

## **1. Introducción y objetivos**

Las peroxidasas conforman una familia de isoenzimas presentes en casi todo organismo vivo, y pertenecen a la clase de oxidoreductasas. Pueden ser clasificadas en dos grandes familias con diferentes orígenes (Passardi 2007), las animales y las no animales. Por lo general, estas enzimas contienen un grupo hemo y llevan cabo la oxidación de especies reactivas de oxígeno, como por ejemplo, el peróxido de hidrógeno. El ciclo general involucra la reacción de la enzima en estado nativo al compuesto I, después compuesto II y finalmente de regreso al estado nativo (Dunforf 1999).

Existen muchos tipos de peroxidasas y llevan a cabo distintas funciones dependiendo el organismo y su lugar de acción. En los animales, las peroxidasas tienen

funciones específicas a nivel de órganos, tejidos y células. Algunas de estas peroxidases incluyen las glutatión peroxidases, mieloperoxidasas, peroxidases eosinofílicas, lactoperoxidasas, peroxidases salivales y peroxidases tiroideas (Klebanoff 2005). Estas enzimas son de gran importancia en actividades metabólicas y están relacionadas con diferentes enfermedades, como el asma (Sanz 1997), enfermedades convulsivas (Kawakami et al. 2006) y enfermedades vasculares inflamatorias (Lau 2006). De igual manera participan en la oxidación de drogas, desintoxicación, sistema inmunológico y en enfermedades inflamatorias (Lubos et al. 2011). Por otro lado, las peroxidases de plantas están implicadas en muchos procesos biológicos y fisiológicos, como en el cross-linking de moléculas en la pared celular, oxidación de auxinas y respuestas al estrés biótico y abiótico (Kawano 2003).

Por su actividad de reducción-oxidación, las peroxidases son capaces de actuar sobre una variedad de compuestos aromáticos en la presencia de peróxido de hidrógeno. Es por eso que se han utilizado en técnicas para intentar solucionar problemas graves vinculados a la presencia de contaminantes en el agua, como son algunos fármacos (Kolpin et al. 2002). Estas técnicas se han usado, dado que los procesos tradicionales de tratamiento de aguas (coagulación, floculación y sedimentación) no logran eliminar a los fármacos por completo (Doll y Frimmel 2003). Estas sustancias causan efectos tóxicos sobre humanos y animales, aún a bajas concentraciones (Ferrari et al. 2003) y muchos son carcinógenos. Dentro de las complicaciones se encuentran irritación en piel, daño capilar, dolor abdominal, cefaleas, etc.

Con el crecimiento de la población y el aumento de las actividades industriales, la contaminación del agua también se ha incrementado. Los compuestos fenólicos como bisfenol A, pentaclorofenol, 4-nonilfenol, triclosan, etc. son contaminantes tóxicos y

disruptores endocrinos presentes en aguas residuales (Lee y Peart 2002). La contaminación generalizada del agua por estos compuestos fenólicos ha sido recocida como un tema de creciente importancia desde hace algunos años (Idrish y Saed 2002). Los métodos actuales usados para la eliminación de materiales fenólicos en agua incluyen degradación microbiana, adsorción en carbon activado, oxidación química o extracción con solventes. Sin embargo, por las desventajas de estos métodos, como baja eficacia, costos altos y generación de productos más tóxicos que los fenoles tratados (Hejri y Saboor 2009), se han implementado técnicas con enzimas para resolver este problema.

Existen muchos estudios en los que se ha logrado una efectiva descontaminación de sustancias tóxicas en agua (compuestos azo, pentaclorofenoles, p-clorofenol, tetraclorofenoles, etc.), utilizando peroxidasas de rábano (Stanisavljevic y Nedic 2004) y de otras plantas (Salah-Hamad y Ali-Ahmed 2013). Sin embargo, los métodos pueden ser muy costosos, ya que las enzimas no pueden reutilizarse y su baja estabilidad limita su aplicación. Por lo anterior, se han hecho estudios de inmovilización de este tipo de enzimas en distintas superficies como soportes porosos, perlas de vidrio o magnetita, obteniendo resultados exitosos (Gholami-Borujeni et al. 2011; Liu et al. 2011; Dalal y Gupta 2007).

Una inmovilización de la peroxidasa de rábano en papel filtro y nylon logró remover más del 80% del fenol en soluciones acuosas (Siddique et al. 1993), y una inmovilización en perlas de vidrio por unión covalente logró remover el 95% de fenol (Singh y Singh 2005); sin embargo otros autores reportan únicamente el 25% de retiro de fenoles con la inmovilización en perlas de vidrio por unión covalente (Lai y Lin 2005).

La estabilización de la peroxidasa de rábano puede incrementarse mediante cross-linking químico, ingeniería de proteínas, ingeniería de medios (Fernandez-Lafuente 2009) o finalmente mediante su inmovilización (Guzik 2014). Ésta última permite la separación y

reutilización de dichas enzimas tras su uso, logrando una disminución en el costo del tratamiento de aguas. Por último, se ha reportado que las enzimas inmovilizadas muestran una mayor selectividad y especificidad (García-Galan 2011), no obstante su sitio activo puede ser bloqueado durante la inmovilización y las enzimas pueden llegar a desnaturalizarse en el proceso (Guzik 2014). Descubrimientos recientes en nanotecnología muestran una variedad de materiales con mejores características para la inmovilización de enzimas (Hwang 2013). Las nanopartículas son consideradas como un soporte ideal para inmovilizar enzimas gracias a sus mínimas limitaciones difusionales, un máximo de área por unidad de masa y su alta capacidad de cargar enzimas (Netto 2013). Las nanopartículas de óxido de hierro han sido usadas ampliamente en muchos campos para la separación de productos y con una fácil modificación con compuestos inorgánicos, puede usarse para obtener nuevos soportes magnéticos (Ansari 2012).

Es por ello que en este estudio se pretende buscar nuevos soportes para llevar a cabo la inmovilización de la peroxidasa de rábano y evaluar su actividad. La inmovilización se realizará sobre nanopartículas magnéticas no antes probadas, específicamente ferrita de manganeso y de cobalto, y se probarán en una solución con fenol como sustrato. También se realizará la inmovilización en vidrio para la comparación de los 3 sistemas.