

2. Materiales y métodos

2.1. Reactivos químicos

Peroxidasa de rábano, peróxido de hidrógeno (30% w/v), glutaraldehído (25%), (3-Aminopropil)trietoxisilano (APTES), cloruro de manganeso (II) ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), cloruro de cobalto (II) (CoCl_2), cloruro de hierro (III) (FeCl_3), 4-aminoantipirina y fenol se adquirieron de Sigma-Aldrich. Todo material adicional fue de grado de alta pureza. Para las mediciones espectrofotométricas se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu UV800.

2.2. Inmovilización enzimática

2.2.1. Inmovilización en sílice

La inmovilización en sílice se realizó en material de vidrio de laboratorio (vasos de precipitados, tubos de ensaye, placas petri, portaobjetos, etc.). El proceso de inmovilización se llevó a cabo con base en los pasos descritos por Bódalo y colaboradores (Gómez et al. 2006), pero con algunas modificaciones:

Preparación del soporte. Todo el material de vidrio se lavó con solución piraña, preparada con 3 partes de ácido sulfúrico y una parte de peróxido de hidrógeno, a 100°C por 60 minutos y posteriormente enjuagado con agua destilada. El material se dejó secar en la mufla 24 horas a 110°C.

Activación del soporte. Las superficies del material a utilizar se activaron con una solución 1:10 de γ -APTES (10% v/v) y agua destilada, ajustando el pH entre 3 y 4 con HCl 6N. El material bañado en la solución se colocó a 75°C en la mufla por 2 horas, agitando el material cada 15-20 minutos. El material silanizado se lavó con agua destilada y dejó secar por la noche a 110°C. El producto resultante se puede guardar para uso posterior.

Inmovilización en sílice-glutaraldehído.

Se preparó una solución de glutaraldehído 2.5% con buffer fosfato 0.05 M a pH 7. El material de vidrio se trató con la solución y se dejó en agitación por 60 minutos. Tras lavar el material con el mismo buffer se añadió 131.75 µl de solución con enzima con concentración 0.1518 mg/ml y se dejó durante la noche a 4°C. El sobrenadante del material con la enzima inmovilizada se separó y guardó para la determinación del total de enzima inmovilizada; el material se lavó con buffer fosfato y almacenó en suspensión con el mismo hasta su uso a temperatura ambiente.

2.2.2. Inmovilización en nanopartículas magnéticas

La síntesis de la nanopartículas magnéticas de cobalto y manganeso (CoFe_2O_4 y MnFe_2O_4) se realizó siguiendo el protocolo realizado por Pereira y colaboradores (Pereira et al., 2012). 10 mmol de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ fueron disueltos en una solución de 1 ml de HCl (37%) y 4 ml de agua destilada respectivamente; 20 mmol de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ se disolvieron en 40 ml de agua. Ambas soluciones se llevaron a una temperatura de 50°C, se mezclaron y rápidamente se le añadieron a 200 ml de NaOH 0.1 M a 100°C. Las soluciones estuvieron bajo agitación durante 1 hora. Los precipitados de color negro se dejaron enfriar a temperatura ambiente y fueron separados magnéticamente, lavándolos 5 veces con agua destilada y suspendiéndolos finalmente en 50 ml de solución buffer fosfato.

La peroxidasa se inmovilizó en las nanopartículas mediante la adsorción física. Se agregaron 2 ml de una solución 0,32 mg/ml de la enzima a 30 ml de solución con las nanopartículas y se dejaron en agitación a temperatura ambiente durante 24 horas. Finalmente se lavó la solución con el mismo buffer fosfato para deshacerse de toda la

enzima que no se inmovilizó. Dicho sobrenadante se guardó para el calcular el total de enzima inmovilizada.

2.3. Medición de actividad enzimática

Se analizó la actividad enzimática de la peroxidasa de rábano con base en el método con 4-aminoantipirina (Am-NH₂) (Nicell y Wright 1997). Para ello se realizó una mezcla con volumen total de 4 ml: 1 ml de fenol 0.1 M; 1 ml de 4-AAP 0.01M; 1 ml de H₂O₂ 0.8mM; alícuota de solución con enzima y completado con buffer fosfato pH 6. La concentración activa enzimática es proporcional a la formación de color medido a 510 nm. La reacción también se llevó a cabo con una concentración de fenol 5mM, la cual es la concentración media de compuestos fenólicos aguas residuales.

Con la finalidad de saber el grado de reutilización de la enzima inmovilizada, el proceso de medición enzimática se repitió y calculó en porcentaje de actividad en cada ciclo de reacción.

2.3.1. Actividad enzimática en inmovilización con manganeso y cobalto

En una celda de espectrofotómetro de 1 cm de grosor se mezclaron en volumen total de 4 ml los reactivos mencionados con anterioridad, se dejó correr el cronómetro y cada 3 minutos se medía la actividad. Para eliminar la indeseada absorción de luz por las nanopartículas, éstas fueron reunidas previo a la medición en la pared de la celda con el uso del campo magnético de un imán colocado en directa proximidad de la celda. Éste imán contaba con las mismas dimensiones que las celdas. Cada medición se hizo por duplicado.

2.3.2 Actividad enzimática en inmovilización con vidrio

De igual manera que en el sistema de nanopartículas magnéticas, el volumen total de la reacción enzimática en inmovilización con vidrio fue de 4 ml. Para su medición se tomó 1 ml de la solución y puso en una celda espectrofotométrica. Tras cada medición, la solución fue regresada al sistema de vidrio para que la reacción continuara.

2.4. Determinación de proteína

La cantidad de proteína añadida a los sistemas para su inmovilización se determinó mediante dos métodos, dependiendo de las condiciones del medio en el que se encontraba la enzima. Por un lado se utilizó el método de Bradford, usando albúmina de suero bovino como estándar, con una dilución máxima de 1,4 mg/ml. Por otro lado la determinación de proteína se llevó a cabo por medio espectrofotométrico, usando el coeficiente de extinción E 100, midiendo a 403 nm.