

## **4. Discusión y conclusión**

Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo en buffer fosfato con pH 6, ya que la peroxidasa de rábano tiene la mayor estabilidad y actividad a dicho pH, según las especificaciones de Sigma-Aldrich. La temperatura se mantuvo a temperatura ambiente, al igual que el peróxido de hidrógeno, y la única variable en las reacciones fue la concentración de fenol: 0.1 M por el protocolo seguido (Nicell y Wright 1997) para medir la actividad enzimática, y 5 mM por ser esta la concentración media de compuestos fenólicos en aguas residuales.

La inmovilización sobre el material de vidrio (tubos de ensaye, vasos pequeños de precipitados, porta objetos, etc.) no se pudo llevar a cabo; alguno de los pasos con glutaraldehído o APTES no se pudieron concretar por dificultades en colocación de material, agitación o contacto con superficie. Sin embargo sobre las cajas petri si se pudo realizar, con la ventaja que por el tamaño de la superficie del material y el volumen utilizado en las reacciones, la solución tuvo siempre gran contacto con el soporte conteniendo la enzima. En una superficie de 65 cm<sup>2</sup> el volumen total de la solución fue de 4

ml. La mejor opción cuando se inmoviliza en sílice es utilizar perlas de pequeño tamaño, para aumentar el área superficial con menor masa total.

A los soportes se les añadió una concentración específica de enzima para su inmovilización, y la manera en que cuantificaría el total de enzima inmovilizada sería con el método de Bradford para cuantificación de proteínas: la concentración inicial de proteína menos la concentración de proteína en los sobrenadantes sería igual a la cantidad inmovilizada. Sin embargo la concentración de enzima en los sobrenadantes fue demasiado pequeña para ser detectada por éste método. Otra forma de cuantificar el contenido proteico era por medio de espectrofotometría usando el coeficiente de extinción de la enzima, pero tampoco se pudo determinar la cantidad de enzima en los sobrenadantes por la misma causa. Por ello se midió la velocidad inicial de la peroxidasa a diferentes concentraciones y generó una curva de calibración. De ésta forma se pudo obtener un estimado de el total de enzima inmovilizada, dado que por la inmovilización la enzima pudo haber sufrido cambios en su conformación (Guzik 2014) y es posible que su actividad no concuerde en su totalidad con la actividad de la enzima libre.

Es importante mencionar que para obtener los resultados de la actividad en  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , se usó un factor de dilución: las nanopartículas magnéticas de cobalto requerían mucho más tiempo para su total separación con ayuda del imán que las de manganeso; una mínima concentración de nanopartículas alteraba la lectura en el espectrofotómetro. El tiempo requerido para la separación completa del soporte de cobalto y permitir una lectura correcta era de más de 10 minutos, y al realizar un aproximado de 13 mediciones por reacción, el tiempo total de experimento habría sido de más de 2 horas. Lo que se hizo fue realizar todas las lecturas exactamente después de 3 minutos de separación magnética, con el fin de que cada lectura tuviera el mismo factor de error. Al final, la última lectura se hizo

a los 3 y 15 minutos de separación con imán, y así la diferencia en porcentaje se aplicó a las lecturas anteriores para corregirlas.

El mayor porcentaje de enzima inmovilizada en los soportes de nanopartículas fue observada en el de ferrita de manganeso ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ ) (Tabla 1), con 17% de inmovilización, mientras que en el de cobalto únicamente el 10.4%.

A pesar de la concentración de enzima inmovilizada en las nanopartículas magnéticas de cobalto fue mayor que la concentración en el soporte de sílice (siendo ésta una aproximación), su máxima absorbancia fue menor, a pesar de que su velocidad inicial fue mayor. Esto puede tener 3 posibles causas: i) la concentración real de enzima inmovilizada es menor a la calculada; ii) la actividad de la enzima fue afectada por la inmovilización; iii) las nanopartículas no separadas por el imán afectaron con mayor grado las primeras lecturas.

Las mediciones en este estudio se hicieron con un tiempo máximo de reacción de 60 minutos, tomando como actividad máxima la medida a este tiempo. Estudios similares reportan el alcance de actividad máxima, o en su caso degradación total de los compuestos fenólicos a los 60 minutos (Gómez et al. 2006). Este mismo autor y colaboradores reportaron una actividad máxima del 78% con peroxidasa de rábano inmovilizada en vidrio (concentración de fenol 2mM). Por otra parte, Tatsumi reporta el 100% de actividad de la enzima inmovilizada en magnetita (Tatsumi et al. 1996). En el presente estudio la actividad máxima fue del 60.35% con una concentración de fenol 0.1 M, y del 82.35% con fenol 5mM. La inmovilización en ferrita de manganeso por otro lado, tuvo actividad máxima del 92.6% en fenol 5 mM, y del 82.35% en concentración 0.1 M. La inmovilización en cobalto únicamente alcanzó el 48% de actividad máxima en fenol 5 mM, y 37% en fenol 0.1M.

A pesar de que la velocidad inicial de la peroxidasa inmovilizada en ferrita de cobalto fue mayor a la de la enzima inmovilizada en sílice (Fig. 2), su absorbancia máxima después de 1 hora fue 39% menor. Este mismo hecho se corrobora comparando las actividades específicas en los sistemas, siendo mayor la de la peroxidasa inmovilizada en sílice (2.937  $\mu\text{g}/\text{min}$ ) que la inmovilizada en  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  (2.193  $\mu\text{g}/\text{min}$ ).

La reutilización de las enzimas inmovilizadas no fue tan exitosa como otros autores plantean, pudiendo ellos reutilizar la peroxidasa de rábano inmovilizada en ácido algínico hasta por 3 ciclos sin perder más del 10% de actividad (Pretthi et al. 2013). Sobre  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  la enzima mantuvo únicamente 28% de su actividad en el segundo ciclo a una concentración fenólica de 5 mM. La actividad fue tan baja que un tercer ciclo no era necesario. El mismo soporte con una concentración fenólica 0.1M mantuvo el 36% de actividad en el segundo ciclo, y 20% en un tercer ciclo (tabla 3). La inmovilización en  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  por el contrario mantuvo mayor actividad después de reutilizarse (45% en fenol 5mM y 48% en fenol 0.1M). Sin embargo, a pesar de un mayor y mejor grado de reuso, la actividad enzimática sobre  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  es demasiado baja que no resulta significativa su reutilización. El mejor grado de reciclado se obtuvo con la inmovilización en sílice: 60% en el segundo ciclo y 31% en el tercer ciclo. Ésta pérdida de actividad de la enzima no puede ser por desprendimiento de la enzima de la superficie. Para comprobarlo se utilizó la misma cantidad de nanopartículas con enzima inmovilizada que en las mediciones anteriores, y se expuso a las condiciones físicas de lavado: el sobrenadante no presentó actividad enzimática y el sistema presentó por su lado la misma actividad que las demás soluciones sin previo lavado.

Con el fin de conocer mejor la cinética de la enzima inmovilizada en los diferentes soportes, se debió de haber generado una curva de Michaelis-Menten para cada soporte, sin

embargo, dada la poca cantidad de peroxidasa de rábano, ésta no se pudo realizar. Al evaluar solamente la actividad enzimática, y no la degradación total de compuestos fenólicos, en este estudio se calificaron únicamente los soportes como viables o no viables para posteriores estudios.

Para poder hacer una correcta comparación del porcentaje de inmovilización entre soportes de sílice y nanopartículas, sería necesario calcular el total de superficie al que se expuso una concentración de peroxidasa. Adicionalmente, para conocer el grado de saturación de inmovilización enzimática, se deberían realizar los procesos de inmovilización con diferentes concentraciones de enzima. En futuros estudios de la enzima inmovilizada en ferrita de manganeso, se puede añadir PEG para probar una mejora en su actividad como algunos autores lo afirman (Nicell et al. 1995).

La inmovilización en ferrita de manganeso mostró mejores características que el de ferrita de cobalto (mayor porcentaje de inmovilización, mayor magnetización, mayor conservación de actividad enzimática, mayor tasa de reutilización), por lo cual éste sería un posible candidato para futuros estudios sobre la inmovilización de enzimas. La [tashttp://patentimages.storage.googleapis.com/EP0024578B1/imgb0003.png](http://patentimages.storage.googleapis.com/EP0024578B1/imgb0003.png) de reutilización no fue tan grande como esperada, sin embargo existe la posibilidad de reutilizarse y llegar al mismo porcentaje de actividad en un periodo de tiempo más largo, confirmando el posible uso de peroxidases inmovilizadas en el tratamiento de efluentes contaminados con fenoles de una manera más económica.