)
- Thommes, M., Kaneko, K., Neimark, A. V., Olivier, J. P., Rodriguez-Reinoso, F., Rouquerol, J., y Sing, K. S. (2015). Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 87(9-10), 1051-1069.
- Vashist, S. K., Lam, E., Hrapovic, S., Male, K. B., y Luong, J. H. (2014). Immobilization of antibodies and enzymes on 3-aminopropyltriethoxysilane-functionalized bioanalytical platforms for biosensors and diagnostics. *Chemical reviews*, 114(21), 11083-11130.
- Veitch, N. C. (2004). Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65(3), 249-259.
- Wei, Y., Dong, H., Xu, J., y Feng, Q. (2002). Simultaneous immobilization of horseradish peroxidase and glucose oxidase in mesoporous sol-gel host materials. *ChemPhysChem*, 3(9), 802-808.

- Wu, Z., Xiang, H., Kim, T., Chun, M.-S., y Lee, K. (2006). Surface properties of submicrometer silica spheres modified with aminopropyltriethoxysilane and phenyltriethoxysilane. *Journal of colloid and interface science*, 304(1), 119-124.
- Xu, R., Chi, C., Li, F., y Zhang, B. (2013). Immobilization of horseradish peroxidase on electrospun microfibrillar membranes for biodegradation and adsorption of bisphenol A. *Bioresource technology*, 149, 111-116.
- Ye, X., Kang, S., Wang, H., Li, H., Zhang, Y., Wang, G., y Zhao, H. (2015). Modified natural diatomite and its enhanced immobilization of lead, copper and cadmium in simulated contaminated soils. *Journal of hazardous materials*, 289, 210-218.
- Zdarta, J., Meyer, A. S., Jesionowski, T., y Pinelo, M. (2018). Developments in support materials for immobilization of oxidoreductases: A comprehensive review. *Advances in colloid and interface science*, 258, 1-20.
- Zhang, T., Xu, X.-L., Jin, Y.-N., Wu, J., y Xu, Z.-K. (2014). Immobilization of horseradish peroxidase (HRP) on polyimide nanofibers blending with carbon nanotubes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 106, 56-62.
- Zheng, R., Ren, Z., Gao, H., Zhang, A., y Bian, Z. (2018). Effects of calcination on silica phase transition in diatomite. *Journal of Alloys and Compounds*, 757, 364-371.
- Zucca, P., y Sanjust, E. (2014). Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: methods and mechanisms. *Molecules*, 19(9), 14139-14194.

Capítulo 7

Conclusiones finales

En la presente Tesis doctoral se desarrollaron biocatalizadores inmovilizados a base de una enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) para el tratamiento de efluentes líquidos industriales. En esta Sección se presentan las conclusiones obtenidas.

En el Capítulo 3 se estudiaron las características cinéticas y la posibilidad de reutilización de la peroxidasa libre para la oxidación del contaminante modelo Orange II con peróxido de hidrógeno a diferentes pHs (5 – 10). Se desarrolló una versión modificada del mecanismo clásico de Dunford para peroxidases, el cual representó adecuadamente la inhibición de la actividad enzimática por altas concentraciones de peróxido de hidrógeno (P), la dependencia de un sustrato en la actividad catalásica de la enzima (la descomposición de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno), la generación de PO y la dependencia de la cinética de decoloración de OII con la concentración inicial de P y S, y el pH. A partir de los resultados se concluyó que:

- La velocidad de decoloración de OII es función de la concentración inicial de OII, P y HRP, donde altas concentraciones de P inhiben fuertemente la enzima.
- A bajas concentraciones de P y pH 9-10, el consumo de P es principalmente para oxidar OII, mientras que a pH más bajos y altas concentraciones de P favorecen la actividad catalásica de la enzima. Además, en condiciones ácidas se obtiene una fuerte disminución de la velocidad inicial específica de decoloración.
- La enzima fue reutilizada con éxito durante seis ensayos consecutivos. Estos resultados permitieron validar el modelo cinético propuesto.

Por su parte, en el Capítulo 4 se emplearon medidas de ORP para monitorear en forma continua la oxidación enzimática de diferentes xenobióticos (OII, fenol, bisfenol A) con peróxido de hidrógeno en sistemas batch y fed-batch. Los resultados obtenidos demostraron que:

- Los valores de ORP aumentaron solo cuando ambos sustratos de la enzima (peróxido de hidrógeno y el sustrato reductor) estaban presentes en la mezcla de reacción.
- Para todos los contaminantes estudiados, cuando el ORP alcanzó un valor máximo, coincidió con el final de la reacción de oxidación, que pudo detectarse mediante la derivada de ORP en función del tiempo.
- En todos los casos, cuando se agregó peróxido de hidrógeno en exceso, se observó una disminución de los valores de ORP. Este comportamiento también se observó durante la oxidación de una mezcla de OII y BPA.
- El ORP es útil para controlar la adición de peróxido de hidrógeno durante la oxidación enzimática de OII, fenol y BPA.

Una vez estudiada la enzima en fase homogénea, en una segunda etapa del presente trabajo se realizaron estudios de inmovilización de la HRP sobre dos tipos de materiales (poliuretano y diatomitas). Se empleó la reacción de decoloración de orange II (OII) con peróxido de hidrógeno (P) para evaluar los biocatalizadores desarrollados.

En el Capítulo 5 se estudió la inmovilización de HRP sobre membranas nanofibras de poliuretano. Los resultados obtenidos demostraron que:

- Mediante la técnica de electrohilado se produjeron membranas de poliuretano con fibras continuas, lisas, sin perlas y distribuidas al azar. Estas nanofibras mantuvieron su integridad luego de tratamientos de funcionalización con hipoclorito de sodio y activación con alil glicidil éter, así como la inmovilización de la HRP y tres ciclos de oxidación de OII con P.
- Los resultados obtenidos de inmovilización demostraron que la enzima se inmovilizó por adsorción (ME) y unión covalente (MAE) a 20 y 40 °C.

- La técnica de Caracciolo y col (2017) fue adaptada con éxito para maximizar la carga de HRP inmovilizada mediante uniones covalente. Los resultados obtenidos indicaron que la carga de enzima inmovilizada fue notoriamente más alta cuando la funcionalización se realizó durante 95 min con hipoclorito de sodio, y cuando la síntesis de inmovilización fue a 40 °C, pH 8 durante 60 h.

Finalmente, en el Capítulo 6 se estudió la inmovilización de la peroxidasa sobre diatomitas con el propósito de enriquecer más el estudio en busca de definir protocolos exitosos para soportar la HRP, reutilizables y estables al almacenamiento. En esta etapa se concluyó que:

- La HRP se inmovilizó con éxito mediante adsorción (DE) y uniones covalentes (DSGE y DHSGE) a temperatura ambiente, pH 7 durante 24 h. El protocolo de inmovilización covalente propuesto por Gómez y col (2008) fue adaptado con éxito para aumentar la carga de enzima soportada por unión covalente (DSGE). Sin embargo, la hidrólisis superficial de las diatomitas no incrementó la carga de enzima inmovilizada (DHSGE).

- La caracterización por DRIFT, DRX, EDX y TGA del material soporte y los biocatalizadores inmovilizados sugirieron que la HRP se inmovilizó sobre la diatomita.

- Las reacciones de evaluación de DE, DSGE y DHSGE mostraron que la diatomita adsorbía el OII. Sin embargo, la HRP inmovilizada tenía actividad catalítica. A pesar de que se observó una disminución de actividad debido a la lixiviación de la enzima, la HRP soportada por unión covalente retuvo la actividad catalítica durante 12 h de oxidación de OII con P. Además, la técnica de inmovilización propuesta definió un protocolo exitoso para soportar enzimas estables al almacenamiento durante al menos un mes.

- Los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis representan un punto de inicio para la futura inmovilización de extractos de distintas enzimas con diversas aplicaciones industriales.

APÉNDICE A1

Monitoreo de la oxidación de compuestos xenobióticos con peróxido de hidrógeno en presencia de una peroxidasa de rábano picante mediante mediciones de ORP

A1.1. Espectros de absorción de OII, fenol y BPA

La Figura A1.1 muestra los espectros UV/Visible en presencia de las concentraciones mínimas de OII, BPA y fenol, y las máximas de peróxido de hidrógeno y HRP ensayadas en el presente trabajo. En el Capítulo 4, las absorbancias a 485 y 275 nm fueron consideradas para monitorear la concentración de OII y fenol o BPA, respectivamente. A esas longitudes de onda, la Figura A1.1 muestra que las absorbancias correspondientes al peróxido de hidrógeno y la HRP fueron despreciables en comparación con las correspondientes a OII, BPA o fenol, incluso en las condiciones experimentales más desfavorables.

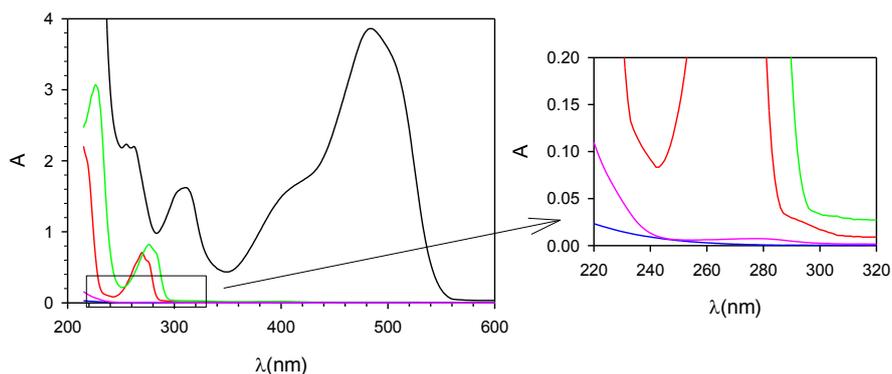


Figura A1.1. Espectros de absorción correspondientes a OII (0.2 mM, negro), BPA (0.25 mM, verde), fenol (0.5 mM, rojo), peróxido de hidrógeno (0.2 mM, azul) y HRP (30 mg/L, rosa)

A1.2. Cálculo del tiempo crítico (t_c) mediante la derivada del ORP en función del tiempo durante la oxidación de OII

Con base a los perfiles del ORP representados en la Figura 4.4 (Cap. 4), mediante un procedimiento numérico se obtuvo la derivada de ORP en función del tiempo. La Figura A1.2 muestra que a partir de la gráfica de $dORP/dt$ en función de t , el tiempo crítico (t_c) se puede detectar fácilmente.

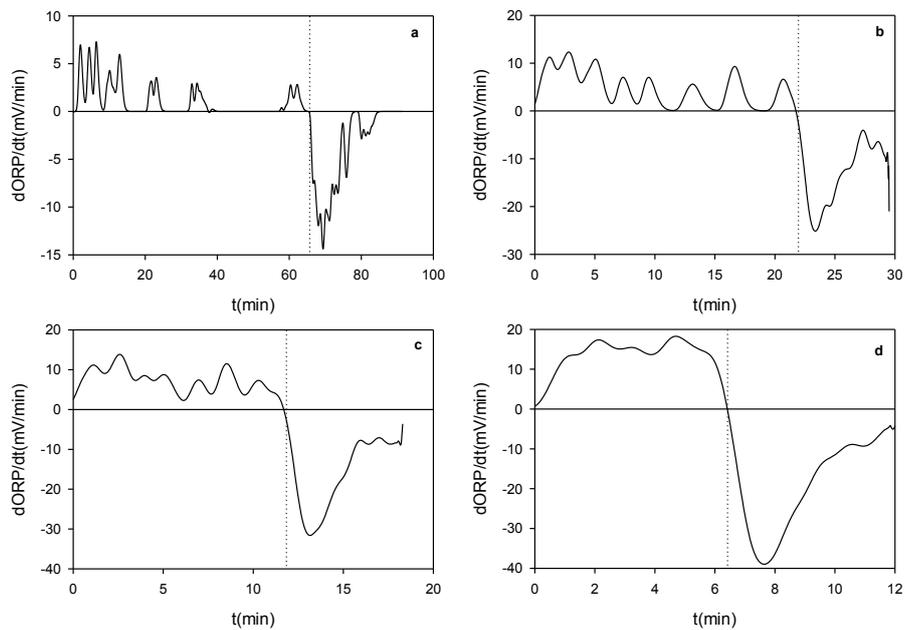


Figura A1.2 Evolución de $dORP/dt$ en función del tiempo durante la decoloración de soluciones de OII (0.19 mM) mediante la adición continua de peróxido de hidrógeno (1.8 mM). Los caudales empleados fueron (mL/min): a) 0.20, b) 0.65, c) 1.28, d) 2.37. Las líneas de puntos indican el tiempo crítico obtenido en cada caso (t_c).

A1.3. Eficiencia de consumo de peróxido de hidrógeno ($Y_{S/P}$)

En el Capítulo 3 (Morales Urrea y col., 2018) se demostró que a pH constante, las velocidades de consumo de sustrato (v_s) y peróxido de hidrógeno (v_p) se pueden representar mediante las siguientes expresiones:

$$v_s = 2k_c E_T \left(\frac{K_S K_P [S][P]}{1 + K_P [P] + K_P K_I [P]^2 + K_S K_P [S][P]} \right) \quad (A1.1)$$

$$v_p = \left(\frac{1}{2} + \alpha [P] \right) v_s \quad (A1.2)$$

donde $[S]$, $[P]$, y E_T son las concentraciones de sustrato reductor (e.j., OII, fenol, BPA), peróxido de hidrógeno y enzima, respectivamente. De acuerdo con este modelo, la eficiencia del peróxido de hidrógeno para oxidar el sustrato ($Y_{S/P}$) es:

$$Y_{S/P} = \frac{v_s}{v_p} = \frac{2}{1 + 2\alpha [P]} \quad (A1.3)$$

donde α es una constante que depende del pH. Nótese que cuanto más alto es $Y_{S/P}$, esto indica que más moléculas de S son consumidas por cada molécula de P utilizada. Por esta razón, $Y_{S/P}$ representa la eficiencia del peróxido de hidrógeno para oxidar el sustrato. Es evidente de la ec. A1.3 que como $[P]$ está en el denominador, debe mantenerse lo más bajo posible para maximizar $Y_{S/P}$.

Por otro lado, las ecuaciones correspondientes al balance de masa para S, P, and E_T en un sistema de alimentación de tipo fed-batch son las siguientes:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{Q_{in}}{V} S - v_s \quad (A1.4)$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{Q_{in}}{V} (P_{in} - P) - v_p \quad (A1.5)$$

$$\frac{dE_T}{dt} = -\frac{Q_{in}}{V} E_T \quad (A1.6)$$

$$\frac{dV}{dt} = Q_{in} - Q_{Samp} \approx 0 \quad (A1.7)$$

donde Q_{in} es el caudal de entrada de la solución stock de peróxido de hidrógeno de concentración P_{in} , y Q_{Samp} es el caudal de muestreo. Debido a que en los experimentos llevados a cabo se realizaron de tal forma que $Q_{in} \approx Q_{Samp}$, entonces se puede asumir que V es prácticamente constante en función del tiempo. Además, las condiciones de operación fueron seleccionadas para mantener lo más bajo posible la concentración de peróxido de hidrógeno, de esta manera se puede asumir que $P \ll P_{in}$. Finalmente, asumiendo un estado pseudo-estacionario para P ($dP/dt \approx 0$) y combinando con las ecuaciones A1.1, A1.2, y A1.5, se obtuvo la siguiente expresión:

$$\frac{Q_{in} P_{in}}{V} \approx vp = \left(\frac{1}{2} + \alpha[P] \right) 2k_c E_T \left(\frac{K_S K_P [S][P]}{1 + K_P [P] + K_P K_I [P]^2 + K_S K_P [S][P]} \right) \quad (A1.8)$$

Debido a que se seleccionaron las condiciones de operación de tal forma que las concentraciones de P fueran muy bajas, entonces se puede asumir que $K_P K_I [P]^2 \ll K_P [P]$ y $\alpha[P] \ll \frac{1}{2}$. Entonces, la concentración de P en estado pseudo-estacionario (P_{SS}) se puede obtener a partir de la ecuación A1.8:

$$P_{SS} \approx \frac{Q_{in} P_{in}}{K_P [V k_c E_T K_S [S] - Q_{in} P_{in} (1 + K_S [S])]} \quad (A1.9)$$

Nótese que el denominador es una diferencia entre dos términos. Así, para cualquier valor de E_T y $[S]$, a medida que se incrementa Q_{in} el denominador de la ecuación A1.9 tiende a cero y por lo tanto, P_{SS} tiende a infinito. A partir de la ec. A1.9, el valor máximo de Q_{in} (Q_{max}) tal que se puede alcanzar en el estado pseudo-estacionario es:

$$Q_{max} = \frac{V k_c E_T K_S [S]}{P_{in}(1+K_S[S])} \quad (A1.10)$$

Combinando las ecuaciones A1.9 y A1.10

$$P_{SS} \approx \frac{f}{K_P(1+K_S[S])[1-f]} \quad (A1.11)$$

donde $f = Q_{in}/Q_{max} < 1$. La ecuación A1.11 demuestra que independientemente de los valores de K_S y K_P , el valor de P_{SS} aumenta en función de Q_{in} . Por lo tanto, considerando la ecuación A1.3, la eficiencia del peróxido de hidrógeno para oxidar el sustrato ($Y_{S/P}$) disminuirá conforme aumenta Q_{in} . Esta tendencia se puede observar en los resultados de la Tabla 4.1 (Cap. 4).

Por otro lado, combinando las ecs. A1.3, A1.4 y A1.8, y asumiendo estado pseudo-estacionario para P, se obtiene

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{Q_{in}}{V} \left(S + \frac{2P_{in}}{1+2\alpha P_{SS}} \right) \quad (A1.12)$$

Si bajo las condiciones ensayadas se cumple que $S \ll \frac{2P_{in}}{1+2\alpha P_{SS}}$, entonces:

$$\frac{dS}{dt} \approx -\frac{Q_{in}}{V} \left(\frac{2P_{in}}{1+2\alpha P_{SS}} \right) = -\frac{Q_{in} P_{in}}{V} Y_{S/P} \quad (A1.13)$$

donde $Y_{S/P}$ está dado por la ecuación A1.3. Asumiendo que $Y_{S/P}$ es aproximadamente constante, de acuerdo a la ecuación A1.13, si se mantienen constantes los valores de P_{in} y Q_{in} , la concentración de sustrato debería disminuir de forma lineal en función del tiempo, tal

como se muestra en la Figura 4.4. Por lo tanto, todas las suposiciones realizadas en el presente Apéndice son consistentes con la evidencia experimental. Así, integrando la ecuación A1.13 se obtiene lo siguiente

$$S = S_0 - \frac{Q_{in}P_{in}}{V} Y_S t \quad (A1.14)$$

Por definición, el tiempo crítico (t_C) es el tiempo del ensayo para el cual la concentración de sustrato es cero. Entonces, si se conoce t_C , $Y_{S/P}$ puede ser calculado como:

$$Y_{S/P} = \frac{VS_0}{Q_{in}P_{in}t_C} \quad (A1.15)$$

A1.4 Determinación de la derivada de ORP en función del tiempo durante la oxidación de OII, fenol y BPA

A partir de los perfiles de ORP representados en la Figura 4.5, se obtuvo la derivada de ORP en función del tiempo mediante un procedimiento numérico. Luego, el tiempo crítico (t_c) se obtuvo como el tiempo en el cual $d\text{ORP}/dt = 0$.

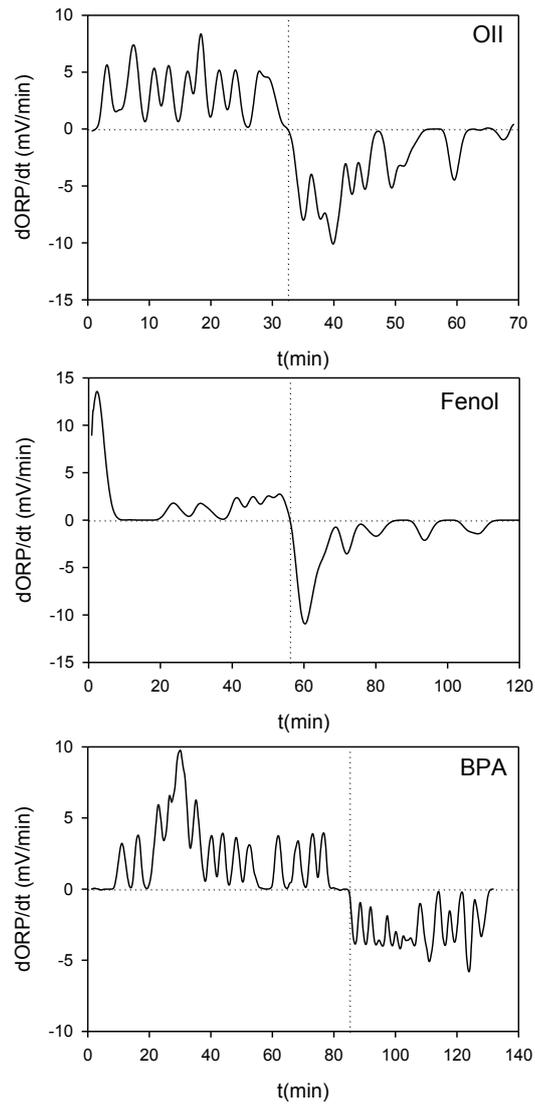


Figura A1.3 Evolución de $d\text{ORP}/dt$ en función del tiempo durante la oxidación de OII, fenol y BPA. Las líneas punteadas verticales indican el tiempo crítico (t_c).

APÉNDICE A2

Inmovilización de la enzima peroxidasa sobre membranas nanofibras de poliuretano

A2.1. Análisis estadístico del diámetro de las nanofibras de las membranas de poliuretano

Con el objeto de determinar el tipo de distribución del diámetro de las fibras que forman las membranas de poliuretano, se realizó un gráfico de probabilidad acumulada del diámetro de fibras (d) en escala lineal (Fig. A2.1a) y logarítmica (Fig. A2.1b) correspondientes a la muestra ME (Fig. 5.5f). La Figura A2.1 indica que el diámetro de las fibras tiene una distribución log-normal. La misma conclusión se obtuvo para todas las muestras estudiadas.

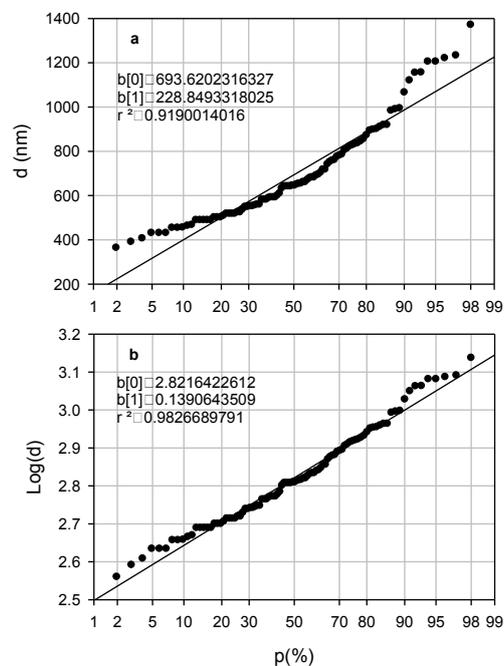


Figura A2.1. Probabilidad acumulada del diámetro (d , nm) de las fibras (a), y del logaritmo de d (b) correspondiente a la muestra ME.

Se calculó la media y el desvío estándar (SD) para Log(d) en todas las muestras. La Tabla A2.1 sugiere que no hay grandes diferencias entre las medias de Log(d) correspondientes de las muestras m1 a m10. Para verificar esto, se realizó un test de diferencia de medias para datos desapareados, con el objeto de comparar las muestras m1 a m10 (Tabla A2.2). Debe tenerse en cuenta que dicho test asume una distribución normal de la variable en estudio, lo que se cumple para Log(d) pero no para d (Fig. A2.1). Los resultados de la Tabla A2.2 muestran que en algunos casos las diferencias de medias fueron significativas (ej., m2-m7), mientras que en otros no (ej., m2-m8).

Tabla A2.1. Valores de la media y el desvío estándar (SD) para Log(d) calculados a partir del diámetro de las nanofibras de membranas electrohiladas con la HRP inmovilizada y luego de 3 usos en la decoloración de OII con P

| t_f (min) | Muestra | Sin HRP | | Muestra | Con HRP y 3 usos | |
|-------------|---------|---------|--------|---------|------------------|--------|
| | | Media | SD | | Media | SD |
| 0 | m1 | 2.8616 | 0.1326 | m2 | 2.8214 | 0.1382 |
| 35 | m3 | 2.9129 | 0.2071 | m4 | 2.8964 | 0.2088 |
| 95 | m5 | 2.8884 | 0.1955 | m6 | 2.8935 | 0.1967 |
| 155 | m7 | 2.9157 | 0.1614 | m8 | 2.8208 | 0.1936 |
| 215 | m9 | 2.8307 | 0.1886 | m10 | 2.8243 | 0.1682 |

t_f : Tiempo de funcionalización de la membrana. SD: Desviación estándar

Tabla A2.2. Test de diferencia de medias (t de *Student* para datos desapareados) de los valores de la media de diámetros de las fibras de las membranas antes y después de la funcionalización e inmovilización de la peroxidasa (Tabla A2.1)

| P | m1 | m2 | m3 | m4 | m5 | m6 | m7 | m8 | m9 |
|-----|-------|---------|---------|--------|--------|--------|---------|--------|-------|
| m2 | 0.037 | -- | | | | | | | |
| m3 | 0.038 | 0.0003 | -- | | | | | | |
| m4 | 0.160 | 0.0030 | 0.5759 | -- | | | | | |
| m5 | 0.257 | 0.0056 | 0.3900 | 0.7785 | -- | | | | |
| m6 | 0.180 | 0.0030 | 0.4971 | 0.9180 | 0.8543 | -- | | | |
| m7 | 0.010 | 0.00001 | 0.9155 | 0.4662 | 0.2824 | 0.3835 | -- | | |
| m8 | 0.083 | 0.9812 | 0.00135 | 0.0085 | 0.0149 | 0.0091 | 0.00021 | -- | |
| m9 | 0.182 | 0.6889 | 0.00374 | 0.0205 | 0.0351 | 0.0224 | 0.00075 | 0.7135 | -- |
| m10 | 0.083 | 0.8926 | 0.00106 | 0.0077 | 0.0138 | 0.0081 | 0.00012 | 0.8915 | 0.799 |

P: la probabilidad de que sea incorrecto afirmar que las dos medias son diferentes. $P < 0.05$

indica que las medias son diferentes (amarillo)

En la Figura A2.2 se grafican las distribuciones acumulativas correspondientes a m2, m7 y m8. Como puede observarse, el valor de Log(d) para $p = 50\%$, correspondiente a m2 y m8, son similares, mientras que para m7, es levemente superior. De acuerdo a la Tabla A2.2, la diferencia entre las medias correspondientes a m2 y m8 comparadas con m7 son estadísticamente significativas. En la Figura A2.3 se muestra la distribución acumulada de los 1000 datos disponibles (Fig. A2.3a) y el histograma correspondiente (Fig. A2.3b). Como puede observarse, con 1000 puntos se obtiene una adecuada definición de la función de distribución, donde además se nota claramente que la distribución corresponde al tipo log-normal.

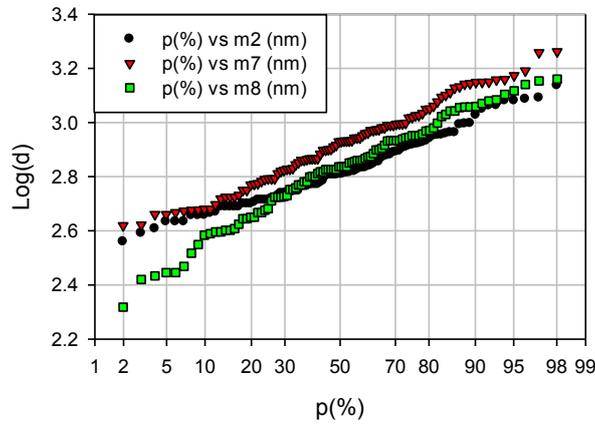


Figura A2.2. Ejemplos de distribuciones acumulativas correspondientes a m2, m7 y m8.

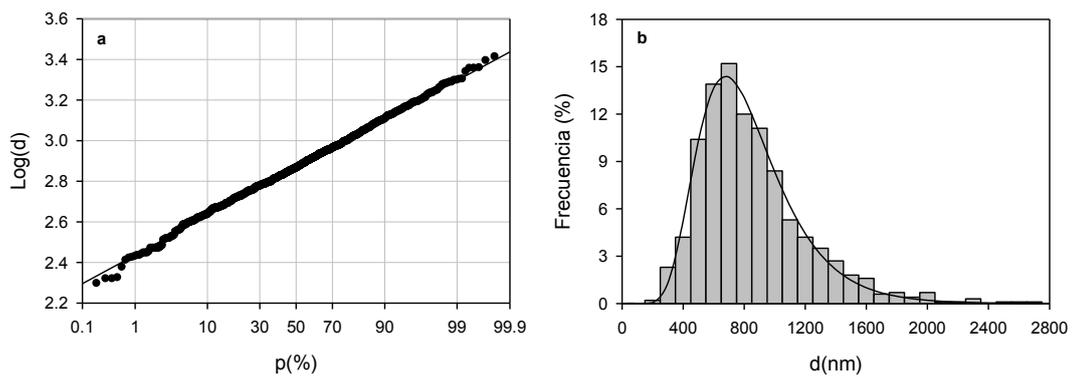


Figura A2.3. Distribución acumulada de los 1000 datos disponibles de diámetro de las membranas antes y después de la funcionalización e inmovilización de la peroxidasa (a) y el histograma correspondiente (b).

Estos resultados indican que los procedimientos de funcionalización y activación de las membranas en términos generales no afectaron la integridad de las fibras, incluso después de la inmovilización de la HRP y luego de tres ciclos de oxidación de OII con peróxido de hidrógeno.