

HUMANIDADES, CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN EN PUEBLA

ACADEMIA JOURNALS



OPUS PRO SCIENTIA ET STUDIUM

ISSN 2644-0903 online

VOL. 2, NO. 1, 2020

WWW.ACADEMIAJOURNALS.COM

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN AUSPICIADO POR EL CONVENIO CONCYTEP-ACADEMIA JOURNALS



KARLA YARELI GUERRERO MUÑOZ

INMOVILIZACIÓN DE UNA CLOROPEROXIDASA EN ARCILLAS MODIFICADAS CON TiO_2 Y ZrO_2 Y
SU EFECTO EN LA DEGRADACIÓN DE SULFAMETOXAZOL

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

DIRECTORA: DRA. CYNTHIA ROMERO GUIDO
PRESIDENTE: DR. EDUARDO TORRES RAMÍREZ
SECRETARIO: DRA. CYNTHIA ROMERO GUIDO
VOCAL: DRA. GEORGETTE REBOLLAR P EREZ

NÚMERO DE SECUENCIA 2-4

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

INMOVILIZACIÓN DE UNA CLOROPEROXIDASA EN ARCILLAS MODIFICADAS CON TiO_2 Y ZrO_2 Y SU EFECTO EN LA DEGRADACIÓN DE SULFAMETOXAZOL

TESIS

Que para obtener el título de:

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

Karla Yareli Guerrero Muñoz

DIRECTORA

Dra. Cynthia Romero Guido

Los integrantes del Honorable jurado de Examen Profesional:

Presidente Dr. Eduardo Torres Ramírez

Secretario Dra. Cynthia Romero Guido

Vocal Dra. Georgette Rebollar Perez

Aprobada el 17 de septiembre de 2019

Resumen

Inmovilización de una cloroperoxidasa en arcillas modificadas con TiO_2 y ZrO_2 y su efecto en la degradación de sulfametoxazol

Karla Yareli Guerrero Muñoz

El sulfametoxazol es considerado un contaminante emergente que representa un problema para el ambiente y para la salud humana. Para remediar los diversos problemas causados por la presencia de antibióticos en el ambiente, y específicamente del sulfametoxazol en ambientes acuáticos, es urgente emplear métodos de remoción efectivos, accesibles y ambientalmente respetuosos. Una alternativa atractiva por cumplir con estos requisitos son los procesos catalizados por enzimas, que cada día son más numerosos debido a que presentan ventajas sobre los tratamientos convencionales, aunque también presentan inconvenientes, entre los cuales destaca su baja estabilidad operacional, causando que este tipo de procesos biotecnológicos no sea rentable. Sin embargo, con la inmovilización en soportes orgánicos, inorgánicos o híbridos se ha podido superar estos inconvenientes. El objetivo de este proyecto es la degradación eficiente del sulfametoxazol mediante un proceso biotecnológico basado en la degradación enzimática utilizando a la cloroperoxidasa inmovilizada en soportes inorgánicos.

En este proyecto, se ensayó la degradación del sulfametoxazol mediante una cloroperoxidasa proveniente del hongo *Caldariomyces fumago*, inmovilizada en arcillas esmécticas modificadas con óxido de titanio (TiO_2) y óxido de circonio (ZrO_2), ya que las arcillas naturales y sus diversas presentaciones modificadas han demostrado ser buenos catalizadores de varias reacciones químicas. Se evaluó la capacidad de la cloroperoxidasa de degradar el sulfametoxazol en diferentes condiciones de pH y temperatura, tanto en su forma libre como inmovilizada en ambas arcillas, mediante técnicas de espectroscopia de fluorescencia y se encontró que la inmovilización no afecta el pH o la temperatura óptima de la enzima inmovilizada. Sin embargo, le confiere estabilidad ante el efecto temperaturas altas.

Además, se realizaron ensayos en los que se reutilizó la cloroperoxidasa libre e inmovilizada para evaluar si la inmovilización prolonga la vida útil de la enzima y se encontró que el resultado es diferente en cada soporte. El soporte que mostró mejores resultados fue la arcilla modificada con óxido de circonio, siendo posible reutilizar la enzima inmovilizada en este soporte hasta por 6 ciclos.

Índice

<i>Resumen</i>	2
<i>Introducción</i>	6
<i>Justificación</i>	9
<i>Marco teórico</i>	10
Contaminantes emergentes.....	10
Fármacos	11
Antibióticos	12
Sulfametoxazol.....	12
Biorremediación.....	14
Procesos catalizados por enzimas.....	15
Enzimas.....	15
Peroxidasas	16
Cloroperoxidasa	16
Degradación de sulfametoxazol por cloroperoxidasa.....	17
Inmovilización enzimática	19
Métodos de inmovilización	21
Soportes	22
Arcillas	23
Arcillas modificadas.....	23
Arcillas K10 modificadas.....	24
Peroxidasas inmovilizadas.....	24
<i>Objetivos</i>	26
General:.....	26
Específicos	26
<i>Hipótesis</i>	26
<i>Metodología</i>	27
1. Inmovilización enzimática	27
1.1 Porcentaje de inmovilización	27
2. Curva de calibración de sulfametoxazol.....	28
3. Estandarización de las condiciones de reacción	28

4. Ensayos de degradación de sulfametoxazol	29
5. Ensayos control	30
6. Ensayos de estabilidad enzimática a diferentes condiciones de pH y temperatura.....	31
7. Reutilización de la enzima	31
Resultados	33
1. Inmovilización enzimática	33
2. Curva de calibración	33
3. Estandarización de las condiciones de reacción	34
4. Determinación de la constante de reacción de la enzima libre e inmovilizada.....	35
5.-Análisis del efecto de la inmovilización enzimática en la estabilidad de la cloroperoxidasa. ..	38
5.1.- <i>Análisis de la estabilidad enzimática ante cambios de temperatura</i>	39
5.2.- <i>Análisis de la estabilidad enzimática ante cambios de pH</i>	44
7. Ciclos de reutilización de la enzima	45
Discusión de resultados	48
Inmovilización enzimática	48
Estandarización de las condiciones de reacción	49
Actividad enzimática de la cloroperoxidasa en su forma libre e inmovilizada	49
Efecto del pH y la temperatura en la actividad de la cloroperoxidasa en su forma libre e inmovilizada	51
Reutilización de la enzima.....	54
Conclusión.....	56
Anexos	57
Anexo 1.....	57
Bibliografía	59

Introducción

La conservación de los recursos naturales es actualmente una necesidad para la sociedad, sin un manejo adecuado de éstos, los ecosistemas se ven afectados y la vida en la Tierra comprometida. Por esta razón en las últimas décadas ha aumentado la preocupación por la contaminación ambiental, reconocido como un problema a escala global, el cual adquiere cada vez mayor importancia debido principalmente a que afecta directa e indirectamente a los ecosistemas y a la salud humana. Como consecuencia, en todo el mundo se han establecido y mejorado protocolos (leyes, normas o reglamentos) para la protección del ambiente. Sin embargo, existen sustancias de distinto origen y naturaleza química derivadas de las actividades humanas que no están reguladas en estos protocolos y que tienen un efecto negativo en el ambiente, por lo que, en los últimos años han cobrado importancia y son denominados “contaminantes emergentes”.

Entre las características más relevantes de los contaminantes emergentes se puede mencionar que su introducción en el ambiente es continua, no están regulados en las normas y pueden causar efectos adversos a muy bajas concentraciones, además los tratamientos convencionales de eliminación de contaminantes no resultan efectivos. Entre estos contaminantes destacan: plaguicidas, fármacos, surfactantes, aditivos y productos de cuidado personal. Estos contaminantes y sus metabolitos se han encontrado en diversos entornos acuáticos de todo el mundo (NORMAN, 2016). En México durante las últimas décadas se han encontrado contaminantes emergentes en aguas superficiales (Robledo et al., 2017).

Uno de los grupos representantes de estos contaminantes son los fármacos, que incluyen varias clases de productos químicos usados para tratar enfermedades humanas y animales, y mejorar la calidad de vida. De entre estos productos, el caso particular de los antibióticos ha adquirido importancia, debido a su uso elevado e incontrolado y a que su presencia en el ambiente conlleva a un aumento en la resistencia antibiótica de las comunidades bacterianas, la cual es una de las

principales preocupaciones debido a que en los últimos años las tasas de resistencia a antibióticos han aumentado y como consecuencia se ha dificultado el tratamiento de diversas enfermedades (Benavides-Plascencia et al., 2005). Por lo anterior, la eliminación de antibióticos es de suma importancia para la salud pública y la conservación del ambiente. El problema de la resistencia a antibióticos en México ha sido estudiado y se han detectado varias cepas resistentes a diferentes antibióticos, uno de ellos es el sulfametoxazol (Benavides-Plascencia et al., 2005). Por sus características, este antibiótico es considerado prioritario para ser eliminado de los diversos compartimentos ambientales tanto en México (CONAGUA, 2015) como en el mundo (NORMAN, 2016).

El sulfametoxazol es un antibiótico bacteriostático perteneciente a la familia de las sulfonamidas, después de los antibióticos β -lactámicos, las sulfonamidas son el grupo de antibióticos más utilizado en la mayoría de los países (Larcher & Yargeau, 2012) y es descargado continuamente en ambientes acuáticos. Es un contaminante recalcitrante, comúnmente presente en cuerpos de agua, su persistencia en ambientes acuáticos es causada por sus propiedades fisicoquímicas, específicamente su hidrosolubilidad. Las concentraciones en las que se ha encontrado este compuesto en aguas superficiales y residuales son suficientes para tener un efecto mutagénico y fitotóxico, además de reducir la actividad y diversidad microbiana (Herzog et al., 2010; Larcher & Yargeau 2012). Además de los efectos negativos en el ambiente, recientemente se han reportado casos de resistencia al sulfametoxazol en bacterias patógenas humanas y animales.

Para remediar los diversos problemas causados por la presencia de antibióticos en el ambiente, y específicamente del sulfametoxazol en ambientes acuáticos, es urgente emplear métodos de remoción efectivos, accesibles y ambientalmente respetuosos. Una alternativa atractiva por cumplir con estos requisitos es la degradación enzimática. Los procesos catalizados por enzimas son cada día más numerosos debido a que presentan ventajas sobre los tratamientos convencionales entre los cuales se puede mencionar especificidad de sustrato y gran actividad

catalítica, además de ser una alternativa amigable con el ambiente en comparación con los procesos de oxidación avanzada (AOP), que se emplean comúnmente en la degradación de sulfametoxazol.

Entre los inconvenientes que las enzimas presentan en un proceso de biorremediación es que carecen de estabilidad, aunado a eso, su separación después de la biocatálisis es complicada debido a su solubilidad, por lo que no se pueden reutilizar, causando que este tipo de procesos biotecnológicos no sean rentables. Sin embargo, la inmovilización de enzimas en soportes sólidos ha permitido superar estos inconvenientes. La inmovilización de enzimas es un proceso que da lugar a formas insolubles que mantienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente (Gaffney et al., 2012).

En el presente trabajo se planteó ensayar la oxidación de sulfametoxazol mediante la cloroperoxidasa del hongo *Caldariomyces fumago*. Con el propósito de incrementar la estabilidad enzimática y la capacidad de reutilización de la cloroperoxidasa, esta enzima fue inmovilizada en arcillas esmécticas (K10) modificadas con óxido de titanio (TiO_2) y óxido de circonio (ZrO_2), proporcionadas por el Dr. Gustavo Rangel Porras de la Universidad de Guanajuato, ya que estas arcillas tanto en sus formas naturales como en sus diversas presentaciones modificadas han demostrado ser buenos catalizadores sólidos de varias reacciones químicas. En el presente trabajo, se ensayó la capacidad de la cloroperoxidasa libre e inmovilizada para oxidar sulfametoxazol en diferentes condiciones de pH y temperatura y después de varios ciclos de reutilización.

Justificación

Por sus efectos negativos para el ambiente y la salud humana, la contaminación por antibióticos es un problema prioritario en la actualidad. Debido a que el sulfametoxazol es uno de los representantes de este grupo, diversos procesos de degradación tanto físicos, como químicos y biológicos han sido estudiados y mejorados con el propósito de eliminarlo; no obstante, estos procesos tienen un costo muy elevado y en algunos casos, dichos procesos pueden generar productos tan o incluso más dañinos que los compuestos originales. Por lo tanto, es necesario implementar y mejorar procesos biotecnológicos de degradación que sean de bajo costo, escaso consumo de energía, fácil manejo y amigables con el ambiente.

Con este enfoque, los microorganismos y sus metabolitos son clave para transformar los contaminantes, sin embargo, el uso directo de los microorganismos resulta complicado por requerirse una cantidad considerable de biomasa, largos tiempos de reacción y suministros constantes de nutrientes y de aireación. Además, la actividad antibiótica del sulfametoxazol podría inhibir el crecimiento de los microorganismos empleados para degradarlo. Debido a esto, la tecnología basada en enzimas específicas es una herramienta prometedora. A pesar de su elevada especificidad y seguridad ambiental las enzimas no son ampliamente utilizadas por los diversos inconvenientes que surgen de su implementación en un proceso. Sin embargo, con la inmovilización enzimática se han podido superar estos inconvenientes, convirtiendo a la inmovilización enzimática en una tecnología ideal para la degradación de sulfametoxazol, por lo cual el objetivo de este trabajo es evaluar cómo esta alternativa biotecnológica se ve afectada por el proceso de inmovilización y su posterior evaluación a diversas condiciones de pH y temperatura.

Marco teórico

Contaminantes emergentes

En los últimos años la investigación sobre los posibles efectos adversos de sustancias químicas sintéticas producidas por industrias y utilizadas ampliamente por la población mundial ha cobrado importancia (Bilal et al., 2017). Algunos ejemplos de estas sustancias químicas sintéticas son fármacos, ingredientes de los productos de cuidado personal, aditivos, surfactantes, antisépticos, pesticidas, retardadores de llama y hormonas (Herrera 2016; Chopra & Kumar 2018) entre otros. Estas sustancias corresponden a los contaminantes denominados “emergentes” o “de interés emergente”, conceptos que generalmente se usan para referirse a compuestos químicos no regulados y que tienen el potencial de causar un efecto negativo en el ambiente. Se ha detectado la incidencia de estos compuestos y sus metabolitos en diversos compartimentos ambientales por lo que están dejando de pasar inadvertidos, como consecuencia actualmente se ha aumentado la investigación enfocada a mejorar métodos analíticos para su detección (Berlioz-Barbier et al., 2014). Sin embargo, aún no hay datos suficientes para evaluar el riesgo que estos compuestos representan para los ecosistemas, y *“de las más de 100 millones de sustancias químicas registradas actualmente en las bases de datos mundiales, sólo un 0.03% están reguladas”* (Castro-Pastrana et al., 2015).

Entre las características más relevantes de estos contaminantes se puede mencionar que su introducción en el ambiente es continua y pueden causar efectos adversos, como por ejemplo disrupción endocrina, inmunotoxicidad y carcinogénesis (Sánchez & Egea 2018) en muy bajas concentraciones, esto puede ocurrir de forma aguda o crónica, afectando la salud humana y los ecosistemas. No obstante, los tratamientos de desechos sólidos o aguas residuales convencionales no están diseñados para eliminarlos (Chun et al., 2014) por lo que se requieren alternativas eficientes, económicas y con el mínimo impacto ambiental.

Fármacos

Los fármacos incluyen varias clases de productos químicos orgánicos que de forma general se usan para tratar enfermedades humanas y animales, y mejorar la calidad de vida. Sin embargo, el elevado uso de estos productos y su eliminación inadecuada ha causado que, en los últimos años los fármacos y sus metabolitos se hayan acumulado y encontrado a niveles traza en aguas residuales, ríos, aguas subterráneas y algunos suelos alrededor del mundo (Figura 1) e incluso se han encontrado en agua potable (Hussain et al., 2015).

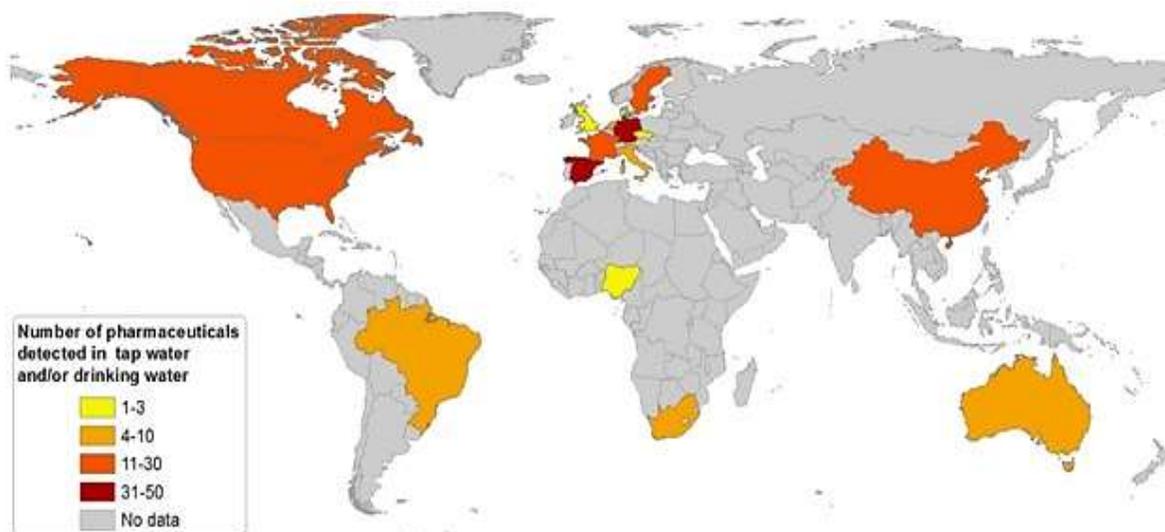


Figura 1. Número de fármacos detectados en aguas superficiales, aguas subterráneas, de grifo o para beber. Tomado de T. Beek et al., (2016)

El agua pasa por una serie de etapas para estar en constante circulación y transformación, este proceso es denominado ciclo del agua y la principal vía de entrada de los contaminantes a este ciclo son las aguas residuales (Giraldo et al., 2004). Los productos farmacéuticos no son la excepción, las principales vías mediante las cuales estos compuestos químicos ingresan al ambiente son las aguas residuales tanto de áreas urbanas como de áreas industriales (Varjani & Chaithanya, 2018). En la base de datos NORMAN se ha reportado la presencia de productos farmacéuticos principalmente en aguas superficiales (47% del total de entradas de la base de datos) y aguas residuales (40% del total de entradas

de la base de datos), y en 71 países alrededor del mundo, al menos una sustancia farmacéutica fue reportada fuera del límite permisible (NORMAN 2016)

Antibióticos

El caso particular de los antibióticos como contaminantes emergentes ha adquirido importancia, debido a su elevado e incontrolado uso, y a que su presencia en el ambiente conlleva a aumentar la resistencia bacteriana a los antibióticos (Oh et al., 2017; Yan et al., 2012). Adicionalmente modifican la diversidad de las comunidades bacterianas alterando así sus funciones naturales, un ejemplo de esto se presenta en los procesos de recambio de nitrógeno, que se ven negativamente influenciados en presencia de antibióticos, exceptuando la nitrificación (Kotzerke et al., 2008).

Los antibióticos liberados al ambiente y las condiciones en las plantas de tratamiento de aguas residuales proporcionan condiciones óptimas para el desarrollo de bacterias resistentes a antibióticos y para la transferencia de genes de resistencia a antibióticos, aumentando así la resistencia a múltiples fármacos en las comunidades bacterianas (Nnadozie et al., 2017).

Sulfametoxazol

El sulfametoxazol (4-amino- N- (5-metilisoxazol-3-il) -bencenosulfonamida es un antibiótico bacteriostático perteneciente a la familia de las sulfonamidas (Sági et al., 2014), su mecanismo de acción consiste en inhibir competitivamente la enzima dihidropteroato sintasa (DHPS), por ser análogos estructurales del p-aminobenzoico (PABA), enzima clave en la ruta biosintética del folato (Miert et al., 1994). Una de las principales reacciones dependientes del folato es la síntesis de purinas por lo tanto al bloquear la síntesis de este compuesto se logra inhibir la división celular y asimismo el crecimiento bacteriano (Matthews, 1996). Después de los antibióticos β -lactámicos, las sulfonamidas son el grupo más utilizado de

antibióticos en la mayoría de los países (Larcher & Yargeau, 2012). Es popularmente prescrito y consumido para tratar infecciones bacterianas en vías urinarias y bronquios en humanos, además de que es usado en acuicultura y ganadería, en este último caso incluso es comúnmente usado como suplemento alimenticio (Fang-fang et al., 2012; Sági et al., 2014) todo esto causa que el sulfametoxazol sea descargado continuamente en ambientes acuáticos.

El sulfametoxazol es un contaminante acuoso recalcitrante, su amplia presencia en ambientes acuáticos es causada por sus propiedades fisicoquímicas, específicamente su hidrosolubilidad (Dirany et al., 2011). Este tipo de compuestos no son eliminados de las aguas residuales tratadas mediante las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR), además su presencia podría reducir la actividad microbiana en los lodos activados de las PTAR, y por tanto su eliminación mediante este tratamiento biológico se ve impedida y como consecuencia el sulfametoxazol se ha encontrado en aguas residuales, superficiales y potables (Bartelt-hunt et al., 2009; Benotti et al., 2009). Las concentraciones en las que se ha encontrado este compuesto en aguas residuales (1.25 mg/L) (Choubert et al., 2009) son suficientes para tener un efecto mutagénico y fitotóxico en algunas algas, pulgas de agua, crustáceos y bacterias (Isidori et al., 2005), además de reducir la actividad y la diversidad microbiana (Larcher & Yargeau 2012; Miert et al., 1994). Aunado a dichos efectos negativos en el ambiente, recientemente se han reportado casos de resistencia al sulfametoxazol en bacterias patógenas que comúnmente causan enfermedades en seres humanos y animales como *Escherichia coli*, (Luo et al., 2016; Zhang et al., 2015; Meguenni et al., 2015) *Staphylococcus aureus*, (Coelho et al., 2017) y *Salmonella spp* (Souto et al., 2017) en diversas partes del mundo, incluyendo México (Ramírez-Castillo et al., 2018). Estas bacterias han desarrollado mecanismos de resistencia a sulfonamidas basados en cambios cromosómicos o plasmídicos, en el caso de los cromosómicos hay mutaciones en el gen *poIP*, que codifica para la enzima dihidropteroato sintetasa, dando como resultado una menor afinidad entre la enzima blanco y el antibiótico. En el caso de los plasmídicos, se incorporan los genes *sul* que codifican enzimas alternativas que no se ven afectadas

por las sulfonamidas (Trobos et al., 2009). Como consecuencia, el tratamiento de diversas enfermedades que afectan seres humanos y animales se ha complicado.

Diversas tecnologías se han estudiado y mejorado con la finalidad de eliminar este antibiótico del ambiente, principalmente procesos de oxidación avanzada (AOP) como ozonización, ozono-peróxido de hidrógeno, electro-Fenton, Fenton y procesos fotocatalíticos (González et al., 2007; Beltrán et al., 2009; Lin et al., 2009; Nasuhoglu et al., 2011). Sin embargo, estos procesos tienen desventajas por requerir una gran cantidad de energía o compuestos químicos, lo que tiene como consecuencia un elevado costo. Los tratamientos biológicos surgen como una alternativa por su bajo costo, menor consumo de energía, fácil manejo y seguridad ambiental (Kılıç et al., 2016).

Biorremediación

Ciertos organismos como plantas, hongos y bacterias pueden utilizar contaminantes como fuentes de carbono o aceptores de electrones, esto se consigue a través de los procesos metabólicos que llevan a cabo, ya que poseen ciertas enzimas y vías metabólicas que permiten degradar o mineralizar contaminantes, ese es el principio de la biorremediación (Hawumba et al., 2010), que se define como el proceso mediante el cual se realiza la eliminación o degradación de contaminantes del ambiente mediante el uso de sistemas biológicos o sus derivados (Yesilada, et al., 2018), su aplicación como tecnología surge por la necesidad de remediar los daños ambientales causados por la contaminación (Cepoi & Zinicovscaia, 2016). Estos procesos se presentan como una tecnología prometedora por tener ventajas sobre las tecnologías tradicionales como lo son la reducción de los costos, una menor intrusión en el lugar contaminado y que los productos derivados del contaminante suelen ser menos tóxicos (Bour, 2016).

Los microorganismos son clave para transformar los contaminantes, sin embargo el uso directo de los microorganismos resulta complicado por requerir una cantidad considerable de biomasa, largos tiempos de reacción para alcanzar niveles satisfactorios de degradación, además de suministros constantes de nutrientes y de

aireación, por esta razón, la tecnología basada en enzimas específicas de origen microbiano surge como una herramienta prometedora para la biorremediación (Mougin et al., 2009; Piotrowska-Długosz 2017; Eibes et al., 2015).

Procesos catalizados por enzimas

Los procesos de biorremediación catalizados por enzimas son cada día más numerosos. Entre sus ventajas se puede mencionar la especificidad de sustrato, su gran actividad catalítica, su operación con bajos requerimientos energéticos y en amplios rangos de pH y temperatura (Torres et al., 2003). Las enzimas se pueden producir a gran escala mediante la fermentación de azúcares comunes y otros sustratos renovables. Además, es posible modificarlas para adaptarlas a una aplicación particular (McAuliffe, 2012) y una de sus grandes ventajas es que tienen un mínimo impacto en el ambiente por ser biodegradables, por lo tanto, la degradación enzimática es una alternativa para solucionar el problema causado por la presencia del sulfametoxazol en el ambiente.

Enzimas

Las enzimas son proteínas que están involucradas en los procesos químicos que mantienen la vida, su función es acelerar la reacción en varios órdenes de magnitud y permitir así que los productos estén disponibles casi de inmediato, (Huber et al., 1982) por lo que son consideradas biocatalizadores. El compuesto sobre el que actúa una enzima se denomina sustrato, y la región de la enzima que se une al sustrato es denominado sitio activo. Las enzimas poseen varias ventajas sobre los catalizadores químicos, como es la alta especificidad de sustrato y su alta capacidad catalítica, por esto se han utilizado ampliamente en diversas áreas (Navanietha et al., 2017) como en el tratamiento o diagnóstico de enfermedades, en la industria y en biorremediación.

Las enzimas funcionan en un determinado rango de temperatura y la velocidad de la reacción que catalizan aumenta según la ecuación de Arrhenius, es decir, la

velocidad de reacción aumenta cuando se incrementa la temperatura. Las enzimas poseen una temperatura óptima, por lo que antes y después de alcanzar su temperatura óptima, la velocidad de reacción es más lenta. Cada enzima tiene una temperatura óptima diferente. Algo similar ocurre con el pH, ya que los diversos grupos funcionales de las enzimas se ven afectados al cambiar el pH, lo que a su vez modifica su conformación y por lo tanto su capacidad catalítica (Navanietha et al., 2017).

Peroxidasas

Las peroxidasas son enzimas producidas por microorganismos, plantas y hongos. Sus sitios activos principales contienen el grupo prostético hemo o residuos de grupos cisteína o seleno-cisteína con actividad redox capaces de oxidar una gran cantidad de compuestos orgánicos e inorgánicos, estas enzimas requieren la presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Montellano, 2010) y catalizan muchas reacciones bioquímicas y fisiológicas importantes en los organismos vivos. Son de gran interés debido a sus amplias aplicaciones potenciales en los campos clínico, bioquímico, biotecnológico e industrial y en la síntesis de compuestos (Chanwun, T. et al., 2013). A consecuencia de su capacidad de hidrolizar diversos compuestos xenobióticos se han usado ampliamente en la eliminación o transformación de contaminantes en el ambiente (Dwevedi, 2016).

Cloroperoxidasa

Una de las peroxidasas más versátiles y biotecnológicamente relevantes es la cloroperoxidasa proveniente del hongo filamentoso *Caldariomyces fumago*. Esta enzima posee amplias propiedades catalíticas con actividades similares a las peroxidasas, catalasas y halogenasas (Buchhaupt et al., 2018). “*Cataliza la sulfoxidación, la epoxidación, la dismutación, la halogenación y la oxidación de un amplio espectro de compuestos*” (Li et al., 2011) por lo que se ha estudiado para diversos usos, desde síntesis enzimática de polianilina (Longoria et al., 2010), iminociclitol (Gámez, 2017), epiclorhidrina (Wu et al., 2010), oxindoles (Van Deurzen

et al., 1996), hasta biocatálisis ambiental. Una de las características más relevantes de la cloroperoxidasa es que puede catalizar esta amplia variedad de reacciones con propiedades altas de regioselectividad y enantioselectividad, sin la necesidad de cofactores (Wang et al., 2011), además, tiene altos valores de Total Turnover Number (TTN), indicador importante de la productividad de un biocatalizador. Se ha demostrado que esta cloroperoxidasa es capaz de degradar eficientemente el sulfametoxazol, además, se puede expresar en el hongo *Aspergillus Niger* obteniendo una enzima recombinante con características muy similares a la nativa (Conesa et al., 2001), haciendo posible el desarrollo de un sistema de expresión eficiente que reduzca significativamente los costos de producción para esta enzima. Por otra parte, se ha demostrado que los productos de esta reacción tienen menor toxicidad y son más biodegradables. Sin embargo, la aplicación de esta enzima se ve limitada por la inactivación que experimenta ante ciertos factores como temperatura, pH, disolventes orgánicos y concentraciones de oxidantes (Li et al., 2011) por lo que los procesos para mejorar la estabilidad de esta enzima representan un área importante de investigación.

Degradación de sulfametoxazol por cloroperoxidasa

Las investigaciones llevadas a cabo por García-Zamora et al. (2018) y Zhang et al. (2016) demostraron que la cloroperoxidasa proveniente de *Caldariomyces fumago* oxida eficientemente al sulfametoxazol. Adicionalmente, con los productos de la reacción Zhang et al. (2016) realizaron ensayos de biodegradabilidad y de ecotoxicidad en algas y se concluyó que los productos resultantes de la oxidación son más biodegradables y menos tóxicos comparados con el sulfametoxazol. Además, basados en la identificación de algunos intermediarios y productos finales de la reacción se propuso un mecanismo para la oxidación de sulfametoxazol mediado por la cloroperoxidasa (Figura 2).

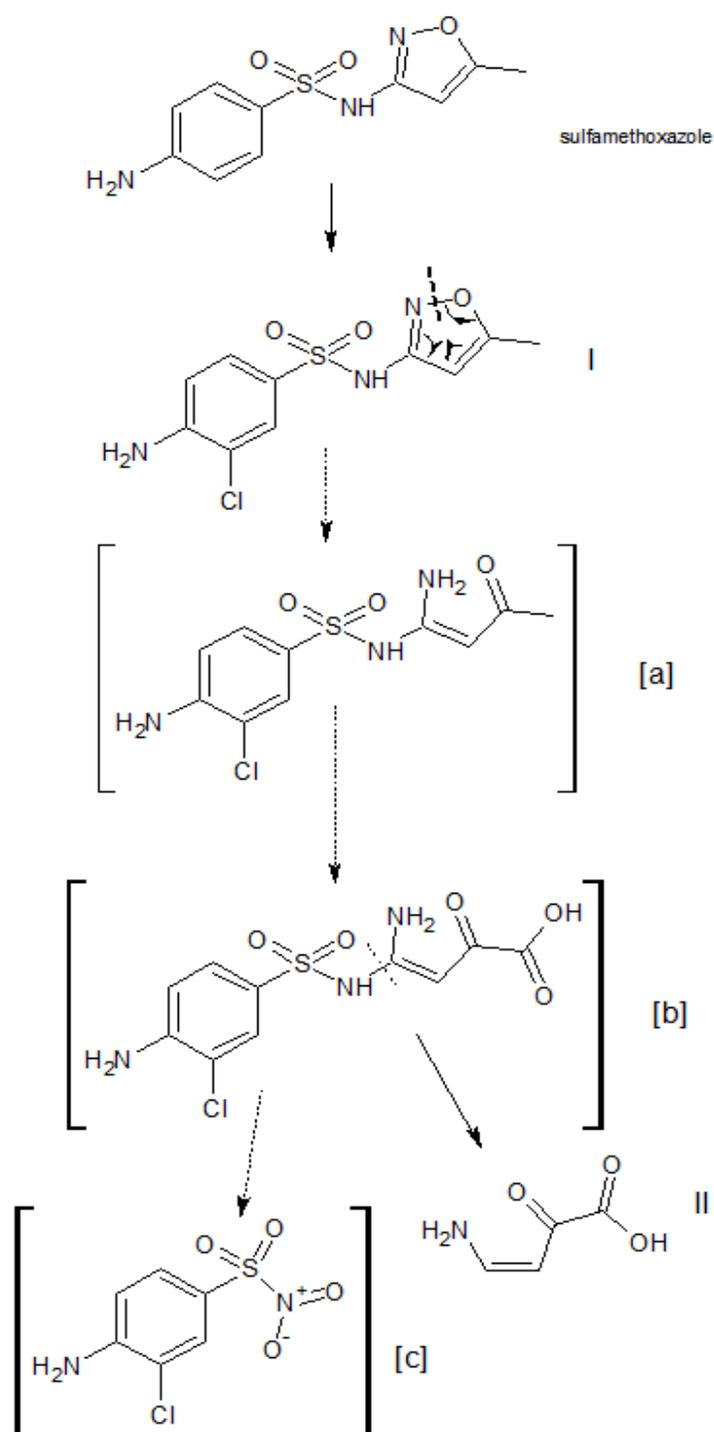


Figura 2. Mecanismo propuesto de oxidación del sulfametoxazol por la cloroperoxidasa. Tomado de Zhang et al. (2016).

En la primera etapa de la degradación oxidativa catalizada por cloroperoxidasa, el sulfametoxazol es clorado en la posición orto del grupo amino [I] (4-amino-3-cloro-

N-(5-metilisoxazol-3-il)-bencenosulfonamida). Después del rompimiento del enlace N–O, [I] es degradado en [a] ((*E*)-4-amino-*N*-(1-amino-3-oxobut-1-enil)-3-clorobencenosulfonamida), como se indica en la Figura 1. Posteriormente, el grupo amino y metilo son oxidados en [b] (ácido (*E*)-4-(3-cloro-4-nitrofenilsulfonamido)-4-nitro-2-oxobut-3-enoico). Finalmente, el fragmento [b] se degrada en [c] (2-cloro-1-nitro-4-(nitrosulfonil) benceno) y en [II] (ácido (*Z*)-4-nitro-2-oxobut-3-enoico) después del rompimiento del enlace C–N junto al grupo imino.

Inmovilización enzimática

La mejora de la estabilidad de las enzimas ha sido obstaculizada por los múltiples factores implicados y la carencia de métodos que evalúen las contribuciones de cada uno de los factores de manera individual (Wang et al., 2011). Entre los inconvenientes generales que una enzima presenta al ser utilizada en un proceso industrial o de biorremediación, es que carece de estabilidad y que la separación de la enzima para ser recuperada después de la biocatálisis es complicada debido a su solubilidad. Esto limita su reutilización, causando que este tipo de procesos biotecnológicos no sean rentables. Sin embargo, la inmovilización de las enzimas ha permitido superar estos inconvenientes (Zhang et al., 2009).

De acuerdo con Guisan (2006), la implementación a gran escala de enzimas como catalizadores requiere el estudio y el uso de técnicas multidisciplinarias muy diferentes:

- “(1) la selección de enzimas con propiedades adecuadas
- (2) la mejora de las propiedades enzimáticas mediante técnicas de biología molecular
- (3) la mejora de las propiedades enzimáticas mediante técnicas de inmovilización y post-inmovilización
- (4) la mejora de las propiedades enzimáticas a través de la reacción y la ingeniería del reactor”

Este trabajo se centra en la mejora de las propiedades enzimáticas mediante la técnica de inmovilización, que consiste en la localización de la enzima en una región definida del espacio, comúnmente en un soporte sólido para dar lugar a formas enzimáticas insolubles que retengan su actividad catalítica y que pueden ser utilizadas repetidamente (Gaffney et al., 2012). Las enzimas se unen al soporte de diferentes formas, que van desde adsorción física hasta la formación de enlaces covalentes estables, y como resultado se obtiene la alteración de algunas propiedades de las enzimas, como la estabilidad térmica o la actividad enzimática. Las principales ventajas y desventajas de la inmovilización se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Principales ventajas y desventajas de los sistemas enzimáticos inmovilizados.

Ventajas	Desventajas
Reutilización del catalizador	Pérdida o reducción de la actividad
Operación sencilla del reactor	Costos adicionales
Separación del producto más fácil	Transferencia de masa limitada
Minimiza la contaminación del producto	Necesita del desarrollo de nuevas técnicas o materiales para su aplicación
Alta productividad del catalizador	
Estabilidad operacional mejorada	

(Eş et al., 2015; Brena & Batista-Viera, 2006)

Métodos de inmovilización

Los métodos de inmovilización comúnmente se clasifican en físicos y químicos de acuerdo con el tipo de unión que se establece entre la enzima y el soporte sólido. La forma más común para clasificar los métodos de inmovilización enzimática es por unión física y por unión química. Los métodos de inmovilización física incluyen el **atrapamiento** de la enzima dentro de una matriz sólida porosa (usualmente un polímero), la **inclusión en membranas** donde la enzima está rodeada de una membrana semipermeable que no permite la liberación de la enzima, pero sí el paso de sustrato/producto (Arroyo, 1998), y la **adsorción física** de la enzima sobre el soporte y puede deberse a enlaces por puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals o interacciones hidrofóbicas por lo que es reversible y uno de los métodos más económicos (Mohamad et al., 2015; Arroyo, 1998).

Los métodos de inmovilización química se llevan a cabo sobre soportes como es el caso de la **unión covalente** que se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con la enzima, y el **entrecruzamiento** que se realiza mediante la formación de reticulaciones entre cada molécula de enzima por medio de reactivos multifuncionales logrando así que la enzima actúe también como el soporte (Mohamad et al., 2015).

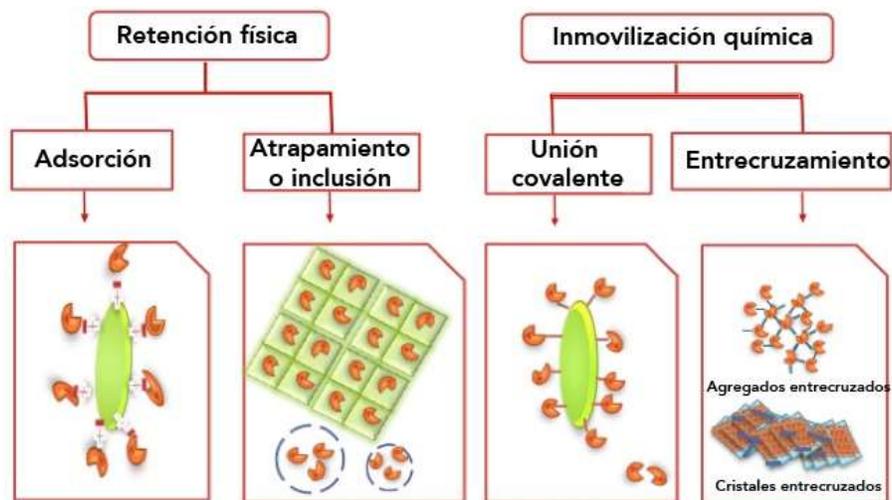


Figura 3. Métodos generales de inmovilización de enzimas. Tomado de Rodríguez & Castillo (2014).

Soportes

Un gran número de compuestos puede ser usado como soporte en la inmovilización de enzimas, las principales características en las cuales se basa su elección son su costo, la disponibilidad y que el material sea estable a las condiciones en las que se va a aplicar (Krajewska, 2014). Homaei et al. (2013) y Brena et al. (2006) clasifican los diversos soportes de acuerdo con lo siguiente:

- *Polímeros sintéticos*. Son representados por las resinas, que son producidas a partir de materiales simples o complejos por polimerización, adición o condensación (Gooch, 2011).
- *Biopolímeros*. Principalmente se usan los que son insolubles en agua como la celulosa, el algodón y el quitosano, y forman geles acuosos muy inertes ideales para la inmovilización enzimática.
- *Soportes inorgánicos*. Como la alúmina, la sílice, o zeolitas, su principal ventaja es su gran resistencia mecánica y son ampliamente usados en conjunto con el método de adsorción para inmovilizar enzimas.
- *Nanomateriales*. Son los materiales con una longitud menor a 100 nanómetros al menos en una dimensión y exhiben propiedades óptimas, eléctricas y mecánicas particulares que no existen en la macro escala. Se aplican principalmente en biosensores (Farzin et al., 2018).

A pesar de la diversidad de soportes, entre los más usados para la inmovilización de peroxidasas se encuentran los materiales inorgánicos, sintéticos y naturales, como arcilla y perlas de vidrio o los basados en sílice y celita. Este tipo de materiales se puede conseguir de forma comercial, lo que representa una alternativa atractiva por ser de fácil adquisición para realizar la inmovilización (Longoria et al., 2010).

Arcillas

Las arcillas se han utilizado en las civilizaciones humanas desde la época prehistórica, debido principalmente a su elevada disponibilidad en cualquier lugar de la Tierra, actualmente las arcillas se usan cada vez más en diferentes áreas para sustituir a los metales, por ejemplo, en la fabricación de aislantes térmicos y cementos, por ser alternativas más baratas y amigables con el ambiente (Mukherjee, 2013). Son una mezcla natural compuesta por silicatos hidratados que pueden contener aluminio, potasio o algunos otros cationes, se producen naturalmente por interacción de las rocas con agua u oxígeno cuyas dos propiedades fundamentales son la plasticidad cuando se le adiciona agua y la capacidad de endurecimiento cuando se somete a un proceso de calentamiento (Mukherjee, 2013). Este tipo de materiales desempeñan importantes papeles en la eliminación de contaminantes del ambiente, tanto para absorber los contaminantes en diferentes etapas de los procesos como para mejorar las reacciones catalíticas (Pandey et al., 2018).

De entre las propiedades de las arcillas, a la que se debe el interés en usarlas con el propósito de mejorar las reacciones catalíticas es la presencia natural de sitios activos (ácidos o básicos), presentes en gran medida en las arcillas de la familia de las esmécticas, principalmente en las arcillas denominadas montmorillonitas. Se han hecho diversos estudios donde se utilizan estas arcillas como catalizadores heterogéneos en reacciones que requieran un medio ácido, además por sus propiedades fisicoquímicas es posible su modificación con especies de probada actividad catalítica. Generalmente son más utilizadas como soportes que como catalizadores.

Arcillas modificadas

Con el propósito de aumentar la eficiencia y la selectividad de estos materiales para una reacción específica, crear nuevos puntos de adsorción y alargar su tiempo de vida, se llevan a cabo diversos tratamientos en la superficie de las arcillas; la acción

más común es intercalar la arcilla con óxidos metálicos para aumentar su actividad catalítica debido a que, entre otras cosas, esto produce un flujo relativo de electrones (Rangel, 2018).

Arcillas K10 modificadas

Las arcillas montmorillonitas comercialmente son conocidas como arcillas K, de entre estas, la arcilla K10 es conocida por su alta área superficial y por poseer sitios ácidos, por lo que, para los propósitos de la tesis doctoral de Rangel (2018) fue modificada adicionándole mediante metodologías sol-gel óxidos metálicos de metales de transición, específicamente titania (TiO_2) y circonia (ZrO_2), ya que ambas especies en su estado puro son sólidos cristalinos que presentan gran actividad hacia catálisis ácida (Rangel, 2018).

Peroxidasas inmovilizadas

La inmovilización enzimática se ha estudiado por aproximadamente 100 años, como resultado, se ha logrado inmovilizar diferentes enzimas en distintos sustratos, cada una con un propósito específico. Sin embargo, por sus características, las peroxidasas han recibido especial atención y en su forma inmovilizada tiene diversidad de aplicaciones, entre ellas destacan la síntesis de productos químicos (Zhou & Hartmann, 2012), los biosensores para aplicaciones médicas (Esquisabel et al., 2006) y la eliminación de contaminantes en el ambiente (Husain, 2019). En los últimos años, debido a su poder catalítico y versatilidad, las peroxidasas en las que se ha centrado la investigación son la peroxidasa de rábano picante (HRP) y la cloroperoxidasa (CPO) y se han inmovilizado tanto en soportes orgánicos como inorgánicos (Longoria et al., 2010).

Para la HRP inmovilizada se han obtenido diversos resultados con diferentes sustratos y soportes, por lo que no podemos generalizar. Por ejemplo, se ha obtenido una mejora en la estabilidad de almacenamiento y un rango más amplio de pH, sin una capacidad de reutilización enzimática satisfactoria (Cheng et al.,

2006); también se ha obtenido retención total de la actividad enzimática con la interacción enzima-soporte, pero llevada a cabo la inmovilización hay una pérdida total de la actividad (Calvarho et al., 2007); o en otro caso se obtiene una mejora en la termo-estabilidad de la enzima (Takahashi et al., 2000). Algo similar ocurre con la cloroperoxidasa, se ha logrado mejorar de dos a tres veces su termo-estabilidad a costa de una pérdida en su actividad catalítica (Terrés et al., 2008), en contraste con lo obtenido en otros trabajos (Aburto et al., 2005) donde la inmovilización no causa cambios en la termo-estabilidad e incluso existen algunos casos donde la enzima inmovilizada puede ser más termo sensible que la enzima en su forma libre (Montiel et al., 2007), por lo que se siguen buscando estrategias para optimizar, de acuerdo a los objetivos de cada aplicación, la técnica de inmovilización enzimática.

Objetivos

General:

Desarrollar un método de degradación de sulfametoxazol mediante la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* inmovilizada en arcillas esmécticas modificadas con TiO_2 y ZrO_2 .

Específicos

- Inmovilizar la cloroperoxidasa en arcillas esmécticas modificadas con TiO_2 y ZrO_2
- Realizar ensayos de degradación de sulfametoxazol con la cloroperoxidasa en su forma libre e inmovilizada.
- Analizar la estabilidad de la cloroperoxidasa en su forma libre e inmovilizada ante cambios de temperatura y pH durante la degradación de sulfametoxazol.
- Evaluar la reutilización de la cloroperoxidasa libre e inmovilizada para la degradación de sulfametoxazol.

Hipótesis

La cloroperoxidasa inmovilizada en arcillas modificadas con TiO_2 y ZrO_2 mantendrá su actividad catalítica, será más estable ante cambios de temperatura y pH y podrá ser reutilizada.

Metodología

1. Inmovilización enzimática

La cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*, donada por el Dr. Michael A. Pickard de la Universidad de Alberta, Canadá, se inmovilizó en dos arcillas que servirían de soportes; estas arcillas fueron modificadas, una con TiO₂ y otra con ZrO₂ por Rangel (2018) y fueron donadas por el Dr. Gustavo Rangel Porras de la Universidad de Guanajuato. La arcilla modificada con TiO₂ presenta un área superficial de 213 m²/g, un volumen de poro de 0.37 cm³/g y un tamaño de poro de 69.2 Å, mientras que la arcilla modificada con presenta un área superficial de 168 m²/g, un volumen de poro de 0.28 cm³/g y un tamaño de poro de 46.1 Å.

La inmovilización consistió en poner la enzima en contacto con cada uno de los soportes en un vial conteniendo 900 µL de amortiguador de acetatos 60 mM pH 4, 100 µL de la cloroperoxidasa a una concentración de 230 mM y 0.1 g de alguna de las arcillas modificadas. Ambos viales se incubaron en agitación a 4 °C durante 24 horas.

1.1 Porcentaje de inmovilización

Posteriormente, para calcular el porcentaje de inmovilización, los viales fueron centrifugados durante 2 minutos a 15,000 rpm, para cada caso se recuperó el sobrenadante midiendo cuidadosamente su volumen y se transfirió a una celda para espectrofotómetro. Con la finalidad de calcular la cantidad de enzima que no se adsorbió a las arcillas, el sobrenadante se leyó en un espectrofotómetro Varian Cary® 50 UV-Vis a 403 nm y como blanco se leyó el amortiguador de acetatos utilizado para la inmovilización. Las arcillas con la enzima inmovilizada se resuspendieron en 1mL de amortiguador de acetatos y se repitieron 2 veces más los pasos de centrifugación y de lectura del sobrenadante, obteniendo 3 lecturas para cada reacción de inmovilización. Finalmente, con el coeficiente de extinción molar de la cloroperoxidasa (75.3 mM⁻¹ cm⁻¹) se calculó cuánta enzima permaneció

soluble y se obtuvo tanto el porcentaje de inmovilización de la enzima en las arcillas como la cantidad de enzima inmovilizada por gramo de soporte (anexo 1).

2. Curva de calibración de sulfametoxazol

Para relacionar los ensayos de degradación de sulfametoxazol con concentraciones conocidas de éste y realizar gráficas de los resultados, se realizó una curva de calibración con concentraciones de sulfametoxazol de 6.66 μM a 26.66 μM mediante espectroscopía de fluorescencia excitando a 270 nm y leyendo a 342 nm en un espectrofotómetro de fluorescencia Varian Cary ® Eclipse. Para su lectura, el sulfametoxazol estaba disuelto en una solución de 3 mL de amortiguador de acetatos 60 mM y KCl 200 mM, para cada concentración de sulfametoxazol, las lecturas se realizaron por duplicado.

3. Estandarización de las condiciones de reacción

Para ensayar la degradación de una concentración de sulfametoxazol mediante la cloroperoxidasa, se realizaron reacciones en un volumen final de 3 ml en un amortiguador de acetatos 60 mM pH 4 y KCl 20 mM con 200 μM de sulfametoxazol probando diferentes concentraciones de enzima libre y posteriormente diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno a pH 4 y temperatura ambiente.

Para encontrar la cantidad óptima de enzima, se le añadió a la reacción previamente mencionada peróxido de hidrógeno 0.16 mM y se ensayaron con diferentes concentraciones de enzima libre: 0.05 μM , 0.005 μM y 0.0005 μM . La elección de una concentración óptima de enzima para la reacción, se basó en el tiempo que cada reacción tardó para degradar el sulfametoxazol completamente, en este caso, las primeras dos concentraciones mencionadas (0.05 μM y 0.005 μM) degradaron el sulfametoxazol en menos de 3 minutos, tiempo insuficiente para monitorear adecuadamente la reacción a través del tiempo, mientras que la concentración 0.005 μM , degradó al sulfametoxazol en un tiempo aproximado de 7 minutos, por lo que esta concentración de enzima fue seleccionada para los ensayos posteriores.

Habiendo establecido la concentración óptima de enzima libre, se continuó con las pruebas para establecer también una concentración óptima de peróxido de hidrógeno.

Se continuó utilizando el contenido de la reacción previamente descrito, con una concentración de enzima de 0.005 μM y modificando las concentraciones de peróxido de hidrógeno en cada ensayo. Las concentraciones utilizadas fueron: 0.16 mM, 0.086 mM y 0.033 mM. La concentración óptima de peróxido de hidrógeno se seleccionó siguiendo el mismo criterio que para la concentración óptima de enzima, de tal manera que con 0.033 mM de H_2O_2 se obtuvo un tiempo aproximado de reacción de 15 minutos, tiempo suficiente para monitorear adecuadamente la reacción. Con las condiciones de reacción establecidas, se iniciaron los ensayos de degradación.

4. Ensayos de degradación de sulfametoxazol

Para ensayar la degradación del sulfametoxazol mediante la cloroperoxidasa tanto en su forma libre como inmovilizada en cada una de las arcillas y obtener su constante de reacción, se realizaron ensayos por espectroscopía de fluorescencia, excitando al sulfametoxazol a 270 nm y monitoreando la emisión de luz a 342 nm. El volumen total de cada reacción fue de 3 mL a pH 4 y temperatura ambiente y las concentraciones son en base al apartado *estandarización de las condiciones de reacción*. La enzima (libre o inmovilizada) era adicionada al final y se realizaban lecturas del sulfametoxazol residual cada 2 minutos, por un lapso de 14 minutos. Éste y todos los ensayos siguientes se realizaron por triplicado.

5. Ensayos control

Para determinar si la degradación del sulfametoxazol se debía sólo a la acción de la cloroperoxidasa, en las reacciones de degradación de sulfametoxazol con la enzima libre se realizó un control sin enzima y sin peróxido de hidrógeno. Para los casos donde la enzima estaba inmovilizada en cada una de las arcillas se realizaron controles para determinar el papel que tenían por sí solos la temperatura, las arcillas y el peróxido de hidrógeno en la degradación del sulfametoxazol. En la Tabla 2 se indica la composición de los controles.

Los ensayos control también se realizaron mediante espectroscopía de fluorescencia a las longitudes de onda previamente mencionadas tomando lecturas del sulfametoxazol residual cada 2 minutos durante 14 minutos.

Tabla 2. Resumen del contenido de la reacción en la condición experimental y en cada control.

	Condición experimental	Control 1 (Arcilla + H₂O₂)	Control 2 (Arcilla)	Control 3 (Control negativo)
Enzima inmovilizada	✓	✗	✗	✗
H₂O₂	✓	✓	✗	✗
Arcilla	✓	✓	✓	✗

Todos los ensayos descritos aquí como controles se sometieron a los ensayos de estabilidad enzimática que se describen a continuación.

6. Ensayos de estabilidad enzimática a diferentes condiciones de pH y temperatura

Para determinar si la inmovilización de la cloroperoxidasa modificó su estabilidad ante diferentes condiciones de temperatura y pH, se realizaron ensayos de degradación de sulfametoxazol por triplicado utilizando a la enzima libre y a la enzima inmovilizada en cada una de las arcillas, los componentes de la reacción para estos ensayos fueron los ya descritos en el apartado 3.

La degradación de sulfametoxazol en diferentes condiciones de pH se ensayó a temperatura ambiente; para modificar el pH de las reacciones, éstas se realizaron en el amortiguador de acetatos 60mM con KCl 200 mM a pH 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5 y 6. La degradación de sulfametoxazol en cada condición de pH se cuantificó mediante espectroscopía de fluorescencia, excitándolo a 270 nm y realizando su detección a 342 nm con lecturas del sulfametoxazol residual cada 2 minutos, por 14 minutos.

La degradación del sulfametoxazol mediada por la cloroperoxidasa a diferentes temperaturas se realizó incubando los viales a temperaturas de 25 °C a 70 °C con un incremento sucesivo de 5 °C. La degradación de sulfametoxazol se cuantificó mediante espectroscopía de fluorescencia, excitando el sulfametoxazol a 270 nm y realizando su detección a 342 nm, en este caso se realizaron lecturas cada 5 minutos, durante 15 minutos, el tiempo entre cada lectura fue mayor debido a que se requirió mantener en constante incubación para alcanzar las temperaturas de análisis.

7. Reutilización de la enzima

Con el propósito de determinar la reutilización de la enzima en la degradación de sulfametoxazol en su forma libre e inmovilizada y determinar el número de ciclos de reutilización, así como la eficiencia de degradación en cada ciclo, se realizaron reacciones cuya composición se describe en la Tabla 3. Las lecturas se realizaron mediante espectroscopía de fluorescencia a temperatura ambiente y excitando al

sulfametoxazol a 270 nm y realizando su lectura a 342 nm. Para este caso, adicionalmente se utilizó un software de cinética para monitorear cada momento de la reacción. Las reacciones se monitorearon hasta que dejó de haber cambios en la concentración del sulfametoxazol (sin un tiempo definido). En ese momento se agregaban 5 µl más de sulfametoxazol 4 mM y 5 µl de peróxido de hidrógeno 20 mM, y nuevamente se dejaba reaccionar hasta que ya no se detectaron cambios en la concentración de sulfametoxazol. Este paso se repitió 4 veces más.

Los ensayos de reutilización se realizaron para la enzima libre, y las enzimas inmovilizadas en cada una de las arcillas. Por cuestiones técnicas no se pudo centrifugar y quitar el sobrenadante en cada ciclo para recuperar la enzima en su forma inmovilizada, solo se adicionaba más peróxido de hidrógeno y sulfametoxazol, igual que en el caso de la enzima libre.

Tabla 3. Composición de las reacciones para los ensayos de reutilización de la cloroperoxidasa.

Volumen total: 3000 µL	Volumen (µL)	Cantidad (µmoles)	Concentración final (µM)
KCl 200mM	300		
Buffer acetatos 60 mM pH 4	2685		
Enzima libre 1:1000 230 µM	5	0.0015	0.0005
Enzima inmovilizada 1:000 230 µM	5	0.015	0.005
H₂O₂ 20 mM	5	0.1	0.033 (mM)
Sulfametoxazol 4 mM	5	0.02	6.6

Resultados

1. Inmovilización enzimática

La cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* fue inmovilizada por adsorción no covalente o física en las arcillas esmécticas modificadas con TiO₂ y ZrO₂. De acuerdo con los cálculos realizados para conocer la cantidad de cloroperoxidasa retenida por gramo de arcilla y el porcentaje de inmovilización, se obtuvieron los siguientes resultados: 229.995 nmol/g_{soporte} de retención y 99.992% de inmovilización en la arcilla modificada con TiO₂, y 229.983 nmol/g_{soporte} de retención y 99.998% de inmovilización en la arcilla modificada con ZrO₂. Con estos valores concluimos que la inmovilización se llevó a cabo exitosamente en ambas arcillas.

2. Curva de calibración

La curva de calibración de sulfametoxazol fue realizada en un rango de concentraciones de 6.66 µM a 26.66 µM realizando lecturas mediante fluorescencia. Las lecturas de fluorescencia se graficaron con respecto a la concentración (Figura 4). A partir de esta curva se determinaron las concentraciones de sulfametoxazol detectadas al final de cada reacción de degradación en los ensayos posteriores, aplicando la siguiente fórmula:

$$\%Degrada\acute{o}n = 100 - \frac{(SMX F)(100)}{SMX I}$$

Donde:

SMX F: Es la concentración de sulfametoxazol detectada por el fluorímetro después de la reacción.

SMX I: Es la concentración de sulfametoxazol detectada por el fluorímetro antes de agregar la enzima.

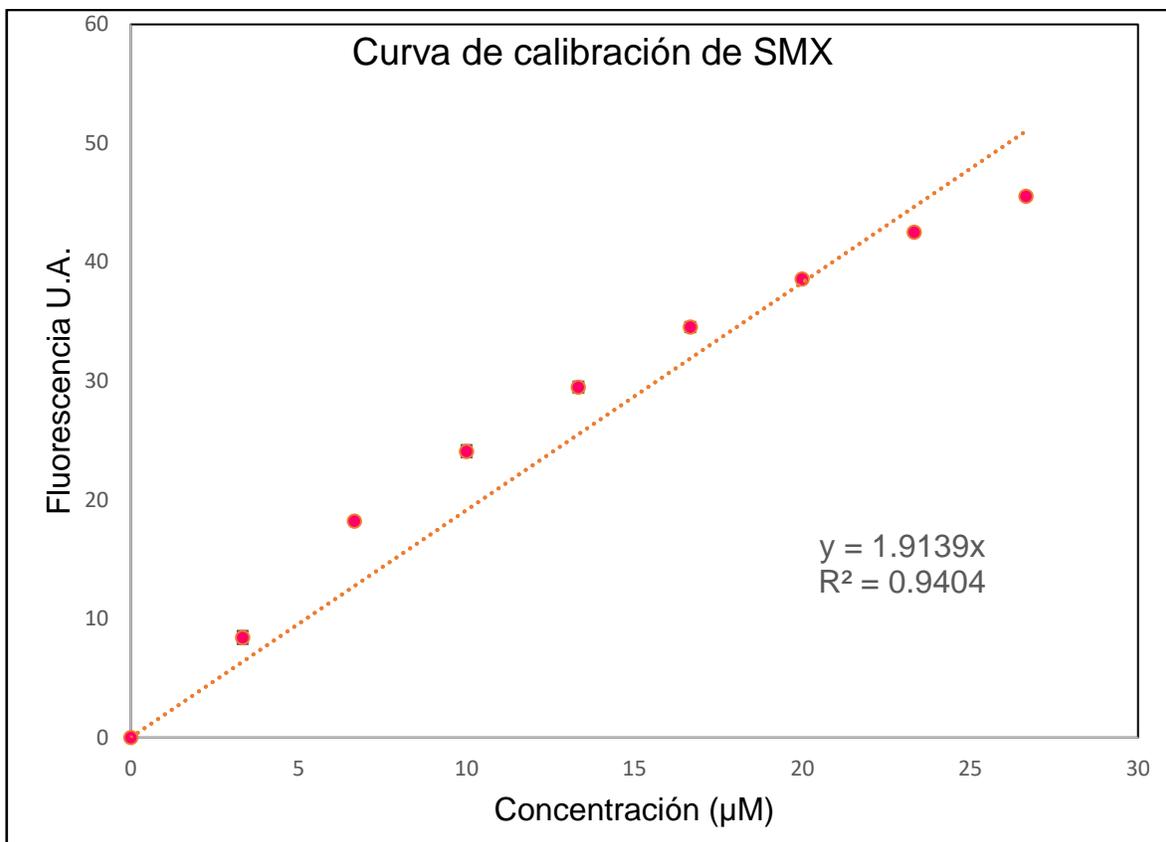


Figura 4. Curva de calibración para el sulfametoxazol realizada por espectroscopía de fluorescencia con ajuste lineal.

3. Estandarización de las condiciones de reacción

Las condiciones de reacción fueron estandarizadas mediante ensayos de degradación de sulfametoxazol con diferentes concentraciones de enzima libre (0.05 µM, 0.005 µM y 0.0005 µM) y de peróxido de hidrógeno (1.66µM, 0.86µM y 0.33µM). Los resultados mostraron que la concentración óptima de enzima libre fue 0.0005 µM, debido a que con esta concentración se degradó todo el sulfametoxazol en un tiempo aproximado de 6 minutos, mientras que con 0.05 µM y 0.005 la degradación completa del sulfametoxazol ocurrió en menos de 2 minutos. La concentración óptima de peróxido de hidrógeno fue 0.33 µM, ya que, como se muestra en la Figura 5, la reacción termina aproximadamente a los 12 minutos, en los casos donde se agregó una concentración mayor de peróxido de hidrógeno, la reacción ocurrió muy rápido para los objetivos de este trabajo, debido a que con un

tiempo de reacción corto no es posible comparar la degradación de sulfametoxazol mediada por la cloroperoxidasa en sus formas libre e inmovilizada.

Con las condiciones de reacción ya establecidas se procedió a determinar la constante de la reacción de degradación de sulfametoxazol.

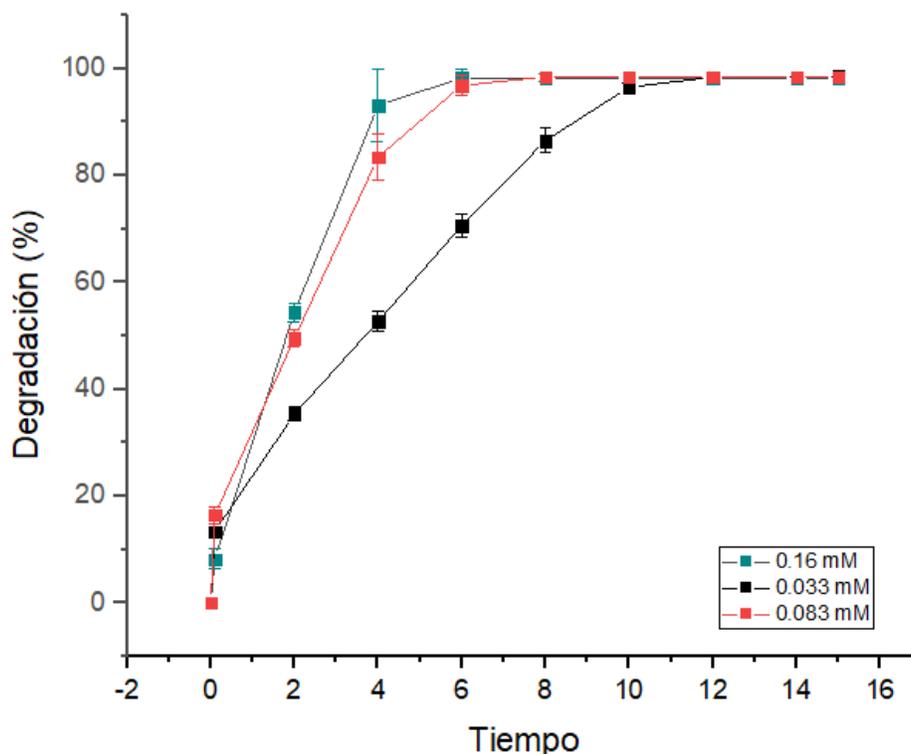


Figura 5. Estandarización de la degradación de sulfametoxazol. Los ensayos se realizaron utilizando $0.0005 \mu\text{M}$ de enzima y diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (0.033 mM , 0.083 mM y 0.16 mM) en un tiempo de 15 minutos.

4. Determinación de la constante de reacción de la enzima libre e inmovilizada

Para determinar la constante de reacción de la enzima libre e inmovilizada, se graficó la degradación de sulfametoxazol con respecto al tiempo, mediada por la enzima libre (Figura 6), la enzima inmovilizada en arcilla modificada con TiO_2 y la enzima inmovilizada en arcilla con ZrO_2 (Figura 7), y el comportamiento de la degradación se ajustó a un modelo exponencial de primer orden.

En la determinación de la constante de reacción de la enzima libre (Figura 6) es importante destacar que después de los 14 minutos de reacción, el sulfametoxazol es degradado casi por completo, y que la constante de reacción tiene un valor de -0.2586 min^{-1} , esta constante refleja una relación entre la velocidad de reacción y la concentración del sustrato, por lo que una constante mayor a ésta indica una degradación más rápida y viceversa.

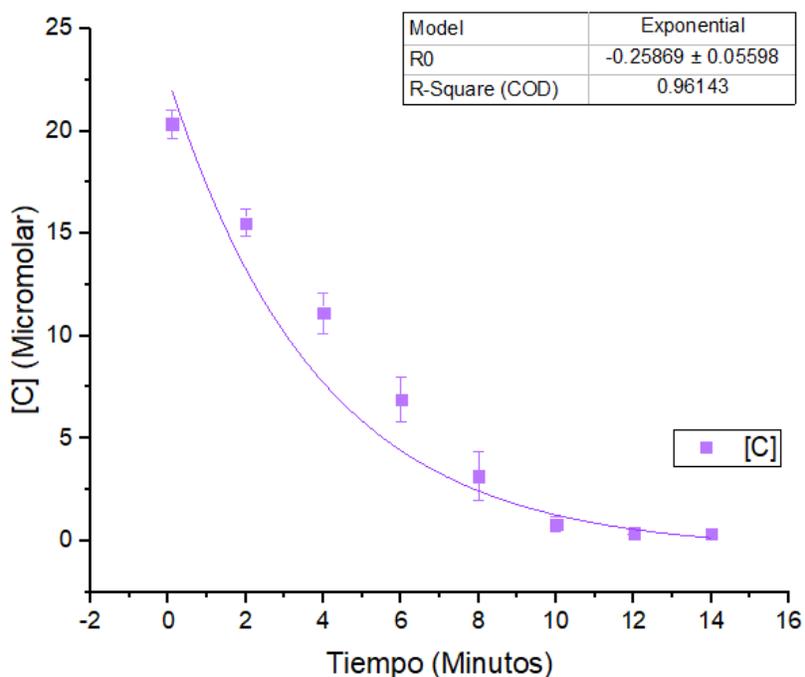


Figura 6. Curva de degradación de sulfametoxazol mediada por la enzima libre.

Para la enzima inmovilizada en cada una de las arcillas (Figura 7), la constante de reacción fue menor en comparación con la enzima libre a pesar de que la concentración de enzima utilizada fue 10 veces mayor y de que el tiempo de reacción fue el mismo. Al finalizar el tiempo de reacción (14 minutos), la concentración de sulfametoxazol que degradó la enzima inmovilizada en la arcilla modificada con ZrO_2 fue cercana a $10 \mu\text{M}$ y la concentración que degradó la enzima inmovilizada en la arcilla modificada con TiO_2 fue de $13 \mu\text{M}$, en contraste con $20 \mu\text{M}$ degradados por la enzima libre. Al comparar la constante de reacción de la enzima inmovilizada en ambas arcillas se observó que la enzima inmovilizada en la arcilla

modificada con ZrO_2 presentó una constante de reacción mayor que la enzima inmovilizada en la arcilla modificada con TiO_2 , lo que podría indicar una degradación enzimática más rápida con este soporte.

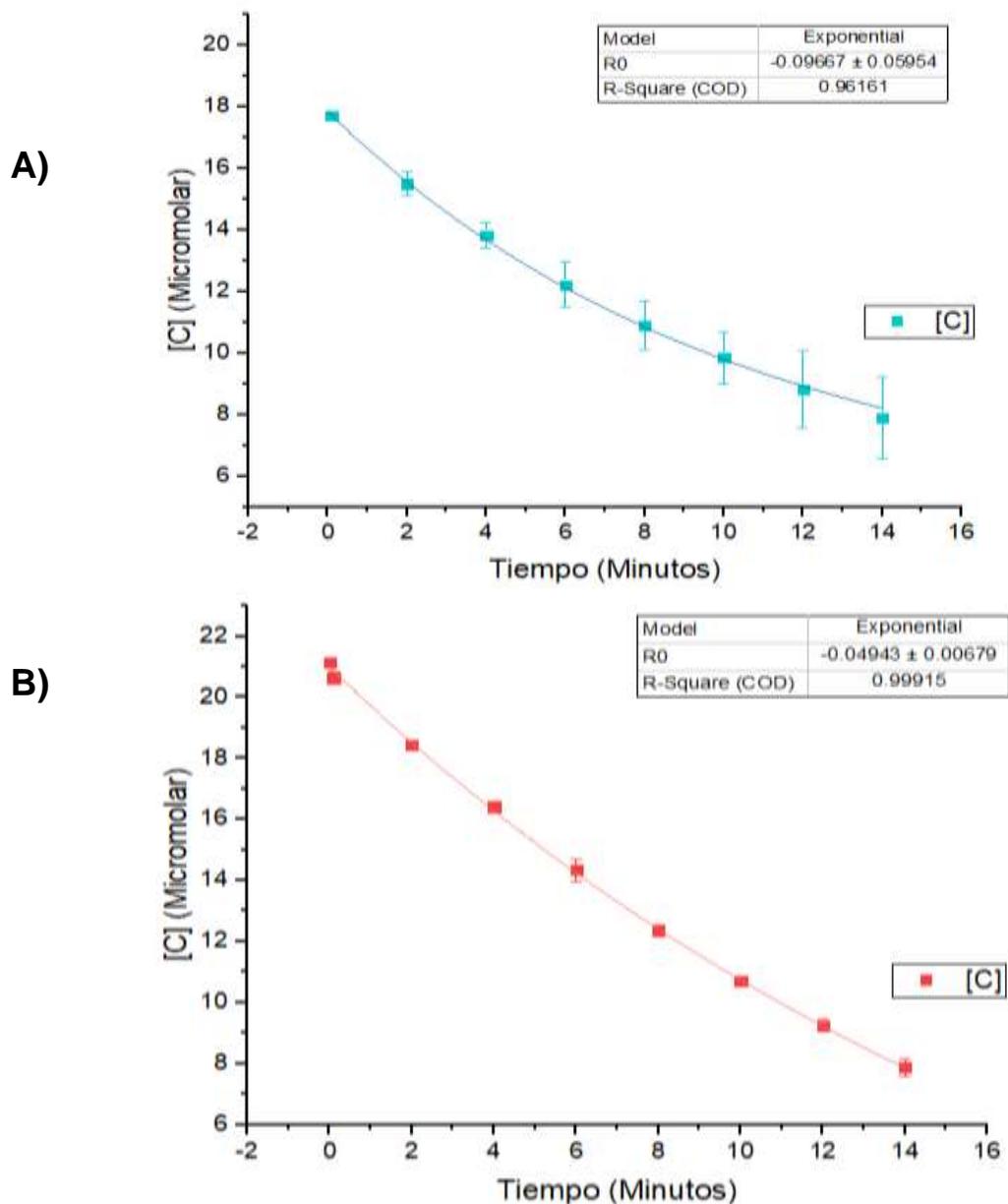


Figura 7. Curvas de degradación de sulfametoxazol mediada por la enzima inmovilizada. Se indica la degradación, en términos de concentración con respecto al tiempo. A) Cloroperoxidasa inmovilizada en la arcilla modificada con ZrO_2 ; B) Cloroperoxidasa inmovilizada en la arcilla modificada con TiO_2 .

Las constantes de reacción obtenidas (Tabla 4) nos proporcionaron información respecto a la degradación de sulfametoxazol llevada a cabo por la enzima libre e inmovilizada en ambas arcillas, sin embargo, cuando una enzima es inmovilizada, además de su actividad enzimática se modifican otras características, entre las que se destaca la estabilidad ante diferentes condiciones ambientales (pH, temperatura, disolventes, entre otros). Por lo que se procedió a analizar la estabilidad de la enzima, comparando a la enzima libre con la enzima inmovilizada en las arcillas modificadas.

Cloroperoxidasa	Valor de la constante de reacción
En su forma libre	-0.2586
Inmovilizada en arcilla con ZrO ₂	-0.0966
Inmovilizada en arcilla con TiO ₂	-0.0494

Tabla 4. Resumen de las constantes de reacción de la degradación del sulfametoxazol mediada por la cloroperoxidasa.

5.-Análisis del efecto de la inmovilización enzimática en la estabilidad de la cloroperoxidasa.

La carencia de estabilidad es una de las causas por las que las enzimas no se utilizan comúnmente en procesos a gran escala y se refleja en la disminución de la actividad enzimática o en su inactivación. La temperatura es uno de los principales factores que afectan a las enzimas, y en los procesos a nivel industrial, en muchos casos, al llevar a cabo una reacción la temperatura se eleva. Asimismo, en un proceso de biorremediación de ambientes acuáticos, el pH puede ser un factor determinante para que el proceso se lleve a cabo de manera eficiente. Con la inmovilización enzimática se ha logrado aumentar la estabilidad de un amplio número de enzimas, y en algunos casos se ha modificado el pH o la temperatura óptima de la enzima, por lo que en este trabajo se analizó el efecto que tuvo la

inmovilización de la cloroperoxidasa en las arcillas modificadas en términos de estabilidad.

5.1.- Análisis de la estabilidad enzimática ante cambios de temperatura

Para determinar si el proceso de inmovilización confiere a la cloroperoxidasa estabilidad ante el aumento de la temperatura, se realizaron ensayos de degradación de sulfametoxazol a diferentes temperaturas (de 25 °C a 70 °C) utilizando la cloroperoxidasa en sus formas libre e inmovilizada. Los resultados indicaron que las condiciones óptimas de operación para la enzima tanto libre como inmovilizada en cada arcilla, se encuentran entre 25 y 30 °C, ya que a esta temperatura la enzima degradó una mayor cantidad de sulfametoxazol (Figura 8). A partir de 30 °C el incremento de la temperatura conllevó a una disminución de la degradación de sulfametoxazol mediante la enzima libre e inmovilizada, siendo la actividad de la enzima libre la más afectada por el efecto de la temperatura. Comparando a la enzima inmovilizada en ambas arcillas, podemos ver que la actividad de la cloroperoxidasa inmovilizada en la arcilla modificada con TiO₂ fue la que se mantuvo más constante ante el aumento de temperatura (Figura 8).

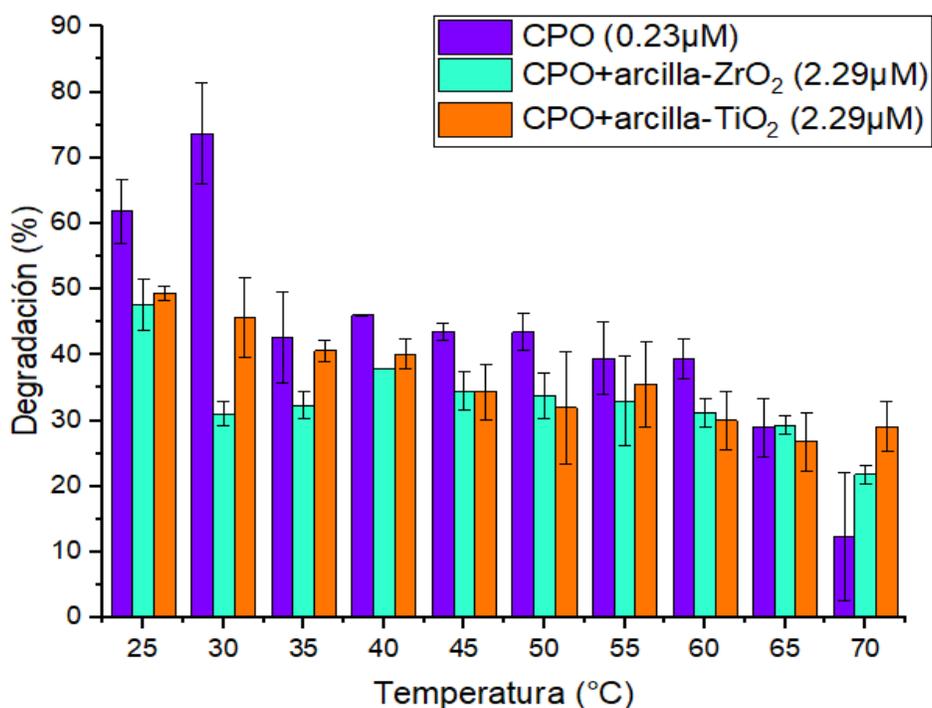


Figura 8. Efecto de la temperatura en la actividad de la enzima libre e inmovilizada. Porcentaje de degradación de sulfametoxazol mediante la cloroperoxidasa libre (CPO), la cloroperoxidasa inmovilizada en la arcilla modificada con TiO₂ (CPO+arcilla-TiO₂) y la cloroperoxidasa inmovilizada en la arcilla modificada con ZrO₂ (CPO+arcilla-ZrO₂)

Para determinar si la degradación del sulfametoxazol se debía únicamente a la acción de la cloroperoxidasa y no a los demás componentes de la reacción como la temperatura, el poder oxidante del peróxido de hidrógeno y la adsorción o la acción catalítica de las arcillas, se realizaron controles que también se ensayaron en el mismo rango de temperaturas (25 °C a 70 °C).

Para el caso de la enzima libre, el control negativo sin enzima y sin peróxido de hidrógeno se muestra en la Figura 9, comparándolo con la degradación de sulfametoxazol mediada por la cloroperoxidasa, se observó un pequeño porcentaje de degradación en el control mencionado, que podríamos atribuir al efecto de la temperatura. También se observó que a 70 °C la degradación de sulfametoxazol, que podría atribuirse a la catálisis enzimática, fue mínima.

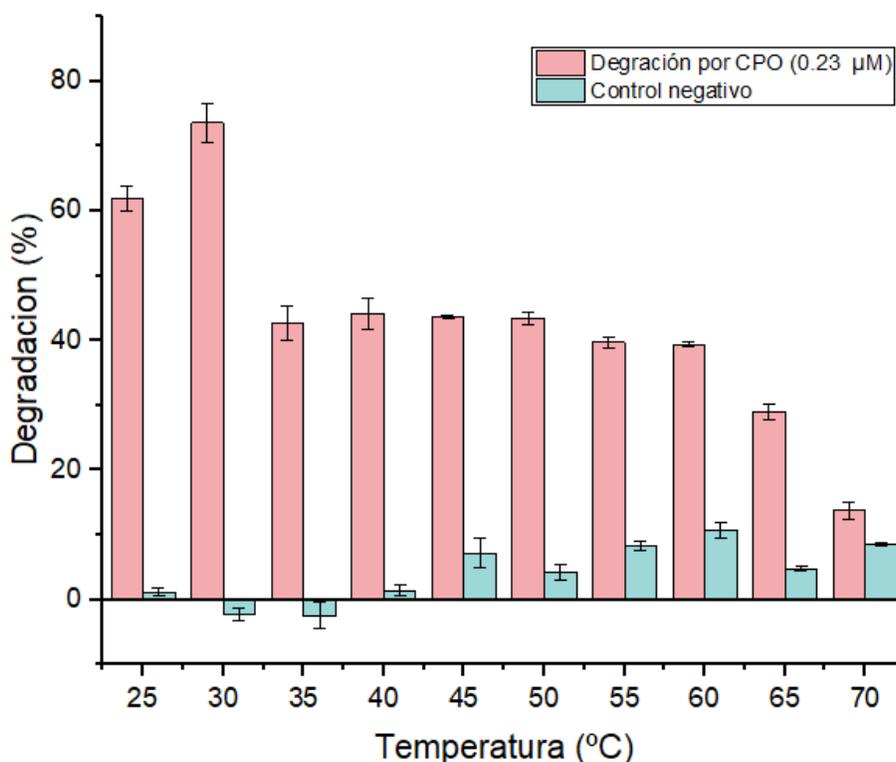


Figura 9. Efecto de la temperatura en la degradación de sulfametoxazol. Porcentaje de degradación de sulfametoxazol por la enzima libre a diferentes temperaturas y su control negativo sin enzima ni peróxido de hidrógeno.

Además del control de la enzima libre, se realizaron controles para ambas enzimas inmovilizadas, para cada una se realizaron tres controles, uno sin enzima, otro sin peróxido de hidrógeno ni enzima, y un tercero sin peróxido de hidrógeno, ni enzima, ni arcilla, en este último control cualquier cambio en la concentración de sulfametoxazol podría deberse al efecto de la temperatura.

La comparación de la condición experimental de la enzima inmovilizada en arcilla modificada con ZrO_2 y sus controles se muestra en la Figura 10. La condición experimental (CPO+arcilla- ZrO_2), el control sin enzima (arcilla- ZrO_2 + H_2O_2), el control sin peróxido de hidrógeno ni enzima (arcilla- ZrO_2) y el control sin enzima, ni peróxido de hidrógeno, ni arcilla (Temperatura) se sometieron a diferentes condiciones de temperatura (25 °C a 70 °C).

Como podemos ver en la Figura 10, la arcilla modificada con ZrO_2 por sí sola (arcilla- ZrO_2) fue capaz de degradar o adsorber al sulfametoxazol a partir de los 30 °C, la capacidad de degradación o adsorción de esta arcilla pareció incrementar conforme aumentó la temperatura. Al analizar el control que no contenía a la enzima, pero que sí contenía arcilla y peróxido de hidrógeno (arcilla- $ZrO_2+H_2O_2$) se observó que estos dos componentes interactuaron para degradar un mayor porcentaje de sulfametoxazol que la arcilla por sí sola, incluso a 25 °C. Asimismo, a 70 °C, el porcentaje de degradación de este control superó al porcentaje de degradación de la condición experimental, lo que indica que a temperaturas elevadas la participación de la enzima inmovilizada en la degradación de sulfametoxazol es mínima.

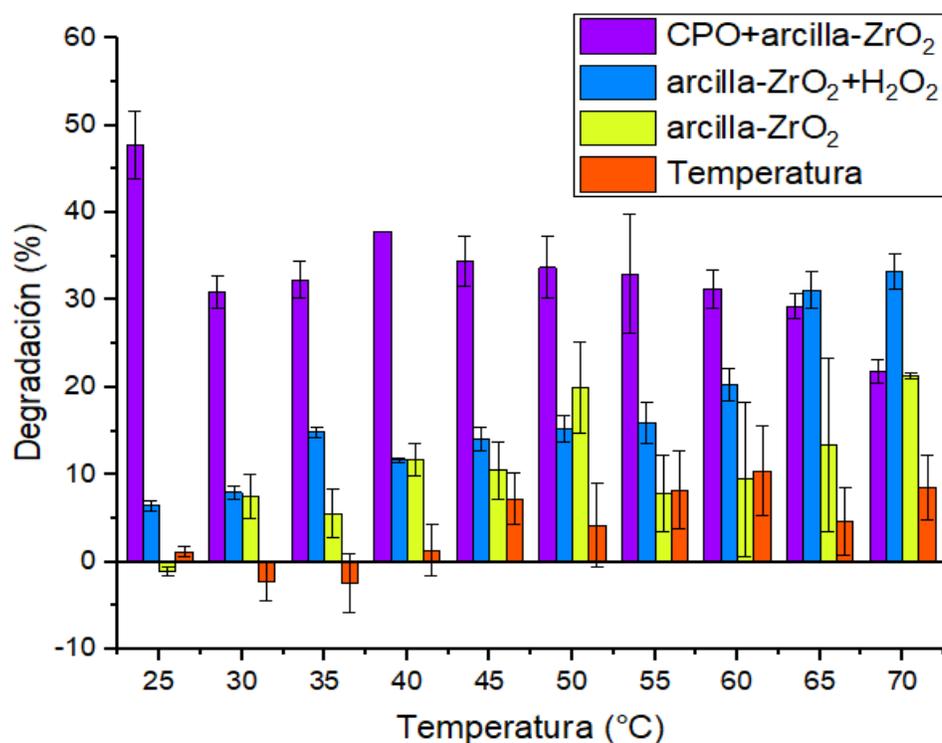


Figura 10. Efecto de la temperatura en la degradación de sulfametoxazol mediada por la enzima inmovilizada en la arcilla modificada con ZrO_2 y sus controles. Porcentaje de degradación de sulfametoxazol por la enzima inmovilizada en la arcilla modificada con ZrO_2 a una concentración de 2.29 μM y sus controles en diferentes condiciones. de temperatura.

El análisis previamente descrito también se realizó con la enzima inmovilizada en arcilla modificada con TiO_2 para determinar el papel de la arcilla modificada con TiO_2 , el peróxido de hidrógeno y el efecto de la temperatura en la degradación de sulfametoxazol, mediante diferentes controles (Figura 11). La condición experimental (CPO+arcilla- TiO_2), el control sin enzima (arcilla- $\text{TiO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$), el control sin peróxido de hidrógeno ni enzima (arcilla- TiO_2) y el control sin enzima, ni peróxido de hidrógeno, ni arcilla (Temperatura) se sometieron a diferentes condiciones de temperatura (25 °C a 70 °C).

De acuerdo con la Figura 11, la arcilla modificada con TiO_2 (arcilla- TiO_2) tuvo participación en la reacción ya sea degradando o adsorbiendo al sulfametoxazol desde los 25 °C, aumentando su participación al incrementarse la temperatura. Sin embargo, el control que sólo contenía arcilla modificada se comportó muy similar al control que contenía arcilla modificada y peróxido de hidrógeno (arcilla- $\text{TiO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$), lo que indica que en esta reacción no hubo interacción entre estos dos componentes y que la disminución de sulfametoxazol podría deberse únicamente a la arcilla modificada con TiO_2 .

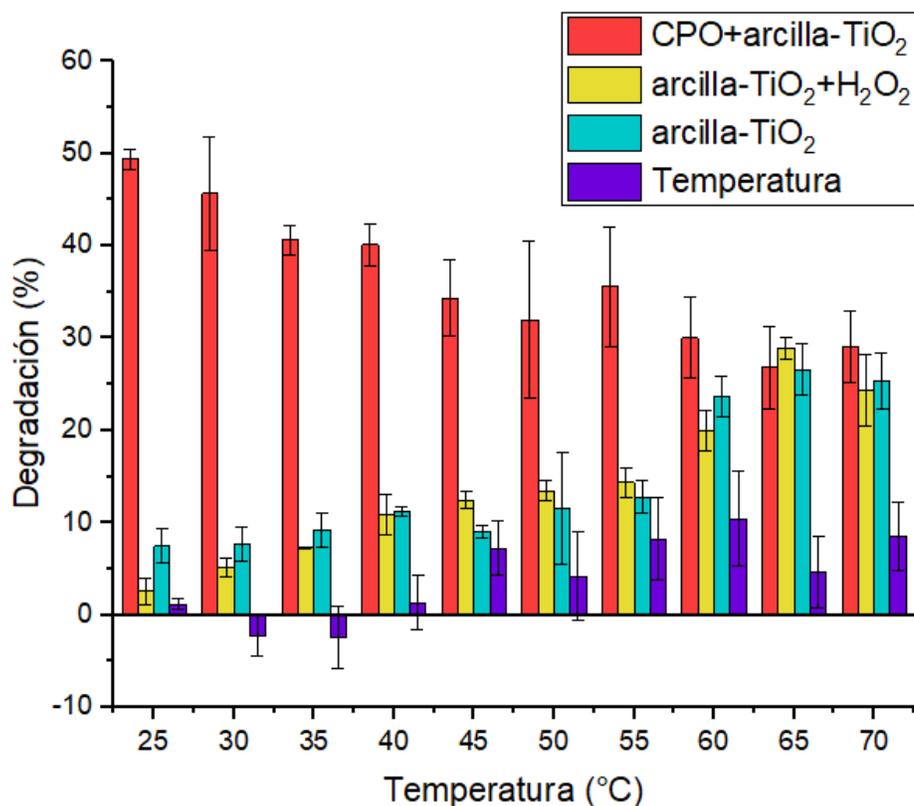


Figura 11. Efecto de la temperatura en la degradación de sulfametoxazol mediada por la enzima inmovilizada en la arcilla modificada con TiO₂ y sus controles. Porcentaje de degradación de sulfametoxazol obtenidos utilizando la enzima inmovilizada en la arcilla modificada con TiO₂ a una concentración de 2.29 μM y sus controles en diferentes condiciones de temperatura.

5.2.- Análisis de la estabilidad enzimática ante cambios de pH

Para conocer el efecto de la inmovilización en la estabilidad de la cloroperoxidasa ante cambios de pH, se compararon los porcentajes de degradación de sulfametoxazol utilizando a la enzima libre (CPO), la enzima inmovilizada en la arcilla modificada con ZrO₂ (CPO+arcilla-ZrO₂) y la enzima inmovilizada en la arcilla modificada con TiO₂ (CPO+arcilla-TiO₂) a diferentes condiciones de pH.

En la Figura 12 se puede observar que a diferentes valores de pH la actividad catalítica de la enzima, tanto en su forma libre como inmovilizada se favorecieron a

pH de 3.0 y 4.0, y perdieron casi por completo su actividad a pH 6. La enzima inmovilizada en la arcilla modificada con TiO_2 se vió ligeramente favorecida a pH 3.0 y 3.5 con respecto a la enzima inmovilizada en la arcilla modificada con ZrO_2 . Los resultados sugieren que la inmovilización no abre la posibilidad de utilizar a la cloroperoxidasa a pH neutros.

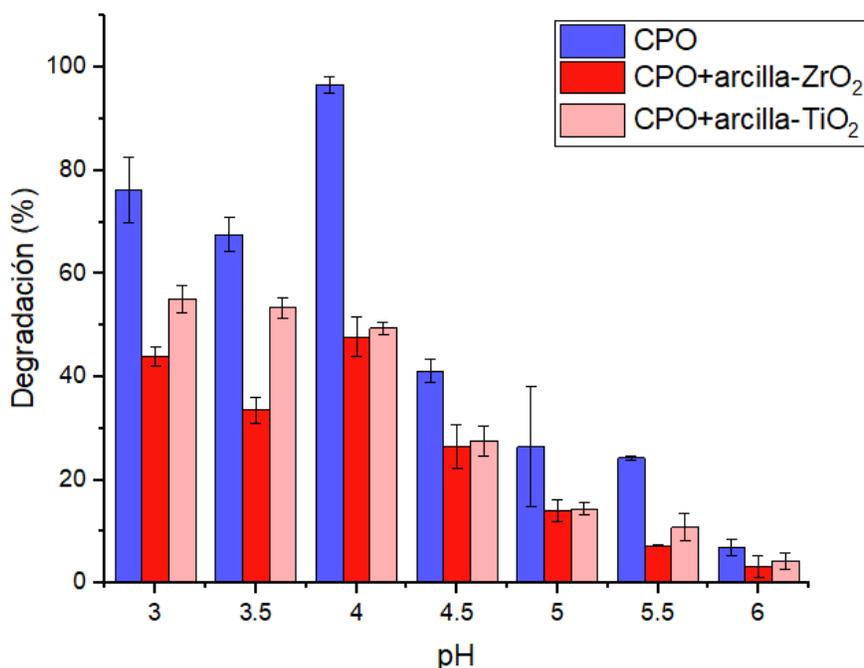


Figura 12. Efecto del pH en la degradación de sulfametoxazol mediada por la enzima libre e inmovilizada. Porcentaje de degradación de sulfametoxazol obtenidos utilizando la enzima libre e inmovilizada en ambas arcillas a diferentes condiciones de pH.

7. Ciclos de reutilización de la enzima

Una de las características más atractivas que la inmovilización proporciona a las enzimas es la capacidad de ser fácilmente reutilizadas, haciendo que los procesos donde éstas son utilizadas sean menos costosos. Sin embargo, las enzimas pierden eficiencia en cada ciclo, por lo que es importante determinar el número de ciclos en los que una enzima se puede reutilizar sin perder su funcionalidad.

Para determinar cuántas veces se puede reutilizar la cloroperoxidasa, se comparó el porcentaje de sulfametoxazol degradado en varios ciclos consecutivos, probando la capacidad de reutilización de la enzima libre, la enzima inmovilizada en arcilla modificada con ZrO_2 y la enzima inmovilizada en arcilla modificada con TiO_2 (Figura 13). La capacidad de la cloroperoxidasa para degradar al sulfametoxazol en cada una de sus formas se evaluó en función del porcentaje de degradación obtenido en cada ciclo, sin importar el tiempo que la enzima tardó en alcanzar ese porcentaje. Los resultados mostraron que la velocidad de degradación alcanzada por la enzima inmovilizada en ambas arcillas fue mucho menor que la velocidad alcanzada por la enzima libre.

En el primer ciclo el porcentaje de degradación alcanzado por cada una de las formas de la enzima fue muy similar, la principal diferencia fue el tiempo en el que la degradación se llevó a cabo. La enzima libre degradó al sulfametoxazol en 7 minutos mientras que en su forma inmovilizada tardó aproximadamente 13 minutos, esta diferencia en el tiempo de reacción incrementó con cada ciclo de reutilización, por lo que en el último ciclo el tiempo para alcanzar el máximo porcentaje de degradación se encontró en una proporción de 1:5 (enzima libre: enzima inmovilizada).

La enzima en su forma libre sólo perdió el 5% de su actividad al finalizar el sexto ciclo de reutilización, mientras que la enzima inmovilizada en arcilla modificada con ZrO_2 perdió aproximadamente un 70%. Sin embargo, ésta fue aún más eficiente que la enzima inmovilizada en arcilla modificada con TiO_2 que perdió el 99% de su actividad. En función de la capacidad de reutilización la enzima libre es mucho mejor que las enzimas inmovilizadas para reutilizarse en un proceso. Con respecto a conferir capacidad de reutilización para la enzima, estas arcillas no presentaron características similares, ya que la enzima inmovilizada en arcilla modificada con ZrO_2 se pudo reutilizar hasta por 6 ciclos, mientras que la enzima inmovilizada en arcilla modificada con TiO_2 pudo reutilizarse hasta por 4 ciclos (Figura 13).

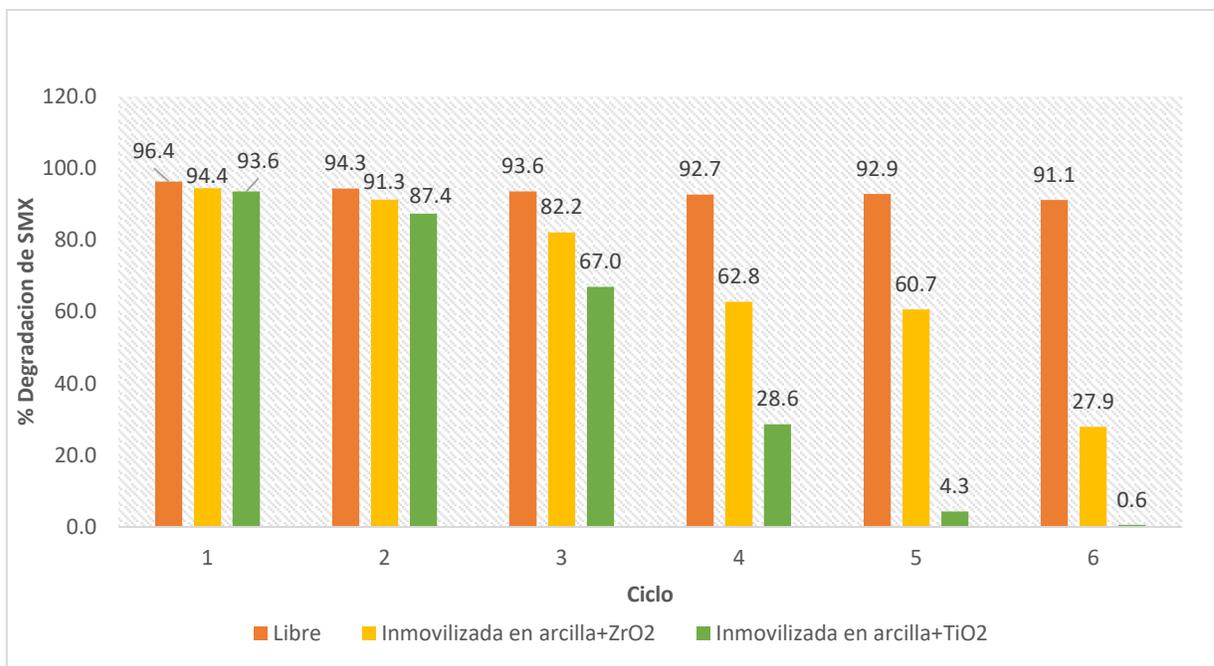


Figura 13. Reutilización de la cloroperoxidasa para la degradación de sulfametoxazol. Comparación entre el porcentaje de degradación por ciclo de reutilización de la enzima en su forma libre e inmovilizada en las arcillas modificadas.

Discusión de resultados

Inmovilización enzimática

En este trabajo, la inmovilización enzimática sólo se evaluó en función de los $\text{nmol/g}_{\text{soporte}}$ de enzima retenida y al porcentaje de inmovilización en los soportes. No se realizaron más estudios para determinar el tipo de interacciones enzima-soporte o su conformación en el espacio. Sin embargo, debido a la metodología y al tipo de soporte utilizado, la enzima podría estar unida al soporte por adsorción (Chemistry, 2006). En el caso de la arcilla modificada con ZrO_2 la adsorción podría llevarse a cabo en la superficie, ya que su tamaño de poro es de 46.1 \AA (Rangel, 2018) y las dimensiones de la cloroperoxidasa son de $53 \text{ \AA} \cdot 46 \text{ \AA} \cdot 60 \text{ \AA}$ (Sundaramoorthy et al., 1995). En el caso de la arcilla modificada con TiO_2 el tamaño de poro es de 69.2 \AA (Rangel, 2018) por lo que la enzima podría haberse adsorbido a la superficie de la arcilla e incorporado dentro de sus poros.

De acuerdo con los resultados obtenidos para la carga de enzima retenida ($229.983 \text{ nmol/g}_{\text{soporte}}$ y $229.995 \text{ nmol/g}_{\text{soporte}}$) e inmovilizada (99.998% y 99.992%) en los soportes modificados con ZrO_2 y TiO_2 respectivamente, podemos decir que la carga de cloroperoxidasa retenida en las arcillas fue alta, por lo tanto, la aplicación de ambas arcillas como soporte resulta ventajosa en comparación con la carga de la cloroperoxidasa retenida en otros materiales mesoporosos, como es el caso del soporte SBA-16 en el que por diferentes métodos de inmovilización se obtuvo entre $23 \text{ nmol/g}_{\text{soporte}}$ (adsorción) y $147 \text{ nmol/g}_{\text{soporte}}$ (unión covalente) (Aburto et al., 2005) y cuyo porcentaje de inmovilización fue de aproximadamente 7.5% y 50% respectivamente.

Ambas arcillas mostraron un porcentaje de inmovilización muy alto y la diferencia es mínima entre ellas, al obtener porcentajes muy similares podemos asumir que las interacciones enzima-soporte que existen entre la cloroperoxidasa y cada una de las arcillas es similar, esto también podría deberse a la similitud respecto al área superficial de cada una de las arcillas, cuyo valor para la arcilla modificada con TiO_2

es de $213\text{m}^2/\text{g}$ y para la arcilla modificada con ZrO_2 corresponde a $168\text{ m}^2/\text{g}$. (Rangel, 2018). El área superficial está directamente relacionada con la enzima adsorbida, por lo que una gran área superficial es uno de los requisitos para un soporte de inmovilización deseable (Longoria et al., 2010), sin embargo, es importante mencionar que debido a que hay más factores involucrados, no en todos los casos una elevada área superficial es sinónimo de una elevada carga enzimática, esto lo podemos ver reflejado continuando con el ejemplo del soporte SBA-16 cuya área superficial es de $445.2\text{ m}^2/\text{g}$ (Aburto et al., 2005) pero que retuvo el 10% de enzima en comparación con las arcillas modificadas.

Estandarización de las condiciones de reacción

La cantidad óptima de enzima y de peróxido de hidrógeno fueron establecidas para los objetivos de este proyecto. Específicamente, para degradar una concentración final de sulfametoxazol $20\ \mu\text{M}$ en un rango de 10 a 15 minutos con la cloroperoxidasa en su forma libre. De manera general, las concentraciones de enzima requeridas son muy pequeñas si las relacionamos con su eficiencia en la degradación del sulfametoxazol, por lo que la degradación resulta eficiente (Zhang et al., 2016). La cantidad de peróxido de hidrógeno que se requirió en esta reacción también fue mínima.

Actividad enzimática de la cloroperoxidasa en su forma libre e inmovilizada

Los resultados mostraron un decremento de la actividad enzimática debido a la inmovilización de la cloroperoxidasa en ambas arcillas, esto se ve reflejado inicialmente en que, para obtener resultados en el tiempo previamente establecido con la enzima libre (15 minutos) fue necesario aumentar 10 veces la concentración de enzima inmovilizada. También se observó en las constantes de reacción obtenidas (Tabla 4) cuyos valores fueron -0.2586 , -0.0966 y -0.0494 para la enzima libre e inmovilizada en arcillas modificadas con ZrO_2 y TiO_2 , respectivamente. En ambos casos, la constante de reacción de la cloroperoxidasa inmovilizada fue

menor que la de la enzima libre. Estas constantes se obtuvieron del modelo que se ajusta a una reacción de pseudo primer orden, y reflejan proporcionalidad entre la velocidad de reacción de la cloroperoxidasa y la concentración de sulfametoxazol (Berg et al., 2007). Con esta constante se puede predecir dentro de un rango de concentraciones de sulfametoxazol (menores a 26.66 μM), el valor de la velocidad de reacción. Para los propósitos de este trabajo, no fue necesaria la caracterización cinética completa, ya que la concentración de sulfametoxazol en ambientes acuáticos es muy baja, y la enzima tanto libre como inmovilizada seguiría una cinética como la presentada en las Figuras 6 y 7.

En el caso de la cloroperoxidasa inmovilizada, la pérdida de actividad enzimática podría deberse a la distribución física de la enzima en las arcillas, causando que el sitio activo fuera menos accesible para el sustrato. Además de que la transferencia de masa podría ser limitada y la flexibilidad de la enzima podría estar restringida afectando su rendimiento (Terrés et al., 2008). Esto es consistente con los resultados de otros trabajos de inmovilización de la cloroperoxidasa en materiales mesoporosos (Aburto et al., 2005; Terrés et al., 2008). Sin embargo, en algunos casos se mejora la actividad enzimática de enzimas como las peroxidasas (Guerrero et al., 2013; Wang et al., 2011) por lo que se podrían probar otros soportes o métodos de inmovilización para la cloroperoxidasa. Incluso las arcillas modificadas con ZrO_2 y TiO_2 podrían probarse con otras enzimas.

También es posible que la inactivación de la cloroperoxidasa esté ocurriendo por efecto de la reacción entre un intermediario y la enzima, por lo que la diferencia entre la capacidad de reutilización de la cloroperoxidasa inmovilizada en las arcillas modificadas sería una consecuencia de la forma en que la enzima y el soporte están interaccionando. Con la enzima inmovilizada en arcilla modificada con ZrO_2 la interacción podría llevarse a cabo en la superficie, por lo que los productos de la reacción afectarían menos a la enzima que en el caso de la arcilla modificada con TiO_2 donde la reacción podría estar ocurriendo dentro del poro y los intermediarios podrían interaccionar con la enzima más fácilmente.

Efecto del pH y la temperatura en la actividad de la cloroperoxidasa en su forma libre e inmovilizada

La importancia de evaluar la estabilidad enzimática ante diferentes condiciones ambientales para su aplicación en biorremediación, por ejemplo en un sistema de tratamiento de aguas residuales, se debe principalmente a que las enzimas libres pueden ser fácilmente inactivadas por factores como la temperatura y el pH, mientras que la inmovilización en la mayoría de los casos confiere estabilidad a las enzimas.

Efecto de la temperatura.

Los ensayos de degradación a diferentes temperaturas mostraron que la temperatura óptima de la cloroperoxidasa, tanto en su forma libre como inmovilizada es cercana a la temperatura ambiente (23-26 °C), esto es conveniente pues la cloroperoxidasa podría aplicarse como tratamiento biológico sin un requerimiento extra de energía.

Con respecto a la cloroperoxidasa inmovilizada los resultados mostraron que la actividad de la enzima se mantiene un poco más estable ante los cambios de temperatura, ya que en el rango de 25 °C a 45 °C (rango en el que la degradación se debe mayormente a la actividad enzimática) la actividad de la enzima libre se reduce en un 30% aproximadamente. En comparación, el decremento de actividad es menor cuando la enzima está inmovilizada, para la enzima inmovilizada en la arcilla modificada con ZrO₂ el porcentaje de decremento en la actividad es de 22% y para el caso de la enzima inmovilizada en la arcilla modificada con TiO₂ el porcentaje de decremento en la actividad es de 24%.

La unión de la enzima a un soporte generalmente reduce su flexibilidad estructural, y como consecuencia se le provee de estabilidad a la enzima, es común que al ocurrir esto disminuya la actividad enzimática (Yoo et al., 2017). De manera general, a temperatura ambiente (25 °C) la cloroperoxidasa inmovilizada en las arcillas modificadas con TiO₂ y con ZrO₂ degradó casi el mismo porcentaje de sulfametoxazol en 10 minutos y al ser inmovilizada en arcilla modificada con ZrO₂

la cloroperoxidasa sufrió una pérdida menor de la actividad enzimática cuando se aumentó la temperatura.

Una gran cantidad de fármacos, incluyendo al sulfametoxazol, son susceptibles a la descomposición química por factores ambientales como la humedad, la temperatura y el pH (Baertschi et al., 2016). El control realizado para determinar si en nuestras condiciones de reacción la concentración de sulfametoxazol disminuía por efecto de la temperatura, independientemente de la enzima, se encontró que a partir de 45 °C el aumento de temperatura y su interacción con el resto de los componentes presentes en la reacción conllevó a la degradación del sulfametoxazol y el porcentaje de degradación fue proporcional al aumento de temperatura, esto es consistente con la investigación llevada a cabo por Khanum et al. (2012) cuyos resultados demostraron que la concentración de sulfametoxazol se reducía por el efecto de la temperatura a más de 25 °C y el porcentaje de esta reducción aumentaba a medida que lo hacía la temperatura. Nuestros resultados mostraron que a 70 °C la cloroperoxidasa no participó en la degradación del sulfametoxazol.

Enzima inmovilizada en arcillas modificadas con ZrO₂ y sus controles.

La cloroperoxidasa inmovilizada en la arcilla con ZrO₂ presentó su mayor actividad a 25 °C, sin embargo, cuando este experimento se comparó con los controles pudimos observar que la arcilla modificada por sí sola adsorbía u oxidaba al sulfametoxazol a partir de 30 °C. Adicionalmente, el análisis de los controles mostró que a pesar de que el peróxido de hidrógeno no participó en la degradación de sulfametoxazol por sí solo, a temperaturas elevadas, este conocido agente oxidante, en sinergia con la arcilla modificada, catalizaron más rápidamente el sulfametoxazol que la arcilla sola bajo las mismas condiciones.

Enzima inmovilizada en arcillas modificadas con TiO₂ y sus controles

Para la cloroperoxidasa inmovilizada en la arcilla modificada con TiO₂, la temperatura óptima también fue cercana a 25 °C, sin embargo, a diferencia de la arcilla modificada con ZrO₂, esta arcilla por sí sola presentó actividad catalítica o de adsorción en todas las temperaturas ensayadas, de acuerdo con lo reportado por Rangel (2018) las arcillas modificadas son capaces de absorber y catalizar moléculas orgánicas como ácidos y alcoholes. Si para el caso del sulfametoxazol las arcillas están llevando a cabo un proceso de catálisis, esto representaría una ventaja para usarlo como soporte. La degradación enzimática solo estuvo presente hasta los 60 °C, similar a los otros dos casos (cloroperoxidasa libre y cloroperoxidasa inmovilizada en arcillas modificadas con ZrO₂). Por el contrario, a diferencia de la arcilla modificada con ZrO₂, no se observó una diferencia notable entre el control con arcilla y peróxido de hidrógeno y el control con arcilla únicamente, esto a temperaturas mayores a 40 °C, lo que indica que no hubo una sinergia entre estos dos componentes.

Para ambas arcillas resta por analizar si la arcilla por sí sola lleva a cabo un proceso de oxidación o de adsorción del sulfametoxazol, para determinar si es una ventaja que posee como soporte para inmovilizar enzimas.

Efecto del pH

Los ensayos de degradación de sulfametoxazol mediados por la cloroperoxidasa libre e inmovilizada llevados a cabo a diferentes condiciones de pH (3-6) demostraron que el pH óptimo para todos los casos fue cercano a 4, además, la enzima inmovilizada en las arcillas fue tan susceptible a la pérdida de actividad como lo fue la enzima libre, en un pH de 4 a 4.5 la enzima libre perdió aproximadamente un 56% de su actividad, la enzima inmovilizada en la arcilla modificada con TiO₂ perdió un 55% de su actividad y la enzima inmovilizada en la arcilla modificada con ZrO₂ perdió un 54%. A pesar de que esta tecnología podría ser aplicada en ambientes cuyas condiciones fisicoquímicas son muy variables,

como lo es la remediación de aguas residuales en una PTAR, cuyo pH depende completamente de la zona donde ésta se encuentra y del tipo de residuos presentes en las aguas residuales. Además, de acuerdo con las Normas Oficiales Mexicanas el pH de las aguas residuales puede estar entre 5 y 10 sin que esto represente ningún tipo de problema ambiental. Con la inmovilización se esperaba que el rango de pH óptimo de la cloroperoxidasa fuese más amplio, ya que, con un rango de pH óptimo limitado se tendrían que establecer pretratamientos para la modificación del pH en cualquier proceso de biorremediación en ambientes acuáticos para lograr que el tratamiento sea eficiente, lo que hace al proceso de biorremediación más costoso y complicado.

El hecho de que la cloroperoxidasa inmovilizada en ambas arcillas pierda un porcentaje similar de actividad enzimática frente a la temperatura y el pH sugiere que cuando la enzima está inmovilizada en arcilla modificada con TiO_2 no se genera un microambiente óptimo para mejorar la estabilidad de la enzima aunque esta pudiera alojarse dentro de los poros, esto podría deberse a que el volumen del poro no es suficientemente grande, ya que para un movimiento fluido los poros deben ser 3 veces mayores que la enzima (Buxbaum, 2011).

Reutilización de la enzima

Reutilizar una enzima inmovilizada en un proceso de degradación es de suma importancia por ser uno de los principales factores que hace posible reducir los costos de operación. En un proceso de biorremediación en ambientes acuáticos, la enzima libre no se puede recuperar para ser reutilizada. En este trabajo, aunque la eficiencia de la cloroperoxidasa después de 6 ciclos no se redujo significativamente, no fue posible recuperarla por no estar unida a un soporte, el experimento se realizó para tener un punto de comparación y así evaluar las ventajas de la inmovilización.

El número de ciclos en los que la cloroperoxidasa inmovilizada pudo ser reutilizada fue diferente en cada soporte, en el caso de la cloroperoxidasa inmovilizada en la arcilla modificada con TiO_2 la reutilización se limitó a 4 ciclos, similar a lo reportado

para la cloroperoxidasa inmovilizada en macroesferas de enzima-quitano (García-Zamora et al., 2018). En contraste, fue posible reutilizar la cloroperoxidasa inmovilizada en la arcilla modificada con ZrO_2 hasta por 6 ciclos de degradación de sulfametoxazol, manteniendo aproximadamente un tercio de su actividad.

Con otros soportes y sustratos se ha logrado reutilizar a la cloroperoxidasa inmovilizada hasta 12 veces sin una pérdida significativa de la actividad enzimática (Jin et al., 2018) por lo que sería interesante inmovilizar a la cloroperoxidasa con un método diferente, debido a que esta enzima tiene un enorme potencial para degradar al sulfametoxazol y a otros contaminantes emergentes, sin olvidar que el rendimiento de la enzima debe mejorarse lo suficiente para compensar los costos asociados al proceso de inmovilización, por lo que es necesario desarrollar y mejorar soportes en los que se pueda inmovilizar a la cloroperoxidasa.

A pesar de que la inmovilización de la cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago* permitió su reutilización hasta por 6 ciclos para la degradación de sulfametoxazol, y de que las arcillas muestran propiedades interesantes al ser utilizadas como soportes, estas ventajas no compensaron la pérdida de actividad enzimática. Además, el proceso de inmovilización no permitió ampliar el rango de temperatura y pH óptimos para la enzima y no hubo una diferencia significativa en cuanto a estabilidad enzimática ante estos dos factores, lo que sugiere que las arcillas modificadas o el método de inmovilización utilizado no son los adecuados para mejorar el proceso de degradación de sulfametoxazol mediado por la cloroperoxidasa.

Actualmente, existe un gran número de trabajos en donde se realiza la inmovilización enzimática, sin embargo, al igual que el presente trabajo, no todos han logrado mejorar las propiedades catalíticas de la enzima inmovilizada. En otros casos el elevado costo de los materiales utilizados como soporte o el proceso de inmovilización dan como resultado que los procesos no puedan tener una aplicación a gran escala, por lo que aún es necesaria la búsqueda de nuevos protocolos para lograr que las enzimas sean empleadas masivamente en procesos industriales y de biorremediación (Guisan, 2006).

Conclusión

- La inmovilización de la cloroperoxidasa en las arcillas modificadas es un método fácil, barato y resulta en una carga elevada de enzima por gramo de soporte comparándola con otros soportes mesoporosos.
- La actividad de la cloroperoxidasa inmovilizada se mantiene ligeramente más estable ante los factores temperatura y pH que la enzima libre.
- La inmovilización de la cloroperoxidasa en ambas arcillas resultó en una pérdida de más del 90% de la actividad enzimática en la degradación de sulfametoxazol y no logró modificar los rangos óptimos de pH y temperatura de la cloroperoxidasa.
- La arcilla modificada con TiO_2 presenta mejores cualidades para ser utilizada como soporte sólido que la arcilla modificada ZrO_2 , porque le confiere a la enzima más estabilidad ante pH y temperatura y por su capacidad para oxidar/absorber al sulfametoxazol a temperatura ambiente.
- El soporte que sería conveniente utilizar para aumentar la capacidad de reúso de la cloroperoxidasa es la arcilla modificada con ZrO_2 .

Anexos

Anexo 1

El volumen y la absorbancia obtenidos después de cada lavado se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Volumen y absorbancia correspondiente a cada lavado de los tubos que contenían las enzimas inmovilizadas en cada una de las arcillas modificadas.

Lavado	Enzima inmovilizada en arcilla modificada con TiO ₂		Enzima inmovilizada en arcilla modificada con ZrO ₂	
	Absorbancia	Volumen (μL)	Absorbancia	Volumen (μL)
1	0.0147	800	0.1656	500
2	0.0091	1000	0.0391	950
3	0.0093	1000	0.0432	1000

Para calcular la actividad de las micropartículas se suman los moles reportados para cada lavado de la cloroperoxidasa que no se adhirió a las arcillas y posteriormente se restan del número total de moles de cloroperoxidasa que había en cada vial. Para obtener el número de moles, primero se tiene que obtener la molaridad, para esto se usó el coeficiente de extinción (75.3 mM⁻¹cm⁻¹) molar de la cloroperoxidasa en la siguiente fórmula:

$$\text{Molaridad} = \frac{\text{Absorbancia}}{\text{Coeficiente de extinción molar}}$$

Después, la molaridad se convierte a número de moles utilizando el volumen que se recuperó y leyó en cada lavado, y se utiliza un factor de conversión de μM a L.

$$\text{Número de moles} = \text{Molaridad} * \text{Volumen}$$

Sustitución

Enzima inmovilizada en arcilla modificada con TiO₂

$$1.- \quad \text{Molaridad} = \frac{0.0147}{75.3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}} = 1.9548 \times 10^{-4} \text{ mM/L}$$

$$\begin{aligned} \text{Número de moles} &= 1.9548 \times 10^{-4} \frac{\text{mM}}{\text{L}} * 800 \mu\text{L} * (1 \times 10^{-6} \text{ L} / 1 \mu\text{L}) \\ &= 1.5662 \times 10^{-7} \mu\text{moles} \end{aligned}$$

Se sigue el mismo procedimiento para cada una de las lecturas de absorbancia obtenidas y finalmente se suman.

La suma del número de moles de cloroperoxidasa recuperado después de los lavados nos da los resultados siguientes:

- El número de moles que no se inmovilizaron en la arcilla modificada con TiO_2 :
 $4.011 \times 10^{-7} \mu\text{moles}$
- El número de moles que no se inmovilizaron en la arcilla modificada con ZrO_2 :
 $1.6946 \times 10^{-6} \mu\text{moles}$

Finalmente, se resta el número de moles de cloroperoxidasa presentes en los lavados del número total de moles de cloroperoxidasa puesto en el tubo para la inmovilización, que corresponde a $0.023 \mu\text{moles}$. Con este dato se obtiene el porcentaje de inmovilización, así como la enzima inmovilizada por gramo de soporte (el número de moles totales que se inmovilizó se divide entre 0.1 gramos de arcilla)

Para la enzima inmovilizada en arcilla con TiO_2 :

- $= 0.023 \mu\text{moles} - 4.011 \times 10^{-7} \mu\text{moles} = 0.0229999598 \mu\text{moles}$ que corresponde al 99.9982% de enzima que si se inmovilizo en las arcillas.

Para la enzima inmovilizada en arcilla con ZrO_2 :

- $= 0.023 \mu\text{moles} - 1.6946 \times 10^{-6} \mu\text{moles} = 0.022998305 \mu\text{moles}$ que corresponde al 99.9926% de enzima que si se inmovilizo en las arcillas.

Bibliografía

- Aburto, J., Ayala, M., Bustos-Jaimes, I., Montiel, C., Terrés, E., Domínguez, J. & Torres, E. (2005). Stability and catalytic properties of chloroperoxidase immobilized on SBA-16 mesoporous materials. *Microporous and Mesoporous Materials*, 83(1–3), 193–200. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2005.04.008>
- Arroyo, M. (1998) Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications. *Ars Pharmaceutica*, 39:2,
- Bartelt-hunt, S., Snow, D., Damon, T., Shockley, J., & Hoagland, K. (2009). The occurrence of illicit and therapeutic pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters in Nebraska. *Environmental Pollution* <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.11.025>
- Beltrán, F., Pocostales, P., Álvarez, P. & López-Piñero, F. (2009). Catalysts to improve the abatement of sulfamethoxazole and the resulting organic carbon in water during ozonation. *Applied Catalysis B: Environmental*, 92(3–4), 262–270. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2009.08.001>
- Benavides-Plascencia, L., Aldama-Ojeda, A. & Vázquez, H. (2005). Vigilancia de los niveles de uso de antibióticos y perfiles de resistencia bacteriana en hospitales de tercer nivel de la Ciudad de México. *Salud Pública de México*, 47(3), 219–226.
- Benotti, M., Trenholm, R., Vanderford, B., Holady, J., Stanford, B. & Snyder, S. (2009). Pharmaceuticals and Endocrine Disrupting Compounds in U . S . Drinking Water, *Environmental Science & Technology* 43(3), 597–603. <https://doi.org/10.1021/es801845a>
- Berlioz-Barbier, A., Vauchez, A., Wiest, L., Baudot, R., Vulliet, E., & Cren-Olivé, C. (2014). Multi-residue analysis of emerging pollutants in sediment using QuEChERS-based extraction followed by LC-MS/MS analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(4), 1259–1266. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7450-8>
- Bilal, M., Asgher, M., Iqbal, H., Hu, H., & Zhang, X. (2017). Bio-based degradation of emerging endocrine-disrupting and dye-based pollutants using cross-linked enzyme aggregates. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(8), 7035–7041. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8369-y>
- Bour, M. (2016) Biorremediación. *Encyclopedia of Estuaries. Enciclopedia de la serie de ciencias de la tierra*. Springer, Dordrecht
- Buxbaum, E. (2011) Enzimas inmovilizadas. *Química Biofísica De Las Proteínas*. Springer, Boston.
- Buchhaupt, M., Lintz, K., Hüttmann, S., & Schrader, J. (2018). Partial secretome analysis of *Caldariomyces fumago* reveals extracellular production of the CPO co-substrate H₂O₂ and provides a coproduction concept for CPO and glucose oxidase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(2), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2407-2>

- Carvalho, R., Lemos, F. & Cabral J. (2007) Influence of the presence of NaY zeolite on the activity of horseradish peroxidase in the oxidation of phenol. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 44:39–47
- Castro-Pastrana, L. I., Baños-Medina, M. I., Argelia López-Luna, M., & Torres-García, B. L. (2015). Ecofarmacovigilancia en México: perspectivas para su implementación. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 46(3). <http://www.redalyc.org/pdf/579/57945705003.pdf>
- Cepoi L. & Zinicovscaia I. (2016) Introducción. Cyanobacteria para la biorremediación de aguas residuales. Springer, Cham
- Chanwun, T., Muhamad, N., Chirapongsatunkul, N., & Churngchow, N. (2013). Hevea brasiliensis cell suspension peroxidase: purification, characterization and application for dye decolorization. *AMB Express*, 3, 1–9.
- Chemistry, A. (2006). Enzymes immobilized on montmorillonite K10.pdf, *Applied Clay Science*, 88(1), 3–9. <https://doi.org/10.1556/RKCL.88.2006.1.1>
- Cheng, J., Yu, S. & Zuo, P. (2006) Peroxidasa de rábano picante inmovilizada en arcilla interpilada de pilares de aluminio para la oxidación catalítica de aguas residuales fenólicas. *Water Research*, 40: 283–290
- Chopra, S. & Kumar, D. (2018) Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) as Emerging Environmental Pollutants: Toxicity and Risk Assessment. *Advances in Animal Biotechnology and its Applications*. Springer, Singapore
- Choubert, J., Ribeiro, L., Euse, M., Coquery, M. & Mie, C. (2009). Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants – Conception of a database and first results, *Environmental Pollution* 157, 1721–1726. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.11.045>
- Chun, S., An, S., Lee, S., Kim, J. & Chang, S. (2014). Optimization of sulfamethoxazole degradation by TiO₂/hydroxyapatite composite under ultraviolet irradiation using response surface methodology. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 31(6), 994–1001. <https://doi.org/10.1007/s11814-014-0027-1>
- Coelho, C., de Lencastre, H. & Aires-de-Sousa, M. (2017). Frequent occurrence of trimethoprim-sulfamethoxazole hetero-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in different African countries. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 36(7), 1243–1252. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-2915-x>
- Comision Nacional del Agua (CONAGUA). (2015). Contaminantes emergentes en matrices ambientales. México. D.F.
- Conesa, A., Velde, F. Van De, Rantwijk, F. Van, Sheldon, R., Hondel, C., Van Den, & Punt, P. (2001). Expression of the *Caldariomyces fumago* Chloroperoxidase in *Aspergillus niger* and Characterization of the Recombinant Enzyme, *Journal of biological chemistry*. 276(21), 17635–17640.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M010571200>

- Gámez, G. (2017). Chloroperoxidase and D -fructose-6-phosphate aldolase in enzymatic cascade reactions for the synthesis of iminocyclitols. *ChemInform* 62(11):2648-2656. <https://doi.org/j.tet.2005.12.031>
- Dwevedi, A. (2016) Enzyme Immobilization: Solution Towards Various Environmental Issues. *Enzyme Immobilization*. Springer, Cham
- Dirany, A., Efremova, S., Oturan, N., Sirés, I., Oturan, M. & Aaron, J. (2011). Study of the toxicity of sulfamethoxazole and its degradation products in water by a bioluminescence method during application of the electro-Fenton treatment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400(2), 353–360. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4441-x>
- Eibes, G., Arca-Ramos, A., Feijoo, G., Lema, J. & Moreira, M. (2015). Enzymatic technologies for remediation of hydrophobic organic pollutants in soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(21), 8815–8829. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6872-y>
- Eş, I., Vieira, J. & Amaral, A. (2015). Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(5), 2065–2082. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6390-y>
- Esquisabel, A., Hernández, R., Gascón, A., Pedraz, J. (2006) Immobilized Enzymes for Biomedical Applications. *Immobilization of Enzymes and Cells. Methods in Biotechnology™*, vol 22. Humana Press
- Fang-fang, Z., Dan, Q. & Yu, G. (2012). Microbial degradation of estrogens in the environment, *Microbiology China*, 39(3502), 3573–3582.
- Farzin, L., Shamsipur, M., Samandari, L. & Sheibani, S. (2018). Advances in the design of nanomaterial-based electrochemical affinity and enzymatic biosensors for metabolic biomarkers: A review. *Microchimica Acta*, 185(5). <https://doi.org/10.1007/s00604-018-2820-8>
- Gaffney, D., Cooney, J., & Magner, E. (2012). Modification of mesoporous silicates for immobilization of enzymes. *Topics in Catalysis*, 55(16–18), 1101–1106. <https://doi.org/10.1007/s11244-012-9899-7>
- García-Zamora, J., León-Aguirre, K., Quiroz-Morales, R., Parra-Saldívar, R., Gómez-Patiño, M., Arrieta-Baez, D., Torres, E. (2018). Chloroperoxidase-Mediated Halogenation of Selected Pharmaceutical Micropollutants. *Catalysts*, 8(1), 32. <https://doi.org/10.3390/catal8010032>
- Giraldo, L., Franco, E. & Arango, J. (2004). La fotocatalisis como alternativa para el tratamiento de aguas residuales. *Revista Lasallista de Investigación*, 1(1), 83–92.
- Gooch, J. (2011) Resina sintética (polímero sintético). Diccionario Enciclopédico de Polímeros. Springer, Nueva York, NY.

- González, O., Sans, C. & Esplugas, S. (2007). Sulfamethoxazole abatement by photo-Fenton. *Journal of Hazardous Materials*, 146(3), 459–464. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.04.055>
- Guerrero, E., Aburto, P., Terrés, E., Villegas, O., González, E., Zayas, T., Torres, E. (2013). Improvement of catalytic efficiency of chloroperoxidase by its covalent immobilization on SBA-15 for azo dye oxidation. *Journal of Porous Materials*, 20(2), 387–396. <https://doi.org/10.1007/s10934-012-9608-8>
- Guisan, J. (2006) Inmovilización de enzimas a medida que comienza el siglo XXI. Inmovilización de enzimas y células. *Methods in Biotechnology*, vol 22. Humana Press
- Hawumba, J., Sseruwagi, P., Hung, Y., Wang L. (2010) Biorremediación. Bioingeniería Ambiental. *Manual de Ingeniería Ambiental*, vol 11. Humana Press, Totowa, NJ.
- Herrera, J. (2016). *Evaluación de la remoción de contaminantes emergentes de aguas superficiales utilizando humedales de tratamiento*. (Tesis doctoral). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.
- Herzog, B., Lemmer, H., Horn, H. & Müller, E. (2013). Characterization of pure cultures isolated from sulfamethoxazole-acclimated activated sludge with respect to taxonomic identification and sulfamethoxazole biodegradation potential. *BMC Microbiology*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-276>
- Huber, R., Bennett, W. & Schulz G. (1982) Las enzimas como catalizadores biológicos. Biofísica. Springer, Berlín, Heidelberg
- Hussain, S., Gul, S., Steter, J., Miwa, D. & Motheo, A. (2015). Route of electrochemical oxidation of the antibiotic sulfamethoxazole on a mixed oxide anode. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(19), 15004–15015. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4699-9>
- Husain, Q. (2019) Remediation of Phenolic Compounds from Polluted Water by Immobilized Peroxidases. *Emerging and Eco-Friendly Approaches for Waste Management*. Springer, Singapore
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Pascarella, L. & Parrella, A. (2005). Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms, *Science of The Total Environment*, 346, 87–98. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.11.017>
- Jeremy, M., Lubert, S., Tymoczko, J. (2007) *Bioquímica*. Barcelona, España. Reverte.
- Jin, X., Li, S. & Long, N. (2018). Improved Biodegradation of Synthetic Azo Dye by Anionic Cross-Linking of Chloroperoxidase on ZnO / SiO₂ Nanocomposite Support, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1009–1023. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2607-0>
- Khanum, N., Ansari, T., Khan, H., Sajid-Ur-Rehman, M., & Khan, Y. (2012). Influence of ph and temperature on stability of sulfamethoxazole alone and in combination

- with trimethoprim (co trimoxazole). *Asian Journal of Chemistry*, 24(4), 1851–1854.
- Kılıç N., Nasiri F., Cansaran-Duman D. (2016) Aplicaciones de la enzima fúngica de la lacasa en la biorremediación de aguas residuales contaminadas. *Phytoremediation*. Springer, Cham
- Kotzerke, A., Sharma, S., Schauss, K. & Heuer, H. (2008). Alterations in soil microbial activity and N -transformation processes due to sulfadiazine loads in pig-manure, *Environmental Pollution*, 153. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.08.020>
- Krajewska, B. (2014). Enzyme immobilization by adsorption: a review modifier enzyme, *Adsorption*, 801–821. <https://doi.org/10.1007/s10450-014-9623-y>
- Larcher, S., & Yargeau, V. (2012). Biodegradation of sulfamethoxazole: Current knowledge and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(2), 309–318. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4326-3>
- Li, C., Wang, L., Jiang, Y., Hu, M., Li, S. & Zhai, Q. (2011). Activity and stability of chloroperoxidase in the presence of small quantities of polysaccharides: A catalytically favorable conformation was induced. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165(7–8), 1691–1707. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9388-7>
- Lin, A., Lin, C., Chiou, J. & Hong, P. (2009). O₃ and O₃/H₂O₂ treatment of sulfonamide and macrolide antibiotics in wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 171(1–3), 452–458. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.06.031>
- Longoria, A., Tinoco, R., Torres, E. (2010) Enzyme Technology of Peroxidases: Immobilization, Chemical and Genetic Modification. *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases*. Springer, Berlin, Heidelberg
- Longoria, A. M., Hu, H. & Vazquez-Duhalt, R. (2010). Enzymatic synthesis of semiconductor polymers by chloroperoxidase of *Caldariomyces fumago*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(4), 927–934. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8805-7>
- Luo, X., Wang, P., Cheng, J., Luo, Y., Dai, L., Zhou, X. & Xiao, J. (2016). Characterization of virulence genes and antimicrobial resistance of lung pathogenic *Escherichia coli* isolates in forest musk deer (*Moschus moschiferus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 47(2), 540–550. <https://doi.org/10.1638/2014-0167.1>
- Matthews, R. (1996) One-carbon metabolism. *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, 1: 600-611. Second
- McAuliffe, J. (2012) Industrial Enzymes and Biocatalysis. *Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology*. Springer, Boston, M.A.
- Meguenni, N., Le Devendec, L., Jouy, E., Le Corvec, M., Bounar-Kechih, S., Bakour, R. & Kempf, I. (2015). First Description of an Extended-Spectrum

- Cephalosporin- and Fluoroquinolone-Resistant Avian Pathogenic *Escherichia coli* Clone in Algeria. *Avian Diseases*, 59(1), 20–23. <https://doi.org/10.1637/10804-022414-Reg.1>
- Montellano P. (2010) Catalytic Mechanisms of Heme Peroxidases. Biocatalysis Based on Heme Peroxidases. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Montiel C., Terrés E. & Domínguez J.M. (2007). Inmovilización de cloroperoxidasa en materiales a base de sílice para la oxidación de 4,6-dimetil dibenzotiofeno. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 48: 90–98
- Mougin C., Boukcim H. & Jolivalt C. (2009). Soil Bioremediation Strategies Based on the Use of Fungal Enzymes. *Advances in Applied Bioremediation. Soil Biology*, vol 17. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Miert, A., Van, R. S., Gong, Y., Zhang, J., Fung, P., Wang, P. W. & He, Z. (1994). The sulfonamide-diaminopyrimidine story. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 17(4), 309–316. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1994.tb00251.x>
- Mukherjee, S. (2013). Clays: Applications in Industry, Engineering and Environment: The Science of Clays. Springer, Dordrecht
- Nasuhoglu, D., Yargeau, V., & Berk, D. (2011). Photo-removal of sulfamethoxazole (SMX) by photolytic and photocatalytic processes in a batch reactor under UV-C radiation ($\lambda_{max}=254nm$). *Journal of Hazardous Materials*, 186(1), 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.10.080>
- Navanietha, R., David, A., Sani, R. (2017) Fundamentals of Enzymatic Processes: Extremophilic Microbial Processing of Lignocellulosic Feedstocks to bioenergy. Springer, Cham.
- Nnadozie, C. F., Kumari, S., & Bux, F. (2017). Status of pathogens, antibiotic resistance genes and antibiotic residues in wastewater treatment systems. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 16(3), 491–515. <https://doi.org/10.1007/s11157-017-9438-x>
- NORMAN. (2016). Network of reference laboratories, research centres and related organisations for monitoring of emerging environmental substances: List of emerging substances. <https://www.norman-network.net/?q=node/19>
- Mohamad, N., Marzuki, N., Buang, N., Huyop, F. & Wahab, R. (2015) An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29: 2, 205-220 , DOI: 10.1080 / 13102818.2015.1008192
- Oh, W., Chang, V. & Lim, T. (2017). A comprehensive performance evaluation of heterogeneous $Bi_2Fe_4O_9$ /peroxymonosulfate system for sulfamethoxazole degradation. *Environmental Science and Pollution Research*, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8476-9>
- Piotrowska-Długosz, A. (2017) The Use of Enzymes in Bioremediation of Soil

- Xenobiotics. *Xenobiotics in the Soil Environment*. Soil Biology, vol 49. Springer, Cham.
- Ramírez-Castillo, F., Moreno-Flores, A., Avelar-González, F., Márquez-Díaz, F., Harel, J. & Guerrero-Barrera, A. (2018). An evaluation of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates in urinary tract infections from Aguascalientes, Mexico: Cross-sectional study. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 17(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12941-018-0286-5>
- Rangel, P. (2018). *Posibles mecanismos de reacción de esterificación de ácidos carboxílicos sobre arcillas modificadas*. Tesis Doctoral. Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México.
- Robledo-Zacarías, V., Velázquez-Machuca, M., Montañez-Soto, J., Pimentel-Equihua, J., Vallejo-Cardona, A., López-Calvillo, M. & Venegas-González, J. (2017). Hidroquímica y contaminantes emergentes en aguas residuales urbano industriales de Morelia, Michoacán, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33(2), 221-235. doi:<http://dx.doi.org/10.20937/RICA.2017.33.02.04>
- Rodríguez-Alegría, M. & Castillo-Rosales, E. (2014). Enzimas aplicadas en procesos industriales. *Revista digital universitaria UNAM*. Volumen (15).
- Sági, G., Csay, T., Pátzay, G., Csonka, E., Wojnárovits, L., & Takács, E. (2014). Oxidative and reductive degradation of sulfamethoxazole in aqueous solutions: Decomposition efficiency and toxicity assessment. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 301(2), 475–482. <https://doi.org/10.1007/s10967-014-3134-x>
- Sanchez, W. & Egea, E. (2018). Health and environmental risks associated with emerging pollutants and novel green processes. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(7), 6085–6086. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1372-0>
- Souto, M., Coura, F., Dorneles, E., Stynen, A., Alves, T., Santana, J., Lage, A. (2017). Antimicrobial susceptibility and phylotyping profile of pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolates from calves and pigs in Minas Gerais, Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, 49(1), 13–23. <https://doi.org/10.1007/s11250-016-1152-0>
- Steven, W., Baertschi, K. & Alsante, R. (2016). *Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation*, Second Edition. London, UK. Informa healthcare.
- Sundaramoorthy, M., Terner, J. & Poulos, T. L. (1995). The crystal structure of chloroperoxidase: a heme peroxidase-cytochrome P450 functional hybrid. *Structure*, 3(12), 1367–1378. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00274-X](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00274-X)
- Takahashi, H., Li, B. & Sasaki T. (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*.12:3301–3305

- Terrés, E., Montiel, M., Le Borgne, S. & Torres, E. (2008). Immobilization of chloroperoxidase on mesoporous materials for the oxidation of 4,6-dimethyldibenzothiophene, a recalcitrant organic sulfur compound present in petroleum fractions. *Biotechnology Letters*, 30(1), 173–179.
- Tim aus der Beek, T., Weber, F., Bergmann, A., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A. & Küster, A. (2016), Pharmaceuticals in the environment—Global occurrences and perspectives. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35: 823–835. doi:10.1002/etc.3339
- Trobos, M., Christensen, H., Sunde, M., Nordentoft, S., Agero, Y. & Simonsen, G. (2009). Characterization of sulphonamide-resistant *Escherichia coli* using comparison of sul2 gene sequences and multilocus sequence typing. *Microbiology*.155 (Pt 3):831–6. <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9512-5>
- Torres, E., Bustos-Jaimes, I. & Le Borgne, S. (2003). Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Applied Catalysis B: Environmental*, 46(1), 1–15. [https://doi.org/10.1016/S0926-3373\(03\)00228-5](https://doi.org/10.1016/S0926-3373(03)00228-5)
- Varjani, S. & Chaithanya, S. (2018) Treatment Technologies for Emerging Organic Contaminants Removal from Wastewater. Energy, Environment, and Sustainability. Springer, Singapore
- Van Deurzen, M., Van Rantwijk, F., & Sheldon, R. (1996). Synthesis of substituted oxindoles by chloroperoxidase catalyzed oxidation of indoles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2(1), 33–42. [https://doi.org/10.1016/1381-1177\(96\)00008-2](https://doi.org/10.1016/1381-1177(96)00008-2)
- Wang, Y., Wu, J., Ru, X., Jiang, Y., Hu, M., Li, S. & Zhai, Q. (2011). Catalytic performance and thermostability of chloroperoxidase in reverse micelle: Achievement of a catalytically favorable enzyme conformation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(6), 717–724. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0852-0>
- Wu, J., Liu, C., Jiang, Y., Hu, M., Li, S., & Zhai, Q. (2010). Synthesis of chiral epichlorohydrin by chloroperoxidase-catalyzed epoxidation of 3-chloropropene in the presence of an ionic liquid as co-solvent. *Catalysis Communications*, 11(8), 727–731. <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2010.02.003>
- Yan, N., Xia, S., Xu, L., Zhu, J., Zhang, Y. & Rittmann, B. (2012). Internal loop photobiodegradation reactor (ILPBR) for accelerated degradation of sulfamethoxazole (SMX). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(2), 527–535. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3742-0>
- Yesilada, O., Birhanli, E., Geckil, H. (2018) Biorremediación y Decoloración de Colorantes Textiles por White Rot Fungi y Laccase Enzymes. Mycoremediation y Environmental Sustainability. Biología Fúngica. Springer, Cham
- Yoo, Y., Feng Y., Kim Y. & Yagonia C. (2017) Enzima inmovilizada. Fundamentos de Ingeniería de Enzimas. Springer, Dordrecht.

- Zhang, A., Yang, Y., Wang, H., Lei, C., Xu, C., Guan, Z., Peng, L. (2015). Prevalence of sulfonamide and florfenicol resistance genes in *Escherichia coli* isolated from yaks (*bos grunniens*) and herdsmen in the tibetan pasture. *Journal of Wildlife Diseases*, 51(3), 626–633. <https://doi.org/10.7589/2014-09-234>
- Zhang, L., Bai, C., Wang, Y., Jiang, Y., Hu, M., Li, S. & Zhai, Q. (2009). Improvement of chloroperoxidase stability by covalent immobilization on chitosan membranes. *Biotechnology Letters*, 31(8), 1269–1272. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0009-2>
- Zhang, X., Li, X., Jiang, Y., Hu, M., Li, S. & Zhai, Q. (2016). Combination of enzymatic degradation by chloroperoxidase with activated sludge treatment to remove sulfamethoxazole: performance, and eco-toxicity assessment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91(11), 2802–2809. <https://doi.org/10.1002/jctb.4888>
- Zhou, Z. & Hartmann, M. (2012). Recent Progress in Biocatalysis with Enzymes Immobilized on Mesoporous Hosts, *Topics in Catalysis* 1081–1100. <https://doi.org/10.1007/s11244-012-9905-0>