



UNIVERSIDAD ESTATAL DE SONORA

UNIDAD ACADÉMICA HERMOSILLO

MAESTRIA EN CIENCIAS AMBIENTALES

**CARACTERIZACIÓN Y EFICIENCIA BIOCATALITICA DE
LACASA INMOVILIZADA EN LA DEGRADACIÓN DE 2,3,5
TRICLOROFENOL**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

PRESENTA:

I.A ANA LUCIA CUAMEA VALENZUELA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. OCTAVIO COTA ARRIOLA

Hermosillo, Sonora, Diciembre del 2023

INTRODUCCIÓN

El quitosano es un derivado de la quitina que se encuentra principalmente en camarones y crustáceos. La industria marisquera toma solamente la carne como producto dejando los exoesqueletos como desechos y es por eso que se pueden obtener cantidades industriales del polímero. Se estima que anualmente se generan más de 5 millones de toneladas de desechos. Los exoesqueletos ya secos contienen mínimo 5% de quitina, hasta un 42% dependiendo de la especie. Actualmente existen tecnologías que ayudan no solo a la eliminar si no a aprovechar de estos “desechos”, como la producción de la quitina y el quitosano; que son productos comercialmente viables.

El aprovechamiento de este desecho es debido a que posee excelentes propiedades; es antifúngico, biocompatible, antimicrobiano, emulsionante, adsorbente de metales contaminantes, etc. (Caprile, 2005). El quitosano gracias a su simple preparación, bajo costo, propiedades químicas estables y beneficios antes mencionados, es utilizado ampliamente en alimentos, también como vehículo para liberar algún fármaco, para inmovilizar enzimas, entre otros.

Las enzimas son catalizadores naturales que agilizan la degradación de diferentes componentes. Estas pueden ser utilizadas libremente, pero pueden presentar algunos inconvenientes en su aplicación ya que la actividad catalítica puede disminuir dependiendo en las condiciones ambientales en las que se encuentre, disminuyendo de igual manera la eficiencia enzimática; en este sentido la propuesta sería utilizar la inmovilización de la enzima en quitosano bajo diferentes condiciones de proceso (pH y Temperatura, principalmente) para retener la mayor cantidad de enzima posible.

La lacasa es una enzima que puede utilizarse de forma directa, actuando como catalizador en la eliminación o modificación de un sustrato de interés, o bien de forma indirecta, facilitando un proceso sin intervenir en el producto final. (Sánchez, 2006). Las lacasas son enzimas oxidativas que se están estudiando para bioaplicaciones de varios tipos de actividades tales como en la industria del papel, y en estos últimos años han sido de gran interés como una alternativa de remediación ambiental, entre otros.

Con esta indagación se pretende analizar la enzima y mejorar su eficiencia, para que pueda actuar en sistemas diversos, con condiciones diferentes, atacando directamente al contaminante y modificando su estructura molecular para que pueda llegar a ser menos tóxico. Es por eso que con esta investigación se busca la estabilización biocatalítica de la enzima lacasa inmovilizada en nanopartículas de quitosano, y a su vez el efecto que va a tener sobre la degradación del plaguicida 2,3,5 triclorofenol

Este contaminante (2,3,5 triclorofenol) es un derivado de los clorofenoles que, por su persistencia en el medio ambiente, su difícil degradabilidad y sus efectos negativos en la salud humana y ambiental, es considerado como un compuesto tóxico de alta peligrosidad. Desafortunadamente, es común encontrar este contaminante en el aire, en el agua o en el suelo, ya que a partir de él se obtienen algunos plaguicidas que son utilizados actualmente en los cultivos agrícolas. La ley General de Salud define plaguicida como: “cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se destinan a controlar cualquier plaga, incluidos los vectores que transmiten las enfermedades humanas y de animales, las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria y forestal, así como las sustancias defoliantes y las desecantes” (DOF, 2011b – Art. 278).

Así como han traído beneficios, también han sido una amenaza para la salud humana y para el medio ambiente por su nivel de toxicidad y persistencia en el sistema humano o en el entorno. El uso excesivo e inadecuado de estos productos ha causado muchos problemas de salud, incluso la muerte; por lo general esto sucede cuando la exposición a estos contaminantes es continúa o en altas dosis. Los plaguicidas pueden traer consecuencias a corto plazo como irritaciones, dolor de cabeza, pero las afectaciones a largo plazo pueden ser fatales, es por ellos, los altamente cancerígenos, los que causan daños irreparables a la salud del ser humano por los que se realizó esta investigación.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El uso excesivo e inadecuado de los plaguicidas ha sido alarmante debido a los efectos negativos que pueden llegar a ocasionar en el medio ambiente y en la salud humana. Es verdad que los plaguicidas juegan un papel muy importante sobre el control de plagas y el aumento de la productividad agrícola, pero, su uso descomunal ha sido el principal factor de la contaminación del suelo, agua y el aire. Los residuos de los plaguicidas pueden persistir por mucho tiempo en el medio ambiente, afectando al entorno y la biodiversidad. Asimismo, los problemas de salud, como enfermedades respiratorias, trastornos hormonales, daños neurológicos y cáncer están siendo asociados directamente con la exposición ante estos productos químicos.

Es por eso, que en la actualidad es vital empezar a buscar y promover alternativas agrícolas más sostenibles, tecnologías más limpias y respetuosas con el medio ambiente que ayuden a minimizar los impactos ambientales. El desarrollo de estas esta siendo tema en un gran número de investigaciones ya que se buscan diferentes opciones para la remediación ambiental, en este sentido la utilización de enzimas ha ido en aumento por su capacidad de

realizar reacciones específicas en menor tiempo en comparación con un proceso químico o físico. Así mismo, las enzimas han sido de gran importancia en la remediación biológica pues son capaces de transformar y eliminar contaminantes tóxicos presentes en agua y suelos.

La presencia de contaminantes tóxicos es más común de lo que se piensa, ya que no solo se manejan en procesos industriales sino que también están presentes en productos que se utilizan en la vida cotidiana y van en incremento día con día provocando graves problemas, a su vez el crecimiento poblacional y la urbanización va también generando un incremento exponencial de desarrollo industrial y por ende, la presencia de agentes tóxicos también incrementa causando serios problemas de salud y ambientales.

En este proyecto se pretende lograr la inmovilización de la enzima lacasa con el fin de hacerlo como se mencionó anteriormente bajo condiciones específicas de pH y Temperatura, y así lograr romper los anillos aromáticos para que los plaguicidas sean menos tóxicos y por consecuencia disminuir su impacto en el medio ambiente. Al inmovilizar la lacasa en las nanopartículas de quitosano, se mejora su estabilidad y actividad enzimática, lo que permite un uso más eficiente en aplicaciones catalíticas.

La obtención de esta información básica brindará las bases necesarias para implementar una tecnología prometedora que pueda aplicarse en la remediación ambiental de contaminantes tóxicos persistentes, reduciendo graves problemas ambientales y de salud que existen en nuestros días.

JUSTIFICACIÓN

La problemática asociada con el uso de plaguicidas es de gran importancia debido a sus efectos negativos en el medio ambiente, la salud humana y la biodiversidad. Entre los problemas que destacan es la contaminación de las matrices biológicas, el daño a la salud humana, la resistencia de plagas: el uso continuado y excesivo de plaguicidas ha llevado al desarrollo de resistencia en muchas especies de plagas. Estas plagas se vuelven menos susceptibles a los plaguicidas utilizados, lo que requiere el uso de dosis más altas o de plaguicidas más potentes, lo que a su vez puede aumentar aún más los riesgos para la salud y el medio ambiente.

La nanotecnología ha revolucionado diversos campos de la ciencia y la tecnología, ofreciendo nuevas oportunidades en la medicina, la electrónica, la agricultura y otras áreas. Una de las aplicaciones prometedoras es el uso de nanopartículas para la liberación controlada de fármacos y sostenida de compuestos bioactivos. En este contexto, el quitosano, un polímero biodegradable y biocompatible, ha sido ampliamente estudiado debido a sus propiedades únicas. La inmovilización de nanopartículas de quitosano con lacasa, una enzima con capacidad de modificación de superficies, ofrece oportunidades interesantes en la creación de sistemas de liberación de fármacos más efectivos y seguros.

La lacasa es una enzima oxidante presente en diversos organismos, como plantas, hongos y bacterias. Se ha demostrado que la lacasa puede catalizar reacciones de polimerización y degradación de varios compuestos orgánicos, incluyendo polímeros naturales como el quitosano. La actividad de la lacasa se basa en su capacidad para oxidar sustratos fenólicos mediante la generación de radicales libres. Esta actividad oxidativa puede ser aprovechada

para modificar superficies de quitosano, promoviendo la formación de enlaces cruzados y la inmovilización de nanopartículas

La inmovilización de nanopartículas de quitosano con lacasa presenta diversas ventajas. En primer lugar, permite una mayor estabilidad y retención de las nanopartículas en sistemas de liberación de fármacos, lo que favorece una liberación controlada y sostenida de los compuestos bioactivos.

La toxicidad de los clorofenoles depende del grado de sustitución y de la ubicación de los átomos de cloro y en general estos compuestos son considerados como uno de los contaminantes más peligrosos a nivel mundial (Steirt y Crawford, 1985).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar estructural, química y funcionalmente enzimas lacasa inmovilizadas en nanopartículas de quitosano y evaluar su efecto en la transformación biocatalítica de contaminante 2,3,5-triclorofenol, de importancia en el medio ambiente y en la salud pública a compuestos atóxicos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Inmovilizar las enzimas lacasa en partículas basadas en quitosano, elaboradas por gelificación ionotrópica.
2. Caracterizar químico-estructuralmente las partículas obtenidas de quitosano/TPP con incorporación de lacasa.
3. Determinar la estabilidad de la lacasa en partículas de quitosano/TPP a diferentes condiciones de pH y temperatura.
4. Evaluar la toxicidad y citotoxicidad de las partículas de quitosano/TPP con incorporación de lacasa.

MARCO TEORICO

Aproximadamente un 40% del producto agrícola se pierde debido a enfermedades que atacan a los cultivos colectivamente tales como algunas plagas o animales. Es por esto que se utilizan los plaguicidas ya que no solo ayudan a mitigar estos daños, sino que también hacen que el cultivo tenga una vida útil más prolongada.

Un plaguicida es una o el conjunto de varias sustancias químicas, tóxicas que son esparcidas intencionalmente en el medio ambiente con el fin de eliminar, detener o controlar las plagas que afectan a las plantaciones agrícolas. Las plagas pueden ser definidas como las plantas o los animales que ponen en peligro la salud de los cultivos. El uso de plaguicidas ha incrementado considerablemente en los últimos años, de acuerdo a un estimado de ____ se utilizan en el mundo cerca de 3 millones de toneladas de plaguicidas al año. El uso de plaguicidas para mitigar todo tipo de plagas es una práctica común en todo el mundo, ya que no solo se utiliza en campos agrícolas si no que también esta siendo utilizada en hogares; en forma de spray, de veneno o diferentes polvos que igual sirven para controlar los insectos domésticos tales como cucarachas, mosquitos, ratas, etc. Todo esto contribuye de forma exponencial en la contaminación de aire.

La mayoría de estas sustancias son fabricadas por el hombre, por eso son llamados plaguicidas sintéticos (TELLECHEA, 2007). Los plaguicidas prometen una mitigación de plagas efectiva pero desafortunadamente el riesgo asociado con el uso desmedido de estas sustancias es muy alto debido a que los canales de acción de estas sustancias no son específicos enfocados en una plaga determinada y al llevar a cabo su función también puede llegar a eliminar o detener el crecimiento de otros cultivos, incluso matar animales a su alrededor. Han surgido muchas inquietudes debido al peligro que existe para los seres vivos

al estar expuestos a este tipo de contaminaciones, se sabe que muchos de los plaguicidas producen daños a corto plazo (irritación de ojos y piel, dolor de cabeza, náuseas, etc.) hasta impactos crónicos (cáncer, diabetes, asma, etc.) los riesgos que esto envuelve son difícil de explicar debido a varios factores (período de exposición, tipo de plaguicida, toxicidad y persistencia en el medio ambiente, etc).

El uso excesivo e inadecuado de los plaguicidas, así como ha traído beneficios también ha provocado daños irreversibles o difícilmente reversibles al entorno donde se han aplicado por medio de la contaminación de suelo, agua y aire. El hombre está expuesto a los contaminantes ya que se encuentran en el aire inhalado, en el agua y alimentos, así como en otros medios ambientales; entran en contacto a través de diferentes vías de exposición tales como respiratoria, digestiva y/o dérmica y se acumulan en algunos órganos del organismo debido a su dificultad para degradarse.

La contaminación del aire está directamente relacionada con el uso de plaguicidas. Dentro de los compuestos tóxicos de mayor atención por su permanencia en el ambiente y por los efectos negativos que ocasionan en la salud; están los compuestos fenólicos, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), organofosforados (OP), los cuales son contaminantes inorgánicos persistentes, biodisponibles y bioacumulables, ya que son altamente estables y difíciles de degradar por procesos metabólicos, químicos o físicos.

Clorofenoles

Los clorofenoles son un grupo de compuestos químicos en los que han adicionado uno o varios átomos de cloro a la molécula del fenol (ATSDR,1999). El fenol es un compuesto aromático derivado del benceno, el hidrocarbano aromático más simple, que se forma al

agregar un grupo hidróxido a un carbono para reemplazar un hidrógeno (UAEH, 2011). Hay cinco tipos básicos de clorofenoles el mono, bi, tri, tetra y penta – clorofenol. Los clorofenoles de por lo menos 2 cloros han sido utilizados ya sea directamente como pesticidas o han sido convertidos en pesticidas (UNEP, 2011).

Los clorofenoles se conocen principalmente por su capacidad para actuar como desinfectantes y conservantes. Su actividad antimicrobiana se debe a la presencia del grupo hidroxilo (-OH), que puede liberar iones de hidróxido (OH-) en solución acuosa. Estos iones de hidróxido son altamente reactivos y pueden dañar las membranas celulares y las proteínas de los microorganismos, lo que lleva a su muerte.

Además de su actividad antimicrobiana, los clorofenoles también pueden actuar como herbicidas y plaguicidas. En estos casos, su mecanismo de acción puede variar dependiendo de la especie de planta o de plaga que se esté tratando. Por lo general, los clorofenoles interfieren con procesos bioquímicos esenciales en las células de las plantas o los insectos, como la fotosíntesis, la respiración o la producción de energía.

Los clorofenoles se usan ampliamente como sustancias químicas industriales importantes en conservación de madera, en pesticidas y herbicidas (Fricker et al. 2014; Zhao et al. 2015) y, por lo tanto, se infiltran en las aguas superficiales y subterráneas (Jin et al. 2012; Mei et al. 2014). Debido a su alta toxicidad y carcinogenicidad, los clorofenoles han sido catalogados como contaminantes de alta peligrosidad por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) (Keith y Telliard 1979).

Es importante tener en cuenta que los clorofenoles pueden tener efectos tóxicos en organismos no deseados, así como en seres humanos y otros organismos. Su uso está regulado

en muchos países debido a sus posibles efectos adversos para la salud y el medio ambiente. Se recomienda utilizarlos con precaución y seguir las instrucciones de uso proporcionadas por los fabricantes y las regulaciones locales.

2,3,5 triclorofenol

Algunos de los derivados de los clorofenoles es el 2,3,5 triclorofenol es un sólido cristalino de color blanco a amarillo claro. Tiene un olor característico y es soluble en solventes orgánicos como el cloroformo y el éter, pero tiene una solubilidad limitada en agua, se usa como intermediario en la fabricación del herbicida ácido 2,3,5 - triclorofenoxiacético y como fungicida y bactericida. (JERSEY, 2006).

El 2,3,5-triclorofenol es un tipo específico de clorofenol que tiene tres átomos de cloro en posiciones específicas en el anillo de benceno. Su mecanismo de acción puede variar dependiendo de la aplicación o el contexto específico en el que se utilice. En general, el 2,3,5-triclorofenol es conocido por su actividad como desinfectante y herbicida. Su mecanismo de acción como herbicida, el contaminante puede interferir con la fotosíntesis y otros procesos metabólicos en las plantas. Al ser absorbido por las hojas o las raíces de las plantas, el 2,3,5-triclorofenol puede inhibir la enzima clave necesaria para la fotosíntesis, lo que lleva a la interrupción de la producción de energía y nutrientes en la planta. Esto puede resultar en el marchitamiento y la muerte de las plantas tratadas.

Es importante tener en cuenta que el 2,3,5-triclorofenol es considerado un compuesto tóxico y su uso está regulado en muchos países debido a sus posibles efectos adversos para la salud humana y el medio ambiente. Se recomienda seguir las instrucciones de uso proporcionadas por los fabricantes y las regulaciones locales, y utilizarlo con precaución y responsabilidad.

Hasta el momento los datos que se han obtenido acerca de este contaminante son insuficientes para saber el grado de daño que puede provocar sobre la salud humana, por lo que debe utilizarse con cuidado. Aunque no hay datos precisos sobre este isómero, se sabe que la mezcla de triclorofenoles puede provocar irritación de la piel, los ojos y tracto respiratorio incluso causar efectos agudos en el metabolismo como daño a varios órganos, especialmente en el sistema nervioso central.

La degradación del 2,3,5-triclorofenol, puede llevarse a cabo utilizando diferentes métodos, algunos de los cuales incluyen procesos químicos, físicos o biológicos. A continuación, se describen algunas de las opciones más comunes:

- **Tratamiento químico:** El triclorofenol puede ser degradado mediante procesos químicos como la oxidación avanzada. En este método, se utilizan agentes oxidantes fuertes, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o el ozono (O_3), junto con catalizadores adecuados para generar especies altamente reactivas que atacarán y descompondrán el compuesto contaminante.
- **Tratamiento físico:** Los procesos físicos, como la fotólisis o la radiólisis, pueden ser utilizados para la degradación del triclorofenol. En la fotólisis, la exposición a la luz ultravioleta (UV) descompone el contaminante en especies menos tóxicas. La radiólisis utiliza radiación ionizante para romper las moléculas del triclorofenol en productos más sencillos.
- **Tratamiento biológico:** La biorremediación es un método que emplea microorganismos para degradar compuestos contaminantes. Se han aislado ciertas bacterias y hongos que tienen la capacidad de utilizar el triclorofenol como fuente de carbono, descomponiéndolo en productos menos tóxicos y finalmente en CO_2 y agua.

- Adsorción y absorción: Se pueden utilizar materiales adsorbentes o absorbentes para eliminar el triclorofenol del agua o suelo contaminado. Estos materiales tienen la capacidad de atrapar las moléculas de triclorofenol en su superficie o estructura interna, lo que conduce a su eliminación del medio ambiente.

Es importante tener en cuenta que la degradación del triclorofenol puede ser un proceso complejo y que la eficacia de los métodos dependerá de varios factores, como la concentración del contaminante, el pH del medio ambiente, la temperatura y la presencia de otras sustancias químicas que puedan interferir en el proceso de degradación. Por lo tanto, se debe evaluar cuidadosamente el enfoque más adecuado para una situación particular y cumplir con las regulaciones ambientales y de seguridad aplicables antes de llevar a cabo cualquier tratamiento.

El 2,3,5-triclorofenol y la lacasa están relacionados en el contexto de la degradación de contaminantes. La lacasa es una enzima que juega un papel importante en la descomposición y transformación de diversos compuestos, incluidos algunos contaminantes ambientales.

En el caso específico del 2,3,5-triclorofenol, la lacasa puede catalizar su degradación a través de una serie de reacciones enzimáticas. El mecanismo de acción de la lacasa en el 2,3,5-triclorofenol implicaría lo siguiente:

- Activación: La lacasa activa el 2,3,5-triclorofenol, lo que lo convierte en una forma más reactiva y susceptible a la degradación.
- Descloración: La enzima ataca y rompe los enlaces entre los átomos de cloro y el anillo de benceno en el 2,3,5-triclorofenol, lo que lleva a la eliminación de los átomos de cloro.

- Transformación: Los productos resultantes de la descloración pueden someterse a más reacciones enzimáticas que los transforman en productos menos tóxicos o en componentes más simples y menos contaminantes.

En cualquier caso, la degradación del 2,3,5-triclorofenol es un proceso que busca reducir su toxicidad y eliminarlo del medio ambiente para prevenir daños a los ecosistemas y a la salud humana. Se está viviendo una época crítica para la humanidad y para el planeta, cada vez la necesidad de cuidar el medioambiente y de buscar formas más sostenibles de relacionarse con el entorno está siendo más latente. Es por eso que se considera la utilización de enzimas como una nueva tecnología para remediar el medio ambiente. La selección del método de tratamiento dependerá de la situación específica y las condiciones del sitio contaminado.

Enzimas

Las enzimas son proteínas que funcionan como catalizadores biológicos; son polímeros formados por aminoácidos covalentemente unidos entre sí, que catalizan en los organismos una gran variedad de reacciones químicas. La actividad catalítica de las enzimas depende de que mantengan su plegamiento, es decir, su estructura tridimensional.

Una enzima actúa como un catalizador biológico que acelera la velocidad de una reacción química específica, sin ser consumida ni alterada durante el proceso. En el contexto de la degradación de contaminantes, las enzimas pueden desempeñar un papel crucial en la transformación y eliminación de sustancias nocivas del medio ambiente.

Cuando una enzima entra en contacto con un contaminante, se une a él en un sitio activo específico, que es la región de la enzima que reconoce y se ajusta a la molécula del contaminante. Una vez que la enzima se une al contaminante, inicia una serie de reacciones

bioquímicas que llevan a la transformación o descomposición del contaminante en productos menos tóxicos o incluso en sustancias inocuas.

El mecanismo exacto por el cual una enzima degrada un contaminante puede variar según la enzima y el contaminante específicos involucrados. Algunas de las formas en que las enzimas pueden actuar sobre contaminantes incluyen:

- Oxidación: La enzima puede facilitar la adición de oxígeno al contaminante, lo que puede llevar a su descomposición en componentes menos tóxicos.
- Reducción: La enzima puede promover la eliminación de grupos funcionales tóxicos del contaminante, reduciendo su toxicidad.

La capacidad de las enzimas para degradar contaminantes se ha utilizado en diversas aplicaciones de biorremediación y tratamiento de aguas residuales, ya que ofrece una forma natural y eficiente de abordar la contaminación ambiental.

Lacasa

La lacasa es una enzima con gran importancia, debido que en ocasiones se ha descrito que la lacasa es única en actividad ligninolítica en hongos que degradan la lignina u otros compuestos aromáticos que tienen gran impacto ambiental. Estas enzimas son oxidasas fenólicas de gran importancia en algunos estudios por su adaptabilidad a diversas aplicaciones industriales, entre ellas el blanqueo de papel, reducción de color, eliminación de compuestos fenólicos en el vino, la biorremediación de ambientes contaminados, tratamiento de aguas residuales, etc.

Las lacasas son producidas por hongos pertenecientes al grupo de los basidiomicetos que provocan la pudrición blanca en la madera (Baldrian, 2006). Generalmente, la actividad

catalítica y la estabilidad pueden variar entre enzimas según el origen, temperatura, pH y medio de cultivo utilizado para su producción. Las lacasas son estables a pH ácido (3-6) (Nyanhongo et al.2002). Las lacasas pueden estar activas en un amplio rango de temperatura (20- 55 °C), con una temperatura óptima a 55 °C. No obstante, también se han purificado las lacasas termoestables (60-70 °C) y caracterizado (Saraiva et al. 2012).

Las lacasas son enzimas con actividad fenol oxidasa (Figura 1), pertenecen al grupo de las oxidorreductas multicobre caracterizadas por tener átomos de cobre en su centro activo. Catalizan la oxidación mono electrónica de muchas sustancias fenólicas y aminas aromáticas con el oxígeno molecular como aceptor final de electrones. Son enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido descritas en hongos, plantas, insectos, bacterias e incluso en arqueas. El interés actual de estas enzimas se debe a su gran potencial para ser utilizadas con fines biotecnológicos y/o medioambientales. (Blanquez, 2015)

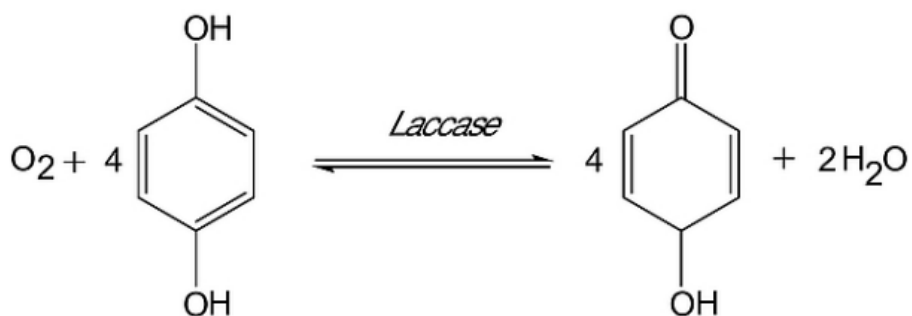


Figura 1. Lacasa *Trametes versicolor*

Las enzimas lacasas reducen el oxígeno molecular al agua, por la oxidación de un sustrato fenólico, además se caracterizan por su átomo del cobre (Cu 1) junto con tres iones de cobre adicionales, un Cu 2 y dos Cu 3 dispuestos en su sitio activo. Los sustratos se oxidan con el

cobre Cu 1, los electrones extraídos se transfieren hacia Cu 2 y Cu 3, donde el oxígeno molecular es reducido al agua. (Hernandez, 2018). Aunque la lacasa es una proteína muy estable, en algunas ocasiones se utilizan mediadores para una mejor eficiencia y en este caso para que la degradación sea más efectiva en el plaguicida 2,3,5 triclorofenol se utilizaría como mediador las nanoparticulas de quitosano (Sánchez, 2006).

La lacasa *Trametes versicolor* es una enzima que cataliza la oxidación de compuestos fenólicos y aromáticos utilizando oxígeno molecular. Es capaz de oxidar una amplia gama de sustratos, incluyendo fenoles, polifenoles, catecoles y tirosinas. es particularmente interesante en el campo de la biorremediación debido a su capacidad para degradar contaminantes orgánicos, como compuestos fenólicos, bifenilos policlorados (PCB) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). Estos contaminantes son difíciles de eliminar utilizando métodos convencionales, y la actividad de la lacasa puede acelerar su degradación y descomposición en formas menos tóxicas.

La actividad de la lacasa en la degradación del 2,3,5-triclorofenol puede ser parte de procesos de biorremediación o tratamiento de aguas residuales, donde las enzimas como la lacasa son utilizadas para eliminar contaminantes del medio ambiente de manera eficiente y sostenible.

Es importante destacar que, aunque la lacasa puede desempeñar un papel en la degradación del 2,3,5-triclorofenol, la eficacia de este proceso puede depender de varias condiciones, como la concentración del contaminante, la disponibilidad de la enzima, el pH y la temperatura del medio ambiente, entre otros factores. Además, la aplicación de la lacasa u otras enzimas en la degradación de contaminantes debe ser cuidadosamente evaluada y ajustada según la situación específica y las características del contaminante presente.

Quitosano

En zonas costeras la industria marisquera es muy común. Durante el proceso solo se toma la carne; la cabeza y las conchas se toman como desecho. En promedio la industria marisquera produce acerca de 80,000 toneladas de residuos al año. La gran cantidad de desechos hace que la degradación sea muy lenta y provoca la acumulación durante un largo período de tiempo, por lo que provoca malos olores y contaminación. De estos desechos se obtiene la quitina, que es un producto comercialmente viable y así brinda una solución eficaz a este problema donde se aprovecharía al máximo la cáscara o bien, el exoesqueleto de los diferentes crustáceos (langosta, cangrejo y camarón).

La obtención de quitosano se realiza mediante la desacetilación química de la quitina, dejando libre el grupo amino del carbono 2 del residuo de glucosamina (Nair y col., 2009). Se muestra en la Figura 2 la estructura química de la quitina y del quitosano. La fuente y el método de obtención determinan la composición y tamaño de las cadenas de quitosano, así como de su pureza y reactividad (Hornarkar y col., 2009). Además, se ha reportado que las principales características físico-químicas del quitosano que determinan su funcionalidad, son su grado de desacetilación o grupos aminos libres y su peso molecular (Hornarkar y col., 2009).

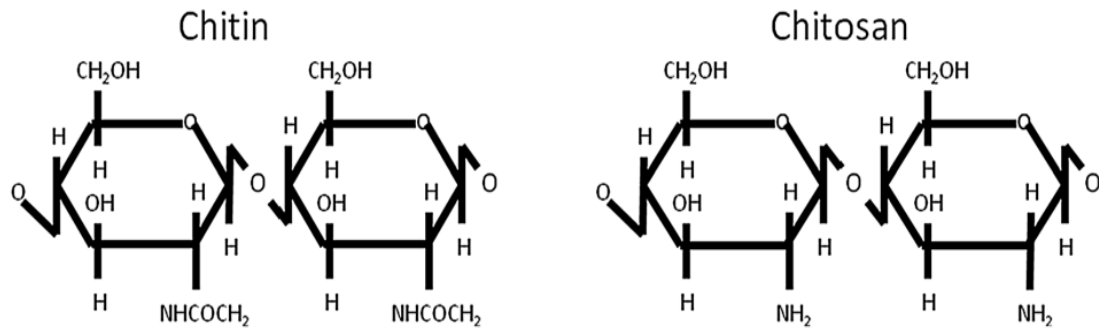


Fig 2: Estructura de la quitina y del quitosano

Este biopolímero es utilizado en las industrias alimentarias y de bioingeniería para la encapsulación de ingredientes alimentarios activos, se utiliza para inmovilizar enzimas y como vehículo para la administración controlada de fármacos. Además, las propiedades funcionales del quitosano se debe a la protonación de sus grupos aminos en soluciones ácidas diluidas ($pK_a = 6.5$), lo cual incrementa su reactividad (Irina y col., 2008). Algunas de las propiedades funcionales del quitosano son su biodegradabilidad, biocompatibilidad, toxicidad nula en humanos ($DL_{50} = 16 \text{ g Kg}^{-1}$ en ratas), mucoadhesión (Chopra y col., 2006), capacidad filmogénica (Martínez-Camacho y col., 2010), hemostático (Aranaz y col., 2009), promotor de absorción (Hernández-Lazárdo y col., 2008), actividad antimicrobiana contra virus, bacterias y hongos (Rabea y col., 2003), anticolesterolémica (Muzzarelli, 1983) y antioxidante (Sun y col., 2007). Estas propiedades han promovido su utilización en varios campos de investigación.

La investigación moderna del quitosano inició con publicaciones que describen su potencial antimicrobiano contra diversos microorganismos y se han postulado diferentes mecanismos de acción. Se ha reportado que la actividad varía en función del tipo de microorganismo, grado de desacetilación, peso molecular, concentración de quitosano y tiempo de exposición, entre otros (Rabea y col., 2003). Este biopolímero también presenta efecto fungistático tanto in vitro como in vivo, contra una diversidad de hongos como en *Aspergillus parasiticus* (Cota-Arriola y col., 2011), *Ramularia cercosporelloides* (Quintana-Obregón y col., 2011), *Aspergillus niger* (Martínez-Camacho y col., 2010), *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizopus stolonifer*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani* (El Ghaouth y col., 1992; Lárez-Velásquez, 2008), y efecto fungicida en *Fusarium oxysporum*, *R. stolonifer*, *P. digitatum* y *C. gloeosporioides* (Bautista-Baños y col., 2006; Lárez-Velásquez, 2008). Asimismo, el quitosano posee actividad antiviral por su capacidad de inducir resistencia en tejidos vegetales, protegiéndolos contra infecciones causadas por el virus del mosaico de la alfalfa, tabaco, maní, pepino y papa (Kochkina y col., 1995; Chirkov, 2002).

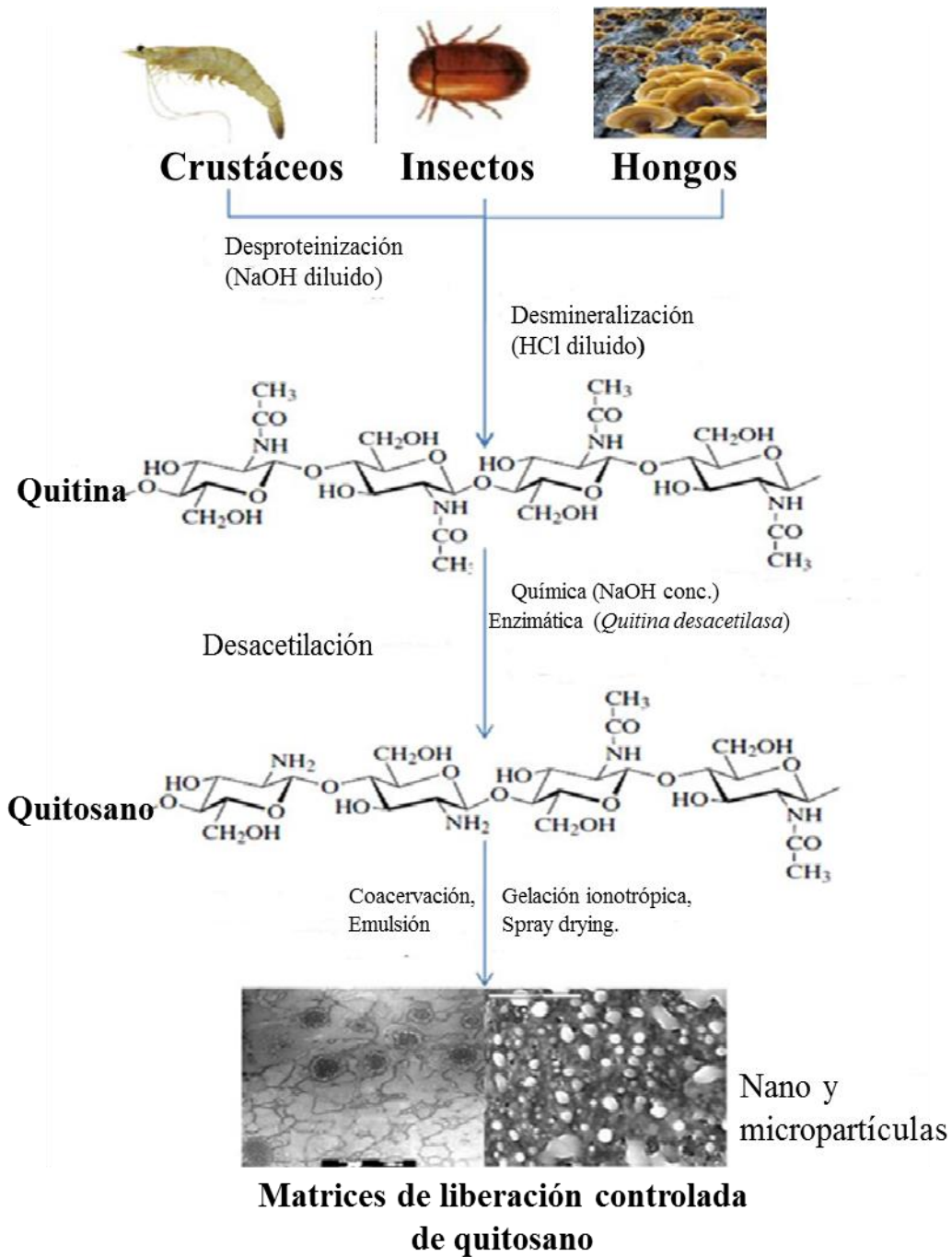
El quitosano es un biopolímero modificado, derivado por desacetilación de la quitina. Consiste en unidades alternas de (1 → 4) unidades enlazadas de N-acetil glucosamina y glucosamina. Es un polisacárido blanco, duro, inelástico y nitrogenado (Badawy y Rabea 2011). Es también uno de los polímeros naturales más utilizados en la producción de nanomedicinas, porque presenta características muy atractivas para la administración de fármacos y ha demostrado ser muy eficaz cuando se formula en forma de nanopartículas. El quitosano contiene tres grupos funcionales; un grupo amino y grupo hidroxilo primario y secundario en C2, C3 y posiciones C6. Los grupos hidroxilo del quitosano realizan una

modificación química uniendo grupos laterales a los grupos hidroxilo reactivos sin alterar sus propiedades biofísicas. Las cargas positivas del quitosano ayudan a estabilizar la interacción con las moléculas cargas negativamente sin provocar algún cambio en su actividad.

El quitosano obtenido de diferentes fuentes es un polímero muy versátil, capaz de formar películas, hidrogeles, andamios porosos, fibras, micro y nanopartículas (Zhou et al., 2008) que en conjunto con sus propiedades funcionales lo han llevado a ser uno de los compuestos más prometedores para la elaboración de matrices de liberación controlada, para la inmovilización de una gran variedad de compuestos activos como son las nanopartículas (Figura 3) y nanofibras las cuales son consideradas sistemas coloidales con un tamaño < 1 micra (1-100 nm) (Murillo et al., 2001), siendo esta característica importante para incrementar su funcionalidad (Du et al., 2008).

Una de las principales características de las partículas de este polímero es su biocompatibilidad, por lo que la preparación por gelificación ionotrópica es permitida con aniones tripolisfosfato. Como se ha mencionado anteriormente el quitosano es un polication y se aprovecha esto para relacionarse por fuerzas electrostáticas con el tripolisfosfato, el cual es un ion polivalente. Por lo tanto, este hidrogel físico está formado por el quitosano entrecruzado iónicamente por el tripolisfosfato. El quitosano tiene la capacidad de formar un gel en contacto con aniones y formar perlas. Esta propiedad permite su uso en la administración de fármacos. Pero, aun así, el gran tamaño de estas perlas (1–2 mm) limita su aplicación.

Una matriz de liberación controlada se define como una estructura que permite controlar la difusión del compuesto activo, para un fin específico a una velocidad y duración para



Esquema general de la obtención de matrices de liberación controlada basadas en quitosano.

alcanzar los efectos deseados (Poncelet, 2006). Además, debe permitir la inmovilización, protección, liberación controlada y mayor funcionalización de los compuestos activos (Nair y col., 2009). Estos sistemas son clasificados en dos grupos: aquellos donde el compuesto activo se dispersa en una matriz soluble y es liberado por disolución o degradación del polímero, y aquellos en los que el ingrediente activo se dispersa en una matriz insoluble, de la que es liberada cuando un disolvente penetra en la matriz y disuelve las partículas (Nair y col., 2009; Paños y col., 2008).

La nanotecnología ha surgido como una herramienta prometedora para la eliminación de contaminantes, y la inmovilización de nanopartículas de quitosano con lacasa ofrece una estrategia novedosa y efectiva para romper los anillos aromáticos de estos compuestos. Para inmovilizar un reactivo bioactivo en nanopartículas, la presencia de grupos funcionales en sus superficies es de gran importancia, ya que, al interactuar entre sí, la capacidad de carga y la estabilidad de biomoléculas inmovilizadas aumentan. Usualmente para la funcionalización de nanopartículas magnéticas se utilizan polímeros naturales, por ejemplo, el quitosano, que como ya mencionamos anteriormente es un poliaminosacárido natural con importantes propiedades químicas y biológicas. Además de ser utilizado para inmovilizar varias enzimas, el quitosano también es utilizado como soporte, polvo, gel, etc.

Recientemente existen varios estudios sobre la inmovilización de enzimas, para su posible aplicación en diversos sectores industriales (Durán et al., 2002). Actualmente hay cinco métodos disponibles para obtener nanopartículas de quitosano. Estos son: gelificación ionotrópica, micro emulsión, solvente de emulsificación difusión, complejo poli electrolítico y micelar inverso. De estos, el más ampliamente utilizado es el de gelificación ionotrópica. Es un método simple y no aplican uso de disolventes orgánicos, altas temperaturas o

sonicación. Se utiliza como entrecruzante el tripolisfosfato (TPP) que es un polianión multivalente, de baja toxicidad y a diferencia de otros este no presenta restricciones.

La microencapsulación se define en general, como el proceso de recubrir (encapsular) una sustancia activa (moléculas, sólidos, partículas o glóbulos líquidos, etc.) en partículas de tamaño micrométrico (Paños y col., 2008). Los productos resultantes de este proceso tecnológico se denominan micropartículas, microcápsulas o microesferas, que de acuerdo a las particularidades del sistema en lo que respecta a la morfología y la estructura interna, todos presentan un tamaño molecular < 1 mm (Poncelet, 2006; Paños y col., 2008). En cambio, las nanopartículas o nanocápsulas son sistemas coloidales con un tamaño < 1 micra (1-100 nm) (Murillo y col., 2001; Zhang y col., 2006), y ésta característica incrementa su funcionalidad (Huang y col., 2009; Du y col., 2008). Por otro lado, el quitosano es un polímero muy versátil, capaz de formar películas, hidrogeles, andamios porosos, fibras, micro y nanopartículas (Kildeeva y col., 2009; Zhou y col., 2008) que en conjunto con sus propiedades funcionales lo han llevado a ser uno de los compuestos más prometedores para la elaboración de matrices de liberación controlada.

Inmovilización de nanopartículas

La inmovilización de nanopartículas es una estrategia prometedora para mejorar la eficiencia y reutilización de las nanopartículas en procesos de degradación de contaminantes. Esta técnica implica fijar las nanopartículas en un soporte sólido, lo que facilita su recuperación y evita que se dispersen en el medio ambiente durante el tratamiento. La elección del procedimiento para crear micro y nanopartículas de quitosano está influenciada por diversas características, tales como las propiedades del compuesto activo, los materiales de recubrimiento y entrecruzamiento utilizados, el mecanismo de captura y liberación del

compuesto activo, el tipo de proceso empleado, así como la morfología y el tamaño deseado de las partículas. Todos estos factores son objeto de investigación para mejorar las variables del proceso y lograr una optimización adecuada. La gelificación ionotrópica es un proceso utilizado para la inmovilización de nanopartículas en una matriz gelificada. El procedimiento implica la preparación de una solución de quitosano en ácido acético, que se agrega lentamente con agitación continua a una solución de tripolisfosfato. Esto da lugar a la formación de complejos debido a la interacción electrostática entre las cargas opuestas, lo que lleva a la precipitación de partículas esféricas. Estas partículas resultantes tienen una resistencia limitada y se utilizan principalmente en la industria farmacéutica para liberar fármacos. No obstante, esta limitación puede superarse mediante la combinación con otros compuestos más resistentes, lo que permite mejorar su rendimiento y aplicaciones. Se forma un gel tridimensional mediante la interacción de iones con polímeros o biopolímeros, lo que permite atrapar y estabilizar las nanopartículas en la estructura gelatinosa. Esta técnica fue reportada por primera vez por Calvo et al. (1997) y ha sido ampliamente examinada y desarrollada. El método utiliza la interacción electrostática entre el grupo amina de quitosano y un grupo de polianiones con carga negativa como el tripolisfosfato. El quitosano se puede disolver en ácido acético en ausencia o presencia del estabilizador. Luego se añade polianión y las nanopartículas se forman espontáneamente bajo agitación mecánica a temperatura ambiente. El tamaño y la superficie la carga de las partículas se puede modificar cambiando la proporción de quitosano al estabilizador.

Se han desarrollado diferentes estrategias para trabajar con el uso de enzimas para la biorremediación de ambientes contaminados, ya que estas suelen inactivarse en presencia de agentes químicos o biológicos, sumándole su difícil recuperación y baja estabilidad. Una de

estas estrategias es la inmovilización enzimática; se refiere al hecho de fijar la proteína en un soporte insoluble, para hacer más fácil su separación y reutilización, y de igual manera brindarle mayor estabilidad.

El tamaño de las partículas depende de las propiedades del quitosano (peso molecular y grado de desacetilación), de la concentración de quitosano y de tripolifosfato, así como de la velocidad de agitación del proceso (Kildeeva y col., 2009).

Los métodos para elaboración de micro y nanopartículas basadas en quitosano, han sido desarrollados principalmente para aplicaciones farmacéuticas, para la liberación de drogas que necesitan cortos tiempos de liberación. Sin embargo, las propiedades y características del quitosano mencionadas anteriormente, son interesantes para llevar a cabo investigaciones sobre la obtención de partículas para aplicaciones en la agricultura y alimentación. En este proceso se busca confinar y/o localizar a la enzima en una región definida del espacio para dar lugar a formar insolubles, las cuales retienen su actividad catalítica y pueden ser reutilizadas repetidamente y así puedan tener aplicaciones industriales, estos procesos tienen como objetivo mejorar la eficiencia y la estabilidad enzimática. La inmovilización de nanopartículas para la degradación de contaminantes ofrece varias ventajas, como una mayor estabilidad y eficiencia del proceso, la posibilidad de recuperar y reutilizar las nanopartículas, y una reducción del impacto ambiental al evitar su dispersión en el medio ambiente. Sin embargo, es importante tener en cuenta las características específicas de las nanopartículas, el tipo de contaminante y las condiciones del medio ambiente antes de implementar esta técnica, para garantizar su eficacia y seguridad.

La oxidación avanzada es una tecnología eficiente para eliminar contaminantes persistentes, como compuestos orgánicos sintéticos, fármacos, pesticidas y productos químicos

industriales. Sin embargo, debido a su alta reactividad, estas técnicas deben emplearse con precaución y bajo control, ya que también pueden generar subproductos tóxicos o indeseables. Por lo tanto, es esencial optimizar las condiciones de tratamiento y tener en cuenta las características específicas de los contaminantes y el medio ambiente antes de aplicar estas técnicas en la eliminación de contaminantes.

HIPOTÉISIS

La lacasa inmovilizada en la nanopartícula de quitosano podría presentar cambios estructurales provocando mayor estabilidad e incrementando la actividad biocatalítica sobre el 2,3,5 triclorofenol.

METODOLOGÍA

Elaboración de partículas de quitosano – tripolisfosfato:

Las nanopartículas para la inmovilización de laccasa se elaboraron por el método de gelificación ionotrópica, utilizando quitosano comercial adquirido de casa sigma-aldrich en diferentes concentraciones y se realizó el entrecruzamiento mediante tripolisfosfato de sodio a diferentes condiciones de proceso (Ali et al., 2010).

Se preparó la solución madre de quitosano a .5% disolviendo 2.5 gr de quitosano de bajo peso molecular en 500 mL de agua destilada y 2 mL de ácido acético, ya que el quitosano es insoluble en agua y requiere un medio ácido para disolverse adecuadamente. El ácido acético actuó como un disolvente eficaz para el quitosano, ya que disocia los grupos amino del polímero, permitiendo su solubilización. A partir de esta solución se diluyó con agua destilada varias veces hasta obtener concentraciones de .025%, .05%, .1% y .2%, las cuales fueron nombradas Muestra A, Muestra B, Muestra C, Muestra D y Muestra D respectivamente.

Por otro lado, se preparó en un vaso precipitado el tripolisfosfato de sodio (TPP) a una concentración de 1%, disolviendo 2 gr de TPP en 200 mL de agua destilada.

Se utilizó la bomba peristáltica BT 100-01 para pasar 25 mL de cada una de las concentraciones de quitosano (Muestra A, B, C y D) a 50 mL de TPP 1%, a una velocidad de .5 rpm, en un tiempo aproximado de 20-25 minutos en promedio por concentración.

Inmovilización de lacasa en partículas de quitosano-TPP

Una vez obtenido el entrecruzamiento entre quitosano y TPP, se colocó en tubos de centrifuga de 50 mL la solución de cada una de las concentraciones de quitosano (Muestra A, B, C y D) y se utilizó una centrifuga OHAUS FC5718-R para centrifugar a 11,000 rpm por 15 minutos, posteriormente el sobrenadante fue eliminado y se agregó al mismo tubo 50 mL de agua destilada con el fin de lavar las nanopartículas, nuevamente se ingresó a la centrifuga por otros 15 minutos y una vez más el exceso de agua fue retirado quedando así en el tubo solo lo precipitado.

Se preparó por separado en un vaso precipitado la enzima lacasa: se disolvieron .12 gr de enzima lacasa en 300 mL de agua destilada y se dejó agitar hasta que quedó totalmente homogéneo. En un vaso precipitado se colocaron 50 mL de la solución de enzima y se añadió lo precipitado que se había obtenido en los tubos de centrifuga, se dejó agitando por 24 horas con un agitador magnético incorporado, tapado con papel film y envuelto en papel aluminio. Al paso del tiempo mencionado se colocó la solución de cada una de las concentraciones de nuevo en la centrifuga por otros 15 minutos a 11,000 RPM.

Para la mayoría de las técnicas que se utilizaron en esta investigación no fue necesario llegar al proceso del secado y/o liofilización, por lo que solo se depositaron cada una de las concentraciones por separado para su próxima utilización en tubos de centrifuga cubiertos de papel aluminio y también se selló papel film, Mientras que para otras técnicas tales como el IR se utilizó la muestra ya liofilizada.

Una vez ya inmovilizadas las partículas de quitosano + TPP con lacasa, fueron nombradas Muestra AA, Muestra BB, Muestra CC. Se eliminó la Muestra D, ya que a simple vista eran

evidentes la gran cantidad de aglomeración de micropartículas dando a conocer que eran partículas mucho más grandes de las que se estaban investigando.

Caracterización fisicoquímica de partículas de quitosano-TPP

La caracterización físico-química de nanopartículas se refiere al conjunto de técnicas utilizadas para evaluar y comprender las propiedades físicas y químicas de las nanopartículas. Estas técnicas nos permiten obtener información detallada sobre el tamaño, forma, composición química, estructura cristalina, carga superficial y estabilidad de las nanopartículas. Se seleccionaron y se combinaron distintas técnicas con el fin de proporcionar una caracterización más completa y precisa de las partículas.

Morfología

Espectroscopía de IR

La espectroscopia de infrarrojo es una herramienta esencial para identificar los grupos funcionales principales presentes en los componentes de las partículas y también para analizar las interacciones que ocurren entre ellos. El análisis de las partículas quitosano con TPP, se determinaron utilizando en un equipo de Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR (Perkin Elmer FT-IR Spectrum G). El análisis se realizó mediante tabletas compactadas de Muestra + KBr, en un barrido de longitud de onda de $400-4000\text{ cm}^{-1}$. (Liu y col., 2009; Geng y col., 2009).

El espectro infrarrojo resultante muestra una gráfica que representa la intensidad de la radiación en función de la longitud de onda o el número de onda. Cada grupo funcional presente en la muestra produce patrones de absorción característicos en el espectro infrarrojo. Estos patrones se deben a las vibraciones y rotaciones de los enlaces químicos en las

moléculas. Comparando el espectro de la muestra con bibliotecas de espectros conocidos, se puede identificar la presencia de grupos funcionales y obtener información sobre la estructura molecular.

En resumen, la espectroscopia de infrarrojo permite analizar la interacción de las moléculas con la radiación infrarroja para identificar grupos funcionales y obtener información sobre la composición y estructura química de una muestra.

Potencial Zeta y DLS

El potencial zeta (también conocido como potencial de carga o potencial electrocinético) y la técnica de difracción de luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés) son métodos utilizados para caracterizar las propiedades de partículas y suspensiones coloidales. Aunque están relacionados, son técnicas diferentes pero complementarias.

El potencial zeta se refiere a la carga eléctrica que rodea a una partícula en una suspensión coloidal. Esta carga eléctrica se genera debido a la presencia de grupos funcionales en la superficie de la partícula que pueden ionizarse en el medio acuoso. El potencial zeta se mide mediante la técnica de electroforesis, donde se aplica un campo eléctrico a la suspensión y se mide la velocidad a la que las partículas se mueven hacia un electrodo. El potencial zeta se utiliza para evaluar la estabilidad de las suspensiones coloidales, ya que las partículas con cargas similares se repelen entre sí, evitando su aglomeración y sedimentación.

Por otro lado, la difracción de luz dinámica (DLS) es una técnica que utiliza la dispersión de luz para medir el tamaño de partículas en una suspensión coloidal. Funciona midiendo las fluctuaciones en la intensidad de la luz dispersada por las partículas en movimiento debido al movimiento browniano. Estas fluctuaciones están relacionadas con el tamaño de las

partículas y se analizan mediante el efecto Doppler para determinar el tamaño hidrodinámico promedio de las partículas en suspensión.

Eficiencia de inmovilización

Para evaluar la eficiencia de inmovilización de la enzima se utilizó un espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis a 420 nm. Se preparó un buffer a un pH 4.5 agregando 1.64 gr de acetato de sodio a 200 mL de agua destilada, para posteriormente agregarle 0.011 gr de ABTS. El ABTS cuando se oxida produce un radical catión $ABTS^+$, que tiene un color verde azulado. Este cambio de color se puede cuantificar espectrofotométricamente midiendo el cambio en la absorbancia a lo largo del tiempo, lo cual refleja la velocidad de la reacción enzimática. Cuanto mayor sea la actividad enzimática, mayor será el cambio en la absorbancia.

Se depositaron 2.5 mL de ABTS + 100 μ L de cada una de las concentraciones, en unos tubos de ensayo donde reposaron en la oscuridad por 5 minutos, después se colocó la solución en macrocubetas de poliestireno para ser analizadas en el espectrofotómetro.

Eficiencia biocatalítica bajo diferentes condiciones

La eficiencia biocatalítica se refiere a la capacidad de los catalizadores biológicos, como las enzimas, para llevar a cabo reacciones químicas de manera altamente efectiva y selectiva. Las enzimas son moléculas de proteínas especializadas que aceleran las reacciones químicas en los organismos vivos sin ser consumidas en el proceso.

Temperatura optima

Las enzimas son proteínas y, como tal, tienen una estructura tridimensional que es sensible a los cambios de temperatura. Cada enzima tiene una temperatura óptima a la cual muestra su

máxima actividad catalítica. Por encima o por debajo de esta temperatura óptima, la actividad enzimática disminuye.

Se utilizó el ABTS que ya se había preparado anteriormente a un pH de 4.5 y se analizaron 7 distintas temperaturas (30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°, 80°c y 90°C) a 40 rpm, para llegar a estas temperaturas se utilizó un baño de agua con agitación Precision SWB27, en cada una de las concentraciones de quitosano, a un control y enzima disuelta en buffer por triplicado. Se empleó la misma técnica con los tubos de ensayo donde se depositaron 2.5 mL de ABTS + 100 µL de cada una de las concentraciones (Muestras AA, BB, CC, CONTROL y ENZIMA) , por separado. Estas reposaron de igual manera 5 minutos en la oscuridad para después depositarlas en macrocubetas de poliestireno para ser leídas a 420 nm.

pH óptimo

Para la evaluación de la eficiencia enzimática respecto a la variación de pH se utilizaron 7 diferentes niveles de pH (3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0). Para llegar a los pH más ácidos como el 3.0-6.0 se hizo uso de acetato de sodio + ácido acético y para los pH básicos del 7.0-9.0 fue la mezcla de tris-base + ácido clorhídrico (HCl) la que logró alcanzar estos niveles. De igual manera que en la temperatura cada una de las concentraciones de quitosano se llevó a cabo por triplicado, por cada uno de los pH. Se agregaron 2.5 mL de ABTS (preparado de la misma manera que cuando se evaluó la temperatura) y 100 µL de cada una de las concentraciones (Muestra A, B, C, CONTROL y ENZIMA) a diferente pH. Para leerse en el el espectrofotómetro se llevó a cabo el mismo procedimiento de reposar por 5 minutos en la oscuridad en tubos de ensayo para luego depositarlos en las macrocubetas de poliestireno.

Toxicidad en la incorporación de la partícula de quitosano-TPP

Toxicidad en semilla de lechuga

La evaluación clásica de la germinación de semillas se realiza mediante el análisis del impacto en el crecimiento de la raíz y el brote de las plántulas. Este método permite evaluar el efecto perjudicial de sustancias solubles presentes en concentraciones tan bajas que no son capaces de inhibir la germinación, pero que pueden retrasar o detener por completo los procesos de crecimiento de la raíz o el brote, dependiendo de la ubicación de acción de dichas sustancias. Se emplean diferentes métodos y ensayos para evaluar la toxicidad, como los siguientes:

- Prueba de germinación: Se evalúa el porcentaje de germinación de las semillas de lechuga expuestas a diferentes concentraciones de sustancias tóxicas. Se comparan con un grupo control sin exposición a la sustancia tóxica para determinar el efecto en la germinación.
- Prueba de elongación de la raíz: Se mide la longitud de la raíz de las plántulas de lechuga expuestas a diferentes concentraciones de sustancias tóxicas. Se analiza si hay un retraso o inhibición del crecimiento radicular en comparación con el grupo control.

Se empleó la semilla de lechuga como modelo estandarizado para evaluar la eficacia de las partículas de quitosano+TPP en la reducción de la toxicidad del plaguicida 2,3,5 Triclorofenol, el cual tiene un fuerte impacto en las etapas iniciales del crecimiento de las plantas, incluyendo la germinación de las semillas.

Toxicidad en *Aspergillus Parasiticus*

El modelo *Aspergillus parasiticus* permite evaluar la toxicidad de diferentes sustancias ya que se observa el crecimiento y la viabilidad del hongo en presencia de sustancias tóxicas. Se analiza el efecto sobre la colonización fúngica, la formación de esporas y otros parámetros de crecimiento. Estos estudios son importantes para comprender los riesgos potenciales de exposición a sustancias tóxicas y para desarrollar estrategias de prevención y control de la contaminación por aflatoxinas.

Se utilizó el hongo *Aspergillus parasiticus* como modelo para evaluar la toxicidad del 2,4-diclorofenol, ya que este compuesto es uno de los principales contaminantes presentes en productos orgánicos y tiene una alta incidencia en suelos agrícolas. La presencia de 2,4-diclorofenol en el ambiente y en la salud humana representa efectos nocivos debido a la generación de aflatoxinas.

El ensayo consistió en preparar un medio líquido de Czapek en un litro de agua destilada. Se colocaron 25 mL de este medio en cajas Petri de vidrio y se añadieron 4 cubreobjetos en la superficie. Posteriormente, se agregó 1 mL de una solución que contenía diferentes concentraciones de partículas de quitosano + TPP (0.2, 0.3, 0.4 mg/mL). A continuación, se inoculó el hongo *A. parasiticus* con una concentración de 1×10^4 esporas/mL y se incubó a 28°C.

Cada 5 horas, se contaron al azar 200 esporas en los cubreobjetos y se determinó el número de esporas germinadas y no germinadas. Se consideró que una espора había germinado cuando el tubo germinal alcanzaba una longitud igual o mayor al doble del diámetro de la espора, según el criterio establecido por Cota-Arriola y colaboradores en 2011. Se utilizaron

soluciones de 2,3,5 Triclorofenol a una concentración de 1 mg/mL y medio Czapek líquido sin tratamiento como controles.

Citotoxicidad

El ensayo de citotoxicidad es una técnica utilizada para evaluar el efecto de sustancias o compuestos en la viabilidad y el funcionamiento de las células. Este ensayo es comúnmente utilizado en investigaciones biológicas y en el desarrollo de fármacos y productos químicos.

El ensayo de citotoxicidad generalmente implica el cultivo de células en placas de cultivo y exponerlas a diferentes concentraciones de la sustancia que se desea evaluar. A continuación, se evalúa la viabilidad celular mediante la medición de parámetros como la integridad de la membrana celular, la proliferación celular, la función mitocondrial y la actividad enzimática.

Se realizó el ensayo estándar MTT (Mosmann, 1983) para determinar si los compuestos afectan la viabilidad celular. Se sembraron 10,000 células por pozo en placas de 96 pocillos, se expusieron a diferentes concentraciones de tratamiento Muestra BB (800,400,200, 100, 50 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubaron durante 48 horas. Posteriormente, se agregaron 10 μL de sal de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) al cultivo celular y se incubó durante 4 horas adicionales; luego, se agregaron 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar los cristales de formazán. La densidad óptica se leyó utilizando un lector de microplacas (BioTek Instruments, Inc 800 TS) a 570 nm como prueba y 630 nm como referencia. Se utilizó Muestra B como control negativo. Se realizaron tres ensayos en triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Elaboración de partículas de quitosano – tripolisfosfato por gelificación ionotrópica

En este estudio, se llevó a cabo la elaboración de partículas de quitosano y TPP (tripolisfosfato) con el objetivo de evaluar sus propiedades y su potencial aplicación en diferentes áreas. Los resultados obtenidos revelan varias conclusiones importantes.

En primer lugar, se observó que la técnica de gelificación ionotrópica utilizada en la preparación de las partículas de quitosano y TPP resultó exitosa. Esta técnica se basa en la interacción electrostática entre el quitosano; un polímero catiónico, y el TPP, que funciona como un agente de entrecruzamiento aniónico. La formación de enlaces iónicos entre estas dos moléculas condujo a la creación de partículas con una estructura estable.

En un estudio realizado por Zhang Y. et al. en el 2015, se demostró que estas partículas eran capaces de encapsular eficientemente un fármaco modelo y liberarlo de manera controlada en un entorno in vitro. Los resultados sugieren que las nanopartículas de quitosano/TPP tienen un gran potencial para ser utilizadas como sistemas de entrega de medicamentos.

Para esta investigación se utilizaron diferentes concentraciones de quitosano a partir de una solución madre de .5%. Se diluyó cuatro veces con el fin de obtener concentraciones como .025%, .05%, .1% y .2% ; las cuales fueron nombradas Muestra A, Muestra B, Muestra C y Muestra D, respectivamente. Se utilizó la misma cantidad de tripolisfosfato (TPP) 1% en cada una de estas muestras como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Concentraciones de CS-TPP para la obtención de partículas

CS %	TPP %	Nomenclatura
0.025	1	Muestra A
0.05	1	Muestra B
0.1	1	Muestra C
0.2	1	Muestra D

En términos de aplicaciones potenciales, las partículas de quitosano y TPP presentan diversas ventajas. El quitosano es un polímero biocompatible y biodegradable, lo que lo convierte en un material prometedor para aplicaciones en medicina y biotecnología. Por otro lado, el TPP puede actuar como un agente de entrecruzamiento efectivo, lo que confiere estabilidad y resistencia a las partículas.

En el 2018 en un estudio realizado por Nemwari y colab, se elaboraron nanopartículas de quitosano/TPP, entre sus conclusiones se puede destacar que desafortunadamente, las nanopartículas de quitosano/TPP suelen ser polidispersas y presentan una baja estabilidad, lo que limita su uso. Esta es una de las razones por la que este estudio hace varios análisis con el fin de llegar a las condiciones óptimas para la elaboración de partículas de quitosano/TPP.

Inmovilización de lacasa en partículas de quitosano-TPP

Según la definición de Poncelet (2006), las nanopartículas se refieren a partículas con un tamaño inferior a 1 μm , mientras que las micropartículas son aquellas con un tamaño inferior a 1 mm. Sin embargo, también se pueden clasificar según su estructura. Las micropartículas se definen como estructuras enrejadas donde el compuesto activo se encuentra libre dentro

del enrejado o interactuando con la matriz, y las nanopartículas son estructuras compactas en las que la mayoría del compuesto activo está muy cerca de la matriz e interactúa con ella (Kumar et al., 2000).

Siguiendo la clasificación propuesta por Poncelet (2006), en este estudio se generaron micropartículas (Mpartículas) y nanopartículas (Npartículas) a partir de quitosano y TPP utilizando el método de gelificación ionotrópica. Además, se logró la incorporación del compuesto activo lacasa en cada una de estas estructuras (Tabla 2).

Tabla 2. Nomenclatura y Concentraciones de lacasa incorporada a las partículas de CS-TPP

TPP (%)	LACASA	QUITOSANO (%)	Nomenclatura
1	0.164	0.025	Muestra AA
1	0.164	0.05	Muestra BB
1	0.164	0.1	Muestra CC
1	0.164	0.2	Muestra DD

Se analizaron las cuatro muestras en las cuales se observaron a simple vista que entre mayor cantidad de quitosano mayor era la evidencia de que había partículas ya que se formaron aglomeraciones altamente visibles, haciendo la solución también un poco turbia, por lo cual se decidió eliminar de la investigación la Muestra DD. Por lo contrario, la Muestra AA fue la que presentó mayor homogeneidad y claridad en la solución ya que se formaron nanopartículas y micropartículas, las cuales no son tan visibles a simple vista, aunque se

podría notar un cierto nivel de turbidez en la solución indicando que hay presencia de las mismas (Figura 4).

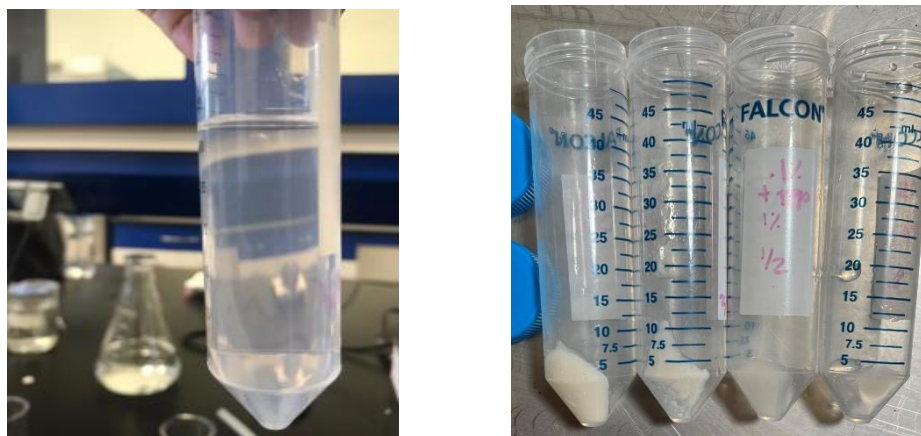


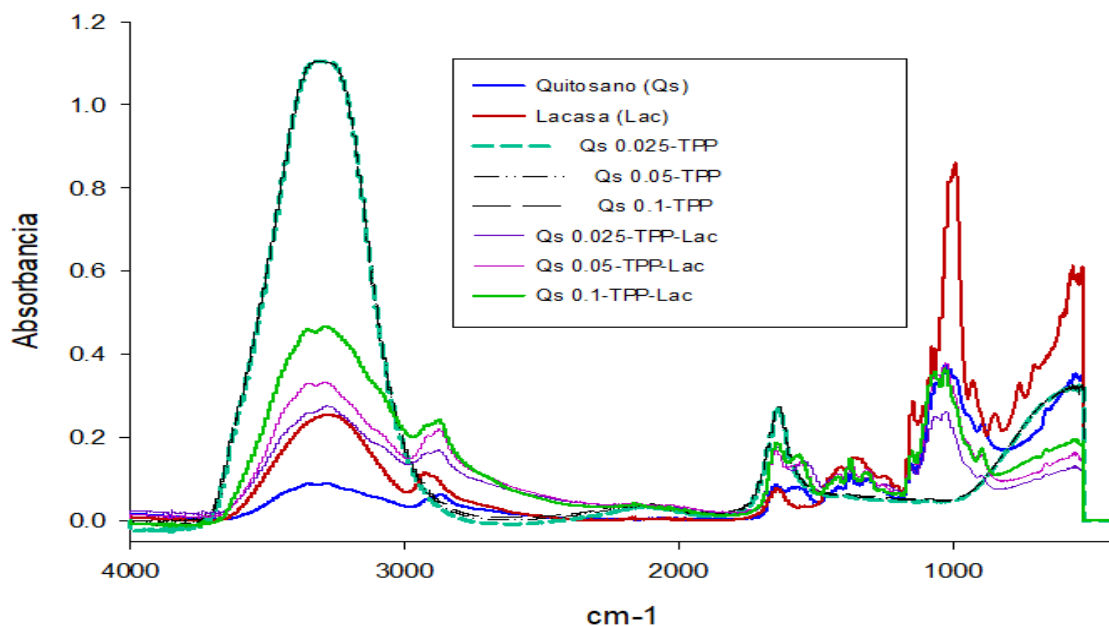
Figura 4. Imágenes de partículas de CS-TPP con incorporación de lacasa.

- **Caracterización fisicoquímica de partículas de quitosano-TPP**

Espectroscopía de Infrarrojo

Los espectros de infrarrojo del quitosano de bajo peso molecular se muestran en la Figura 5, en la cual se observan el pico característico de la amida primaria presente a 1650 cm^{-1} , el pico alrededor de 1380 cm^{-1} corresponden a las vibraciones de deformación del C-H del grupo acetamida de los residuos no desacetilados del CS; la banda a 1552 cm^{-1} indica la presencia de la amida II y la banda presente a 1084 cm^{-1} corresponde al estiramiento vibracional del C-O-O (Mathew y col., 2008; Woranuch y Yoksan 2013). Además se muestran los espectros correspondiente a la inmovilización de lacasa en las partículas de quitosano elaborada por entrecruzamiento con tripolifosfato de sodio, observándose la

Figura 5. Espectros de infrarrojo de las partículas de CS-TPP con incorporación de lacasa



presencia de la banda correspondiente a la amina primaria del quitosano a 1650 cm^{-1} y la aparición de las bandas correspondientes a la presencia del TPP como las vibraciones de estiramiento del grupo P=O del ion fosfato alrededor de 1228-1115 y 889-750 cm^{-1} , y la banda correspondiente a las vibraciones de deformación del P=O a 527 cm^{-1} indicando el entrecruzamiento intróptico entre el quitosano y el tripolifosfato. Asimismo se observaron cambios significativos, como el decremento en la intensidad de grupo correspondiente a la amina primaria a 1650 cm^{-1} y aumento del pico característico de la amida II a 1550 en relación con el espectro de α y β quitosano. Además se presenta desaparición de bandas características del quitosano en la región de 1000 a 1500 cm^{-1} indicando la presencia e interacción de la enzima lacasa de *Agaricus bisporus* con el polímero de quitosano durante la formación de la partícula.

El análisis de espectroscopia de infrarrojo es una de las técnicas más utilizadas e importantes en diferentes campos científicos.

Potencial Zeta y tamaño de partículas

La carga superficial o potencial zeta es un elemento esencial que influye en las características de las partículas, especialmente en lo que respecta a su estabilidad. Además, este potencial puede influir en su capacidad antimicrobiana, ya que puede generar interacciones con la membrana celular de bacterias y hongos. El potencial zeta que se reporta en diversos estudios de partículas de CS entrecruzadas con tripolisfosfato es variable. Los factores más importantes que intervienen son la concentración de TPP, CS, del compuesto activo y el pH del medio (Hina y col., 2008; Liu y Gao, 2009; Keawchaon y col., 2011).

En este estudio se utilizó la misma cantidad de TPP y de compuesto activo (enzima lacasa) para las tres muestras por lo que se puede adjudicar la variación de tamaño a la concentración de quitosano; entre mayor concentración se observa un tamaño mayor de partícula. En la tabla 3 se muestran los resultados de tamaño y potencial zeta de las partículas de CS-TPP y con la incorporación de lacasa. Se observa que el potencial zeta disminuye a medida que la concentración de quitosano se incrementa para una misma concentración de TPP (Jang K. & Lee H. 2008), debido a que los grupos amino protonados del quitosano se neutralizan por la presencia de los aniones del TPP. El quitosano tiene un potencial zeta positivo (13.469 ± 1.880) debido a la presencia de grupos amino protonados en su estructura, esto es considerando que el pH es bajo o ácido. A medida que el pH se vuelve más alcalino, el

Tabla 3. Tamaño y potencial zeta de las partículas de CS-TPP y con incorporación de lacasa

Partícula	Tamaño (nm)	Potencial Zeta
Muestra AA	796.10 ± 122.775	49.06 ± 1.860
Muestra BB	741.644 ± 163.09	54.737 ± 1.206
Muestra CC	1573.55 ± 222.775	13.559 ± 0.790
TPP	-	-13.257 ± 4.191
CS	-	13.469 ± 1.880

Valores promedio ±desviación estándar

quitosano puede perder protones y su potencial zeta puede disminuir o incluso volverse negativo. Por otro lado, el TPP tiene un potencial zeta negativo, lo que indica la presencia de cargas negativas en la superficie de las partículas. Esto se debe a la disociación de los grupos fosfato presentes en la estructura del TPP, que pueden adquirir carga negativa en solución acuosa.

Eficiencia de inmovilización

La eficiencia de encapsulación de las matrices depende de diversos factores como son la concentración y propiedades del polímero a utilizar (CS), del agente entrecruzante (TPP), del grado de entrecruzamiento, tamaño y morfología de la matriz, concentración y estructura del compuesto activo, del método de obtención de la matriz y de otros factores como agitación, pH del medio, etc (Agnihotri y col., 2004).

En la Universidad Federal de Rio de Janeiro se realizaron dos estudios tratando de inmovilizar partículas de quitosano, en el primero elaborado por Mendoza y col. 2015 se

alcanzó una eficiencia de 61.6%, mientras que en el 2018 escribieron Esparza y colab. que se había alcanzado una eficiencia de solo el 43.2%, ambos emplearon glutaraldehído como entrecruzante, pero utilizaron diferente pH. Por otro lado, Ragelle y colab. en el 2013 realizaron un estudio donde se utilizó tripolisfosfato como entrecruzante y se obtuvo una eficiencia arriba de 90%, en este estudio es importante mencionar que obtuvieron nanopartículas de un tamaño promedio de 200 nm. En otro estudio realizado en el 2019 inmovilizando lacasa en nanopartículas de quitosano/TPP por D. Jeong y colab. se alcanzó una eficiencia de 52%. También se ha encapsulado vitamina E en microesferas de CS por secado por atomización (Spray drying) con una eficiencia de $78.4 \pm 2.4\%$ (Yenilmez y col., 2011). Con el fin de alcanzar la mayor eficiencia posible en este estudio se utilizó el tripolisfosfato como entrecruzante.

En la tabla 4 se presentan los porcentajes de inmovilización de lacasa en las partículas de CS-TPP, determinándose la cantidad de lacasa encapsulada en las matrices de CS-TPP mediante la medición de dos componentes: lacasa libre, que corresponde a la cantidad de lacasa que no se une a la matriz de CS-TPP, y lacasa ligado, que representa la cantidad de enzima que interactúa con la matriz de CS-TPP.

Como se muestra en la Tabla 4 se alcanzó una eficiencia en un promedio de 76%, se encontraron las tres muestras estadísticamente iguales. De acuerdo al porcentaje de eficiencia encontrados en artículos similares se puede concluir que esta investigación tiene un buen nivel de eficiencia de inmovilización de la lacasa, quedando arriba del promedio.

Tabla 4. Eficiencia de inmovilización de lacasa en partículas de CS-TPP

Partícula	Eficiencia de inmovilización de la lacasa (%)
Muestra AA	76.57 ± .9616
Muestra BB	75.29 ± .2899
Muestra CC	74.36 ± 3.8395

Valores promedio ± desviación estándar.

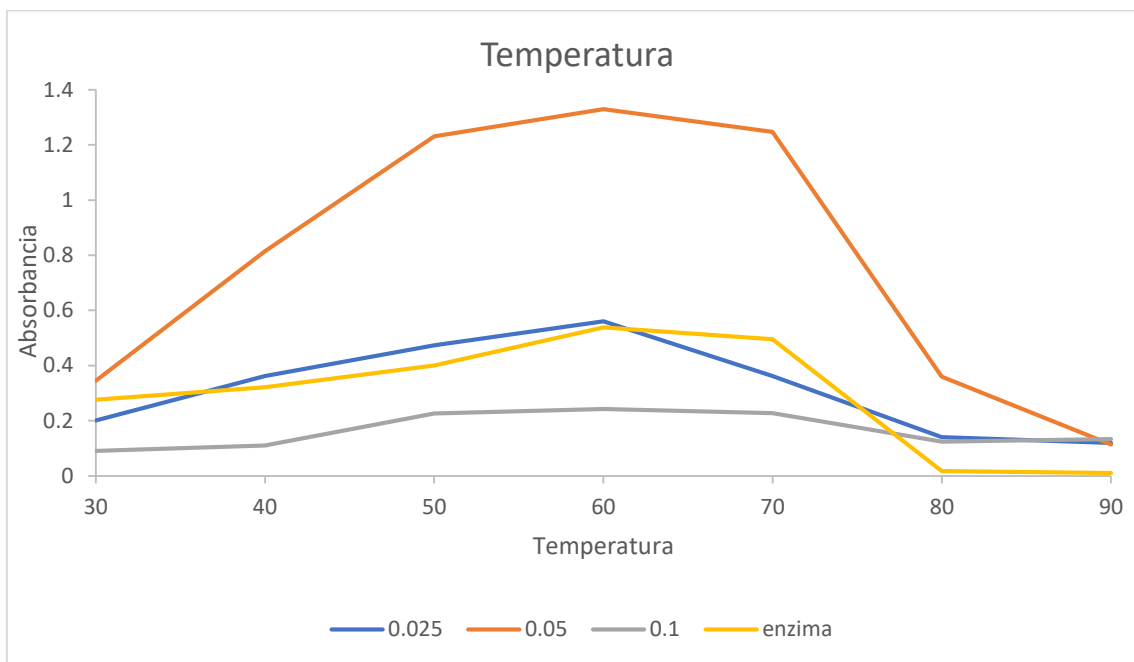
- **Eficiencia biocatalítica bajo diferentes condiciones**

Temperatura óptima

La eficiencia catalítica de un proceso o reacción química puede variar significativamente bajo diferentes temperaturas. A medida que la temperatura cambia, puede haber alteraciones en la actividad, selectividad y estabilidad del catalizador, lo que influye en la eficiencia general del proceso catalítico. Determinar la temperatura óptima es importante para maximizar la actividad catalítica, teniendo en cuenta las condiciones específicas del sistema y las limitaciones del proceso. Esto se logra realizando estudios experimentales o simulaciones que evalúen el comportamiento del catalizador en un rango de temperaturas.

De acuerdo a la Figura 6 representa la gráfica de la eficiencia catalítica respecto a la variación de la temperatura. Se puede observar que las muestras tuvieron el mismo comportamiento, aunque la Muestra BB alcanzó el mayor nivel de absorbancia llegando a los casi al 1.5 de absorbancia En un estudio realizado por Mitra Naghdi y colab (2018) donde se encapsuló lacasa en nanopartículas de quitosano se mostró como temperatura óptima los 20°C ya que fue donde se alcanzó el mayor porcentaje de absorbancia, aunque en el presente estudio no

Figura 6. Análisis de temperatura óptima de la actividad de la lacasa inmovilizada en partículas de CS-TPP



se tuvo el parámetro de 20°C es evidente que a partir de los 40°C hay un aumento de absorbancia hasta los 80°C donde comienza a descender el nivel de absorbancia. En las tres muestras y en la enzima libre se puede observar que la temperatura óptima es en los 60°C. Las diferencias de valor de la temperatura óptima de las enzimas inmovilizadas dependen del método de inmovilización y de las interacciones entre la enzima y el soporte (Nuzhet, e colab 2011).

En general, a temperaturas más bajas, la actividad catalítica tiende a disminuir debido a la menor energía cinética de las moléculas. En la gráfica se puede observar como efectivamente de los 30°-40° la eficiencia catalítica permanece baja.

Por otro lado, a temperaturas más altas, la actividad catalítica aumenta debido al incremento en la energía cinética es por eso, que entre más aumenta la temperatura se puede observar

como también aumenta el nivel de absorbancia hasta llegar al punto óptimo; que sería a los 60°C. Sin embargo, a medida que la temperatura sigue aumentando, pueden surgir otros efectos adversos. A partir de los 70°C se puede observar como el nivel de absorbancia vuelve a disminuir; esto puede ocurrir por reacciones secundarias no deseadas, la desactivación del catalizador puede acelerarse debido a las altas temperaturas o cambios estructurales.

Ph óptimo

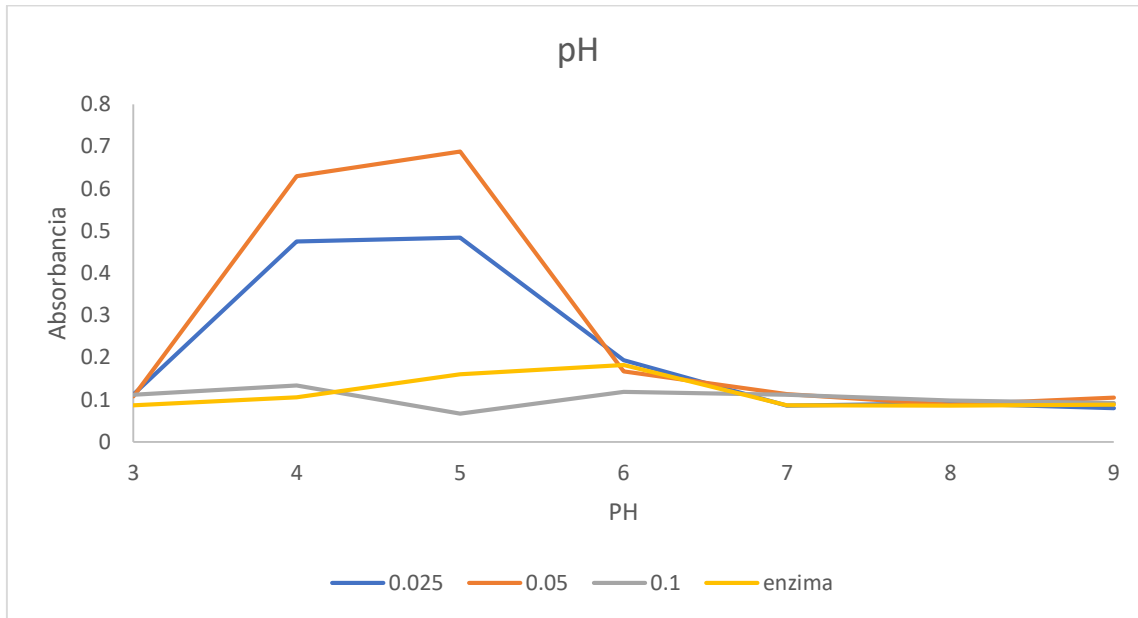
La eficiencia catalítica de un proceso o reacción química también puede verse afectada por el pH del medio en el que se lleva a cabo la reacción. El pH es una medida de la acidez o alcalinidad de una solución y puede influir en la actividad y la selectividad del catalizador.

En general, diferentes catalizadores pueden tener una actividad óptima en un rango de pH específico. Esto se debe a que el pH puede afectar la carga y la solubilidad de los reactivos, la estructura del catalizador y las interacciones entre ellos. Un cambio en el pH puede alterar la química de la reacción y, por lo tanto, la eficiencia catalítica.

En un estudio realizado por Liu y Gao (2009) sobre nanopartículas de quitosano entrecruzadas con TPP, mencionan que al bajar el pH de 5.5 a 5.0, aumentó su carga superficial, sugiriendo que las partículas sufren un reacomodo en su estructura. Mientras que en otro estudio realizado por Nuzhet y colab (2011) se determinó que el pH óptimo era entre el 3 y el 5. En los estudios descritos anteriormente se observa que la eficiencia catalítica en variación de pH es muy similar con respecto a los valores obtenidos en el presente estudio para las tres matrices elaboradas y la enzima libre.

En la Figura 7 se puede observar el mismo comportamiento, se encuentra como pH óptimo entre el 4-5, mientras que los pH más alcalinos el nivel de absorbancia es casi nulo. Este

Figura 7. Análisis de pH óptima de la actividad de la lacasa inmovilizada en partículas de CS-TPP



resultado se puede atribuir a las restricciones de movimiento de la enzima debido a las interacciones iónicas entre la enzima y las nanopartículas.

- **Toxicidad en la incorporación de la partícula de quitosano-TPP**

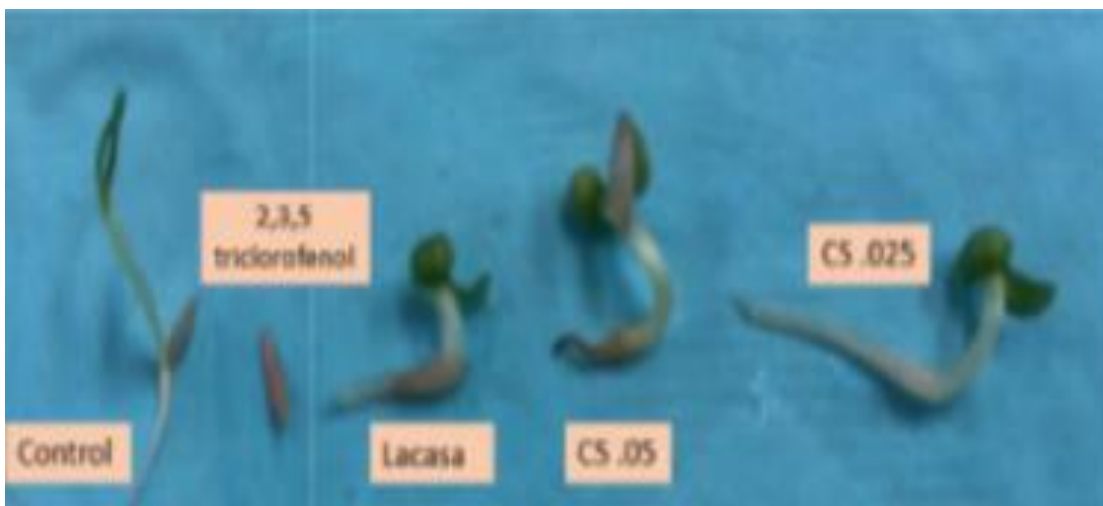
Toxicidad en semillas de lechuga

La prueba tradicional de germinación de semillas es mediante la evaluación del efecto en la elongación de la radícula y del hipocótilo de las plántulas ya que permite ponderar el efecto tóxico de compuestos solubles presentes en niveles de concentración tan bajos que no son suficientes para inhibir la germinación, pero pueden retardar o inhibir completamente los

procesos de elongación de la radícula o del hipocotilo, dependiendo del sitio de acción del compuesto. (María Sobrero y Alicia Ronco).

El herbicida 2,3,5 Triclorofenol tiene un fuerte impacto en etapas tempranas del crecimiento de las plantas, como la germinación de semillas. Por lo tanto, en este estudio se utilizó la semilla de lechuga como modelo para evaluar la eficacia de las partículas de quitosano+TPP en la reducción de la toxicidad del 2,3,5 Triclorofenol. En la Figura 8, se puede observar la germinación de las semillas de lechuga, donde el grupo de control muestra una germinación normal. Además, se muestra la germinación en presencia de 2,3,5 Triclorofenol, donde no se observa germinación debido al efecto herbicida del compuesto. Sin embargo, también se presenta la germinación de las semillas en presencia del contaminante tratado con partículas de quitosano+TPP y lacasa, mostrando una germinación exitosa y demostrando la efectividad de los tratamientos para reducir la toxicidad del 2,3,5 Triclorofenol.

Figura 8. Toxicidad de la degradación del 2,3,5 Triclorofenol en presencia de partículas de CS-TPP con incorporación de lacasa, usando como modelo semilla de lechuga



Además, en la Figura 8 se muestran las mediciones del crecimiento de la radícula y el hipocótilo en los tratamientos y los grupos de control. En el grupo de control, se observa un crecimiento normal de la radícula y el hipocótilo. Por otro lado, en presencia del 2,3,5 Triclorofenol, no se observa crecimiento debido a la falta de germinación de las semillas. Sin embargo, cuando el contaminante fue tratado con partículas de quitosano+TPP y lacasa, se observa un crecimiento de la radícula y el hipocótilo, y este crecimiento aumenta a medida que se incrementa la concentración de las partículas. Es importante destacar que el crecimiento de la radícula y el hipocótilo en todos los tratamientos fue significativamente menor que en el grupo de control. Esto indica que los tratamientos utilizados fueron efectivos para desintoxicar el 2,3,5 Triclorofenol, lo que sugiere que esta tecnología tiene un gran potencial para su aplicación en aguas contaminadas.

Asimismo, los resultados obtenidos demuestran que las partículas de quitosano+TPP fueron eficaces en la disminución de la toxicidad del 2,3,5 Triclorofenol durante la germinación de semillas de lechuga. Estos hallazgos respaldan la prometedora aplicación de esta tecnología en el tratamiento de aguas contaminadas con herbicidas como el 2,3,5 Triclorofenol.

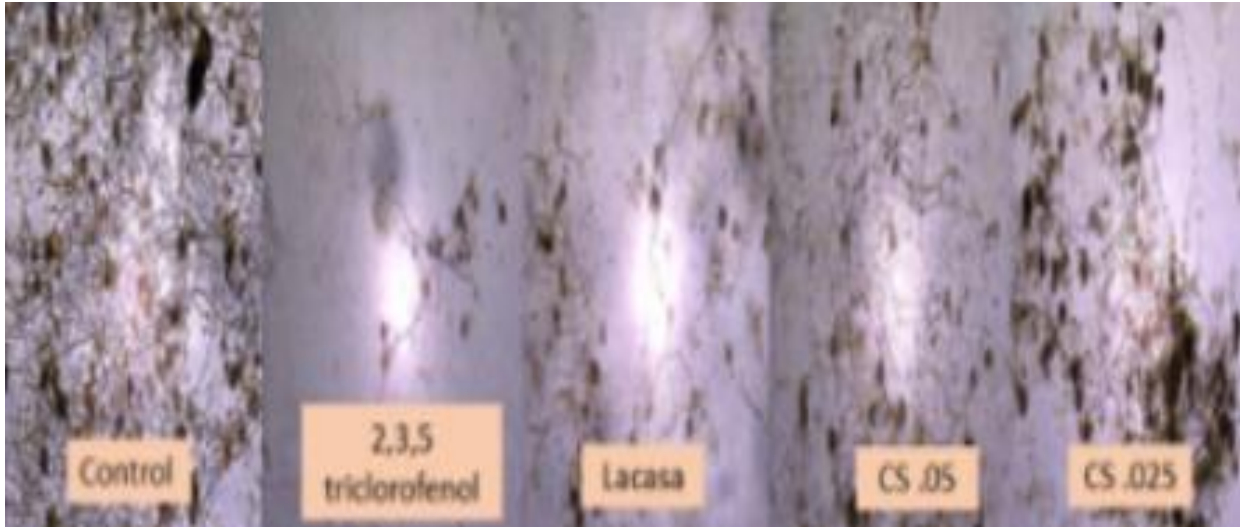
Toxicidad en *Aspergillus Parasiticus*

Aspergillus parasiticus es conocido como uno de los principales hongos contaminantes de productos orgánicos y no orgánicos, y se encuentra con frecuencia en diversos suelos de cultivo y en el almacenamiento de granos (Gorman et al., 1991). Debido a su importancia en la contaminación de alimentos como en la producción de compuestos tóxicos, como las aflatoxinas, han sido objeto de estudio durante varios años. Por lo tanto, en este estudio se

utilizó *Aspergillus parasiticus* en la etapa de germinación para evaluar la remediación del 2,3,5 Triclorofenol, un conocido pesticida antimicrobiano. Esta etapa de germinación nos proporcionó información sobre la adaptación de este hongo en presencia de compuestos tóxicos como el 2,3,5 Triclorofenol.

En la Figura 9 se muestra la medición de la germinación de las esporas de *A. parasiticus* durante un ensayo de 20 horas, realizando mediciones cada 5 horas. En el grupo de control, que contenía medio Czapek líquido, se observó un comportamiento de germinación exponencial. Sin embargo, en presencia de 2,3,5 Triclorofenol sin tratar, la germinación fue baja, alcanzando solo un 20% debido al efecto antimicrobiano del contaminante. Además, se observó que las partículas de quitosano + TPP tuvieron un efecto sobre la germinación de las esporas de *A. parasiticus*, mostrando un efecto antimicrobiano frente al hongo en comparación con el grupo de control Czapek. Finalmente, se observó que la germinación de las esporas de *A. parasiticus* en presencia de 2,3,5 Triclorofenol tratado con quitosano+TPP y lacasa aumentó al 50%, lo que indica que este tratamiento fue efectivo para reducir la toxicidad del 2,3,5 Triclorofenol. Además, en la Figura 9 se muestra ilustrativamente la morfología y germinación de las esporas de *A. parasiticus*, donde se observa que la germinación aumentó cuando el 2,3,5 Triclorofenol fue tratado con las partículas de quitosano+TPP.

Figura 9. Toxicidad de la degradación del 2,3,5 Triclorofenol en presencia de partículas de CS-TPP con incorporación de lacasa, usando como modelo semilla de lechuga



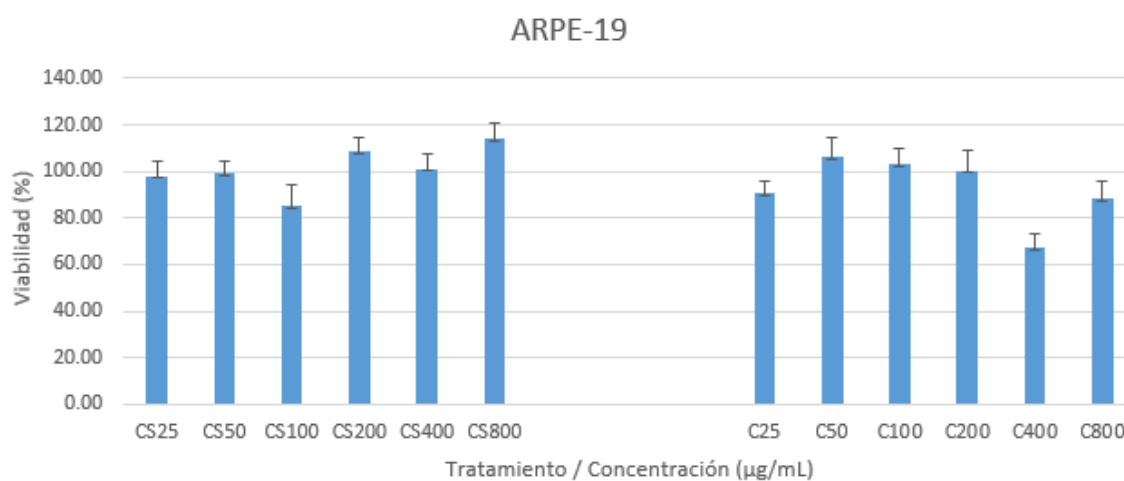
Citotoxicidad

La citotoxicidad de las nanopartículas se evaluó utilizando el ensayo MTT al determinar la viabilidad de las células después de 48 horas de incubación. Los ensayos celulares se utilizan con frecuencia con el fin de determinar si las moléculas de prueba tienen efectos sobre la proliferación celular o muestran efectos citotóxicos directos que eventualmente conducen a la muerte celular.

Las células viables con metabolismo activo convierten el MTT en un producto de formazán de color púrpura con un máximo de absorción cerca de 570 nm. Cuando las células mueren, pierden la capacidad de convertir el MTT en formazán, por lo que la formación de color sirve como un marcador útil y conveniente solo para las células viables (Riss, 2015).

En la figura 10 se muestran los resultados de la citotoxicidad utilizando células ArPE-19 a diferentes concentraciones. Se observa que la viabilidad de las células no presentaron un cambio significativo respecto al control, por lo que no se encontró un efecto citotóxico ni en los controles de CS ni en las nanopartículas con incorporación de la lacasa, lo cual puede deberse a que la lacasa degradó al compuesto tóxico 2,3,5 Triclorofenol.

.Figura 10. Ensayo de citotoxicidad de nanopartículas de CS-Tpp con incorporación de lacasa



CONCLUSIONES

En el presente estudio se logró la inmovilización de lacasa en partículas de quitosano, obteniendo una eficiencia superior al 70%. Asimismo se obtuvieron partículas de tamaño nanométrico siendo la nanopartícula de la Muestra 2 (CS 0.05) la que presentó mayor actividad biocatalítica, encontrándose mayor efectividad a temperaturas de 50°C – 70°C, y en pH de 4-5. Además

Se logró disminuir la toxicidad del contaminante 2,3,5 triclorofenol en el modelo de lechuga y hongo *Aspergillus parasiticus* y las partículas obtenidas no mostraron un efecto citotóxico en las células de ensayo. En base a los resultados obtenidos se puede determinar que es posible obtener una tecnología prometedora para su aplicación en la remediación de contaminantes ambientales

BIBLIOGRAFÍA

- Algal, R. L. (2014). Plaguicidas en México: usos, riesgos y marco regulatorio. Obtenido de Plaguicidas en México: usos, riesgos y marco regulatorio: <https://www.globalsciencejournals.com/content/pdf/10.7603%2Fs40682-013-0003-1.pdf>
- Al-nemrawi, N. K., Alsharif, S. S. M., & Dave, R. H. (2018). Preparation of chitosan-tpg nanoparticles: The influence of chitosan polymeric properties and formulation variables. *International journal of applied pharmaceuticals*, 10(5), 60.
- Arıca, M. Y., Altıntaş, B., & Bayramoğlu, G. (2009). Immobilization of laccase onto spacerarm attached non-porous poly (GMA/EGDMA) beads: application for textile dyedegradation. *Bioresource technology*, 100(2), 665-669.
- ATSDR. (JUNIO de 1999). CLOROFENOLES. Obtenido de https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts107.pdf
- Badawy MEI, Rabea EI (2011) A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection. *Int J Carbohydr Chem* 2011:1–29
- Barros, A. P. (2016). PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO MODIFICADAS CON ALGINATO DE SODIO CON POTENCIAL PARA LA LIBERACION CONTROLADA DE MEDICAMENTO. *Revista EIA*, 75-83.
- Bradberry, S. M., Watt, B. E., Proudfoot, A. T., & Vale, J. A. (2000). Mechanisms of toxicity, clinical features, and management of acute chlorophenoxy herbicide poisoning: a review. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 38(2), 111-122.

- Caprile, M. D. (2005). Obtención y Utilización de Quitina y quitosano a partir de desechos de crustaceos.
- Cota-Arriola, O., Cortez-Rocha, M. O., Rosas-Burgos, E. C., Burgos-Hernández, A., López-Franco, Y. L., & Plascencia-Jatomea, M. (2011). Antifungal effect of chitosan on the growth of *Aspergillus parasiticus* and production of aflatoxin B1. *Polymer International*, 60(6), 937-944
- Cota-Arriola, O., Onofre Cortez-Rocha, M., Burgos-Hernández, A., Marina Ezquerra-Brauer, J., & Plascencia-Jatomea, M. (2013). Controlled release matrices and micro/nanoparticles of chitosan with antimicrobial potential: development of new strategies for microbial control in agriculture. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(7), 1525-1536.
- Durán, N., Rosa, M. A., D'Annibale, A., & Gianfreda, L. (2002). Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(7), 907-931.
- Du, W. L., Niu, S. S., Xu, Y. L., Xu, Z. R., & Fan, C. L. (2009). Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions. *Carbohydrate Polymers*, 75(3), 385-389.
- Du, W.L. Xu, Y.L. Xu, Z.R. Fan, C.L. (2008). Preparation, characterization and antibacterial properties against *E. Coli* K88 of chitosan nanoparticle loaded copper ions. *Nanotechnology*, 19, 1-5.
- Fernández-Fernández, M., Sanromán, M. Á., & Moldes, D. (2013). Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnology advances*, 31(8), 1808-1825.
- Fernandes, S. C., de Oliveira, I. R. W., Fatibello-Filho, O., Spinelli, A., & Vieira, I. C. (2008). Biosensor based on laccase immobilized on microspheres of Chitosan crosslinked with tripolyphosphate. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 133(1), 202-207.
- Flores, E., Dias Cardoso, E., Siqueira, B., Klein, L., & Hertz, P. F. (s/f). 27. *Agroalimentar Efecto del pH en genipina usada como agente de inmovilización para β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* en esferas de quitosano.*
- Fricker AD, Laroe SL, Shea ME, Bedard DL (2014) *Dehalococcoides mccartyi* strain JNA dechlorinates multiple chlorinated phenols including pentachlorophenol and harbors at least 19 reductive dehalogenase homologous genes. *Environ Sci Technol* 48:14300– 14308

- Giraldo, J. D. (MAYO de 2015). PROPIEDADES, OBTENCION, CARACTERIZACION Y APLICACIONES DEL QUITOSANO. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/277302110_PROPIEDADES_OBTENCION_CARACTERIZACION_Y_APLICACIONES_DEL_QUITOSANO
- Honarkar, H., & Barikani, M. (2009). Applications of biopolymers I: chitosan. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 140(12), 1403.
- Hu, X., Zhao, X., & Hwang, H. M. (2007). Comparative study of immobilized *Trametes versicolor* laccase on nanoparticles and kaolinite. *Chemosphere*, 66(9), 1618-1626.
- Jersey, D. d. (JUNIO de 2006). HOJA INFORMATIVA SOBRE SUBSTANCIAS PELIGROSAS. Obtenido de <https://www.nj.gov/health/eoh/rtkweb/documents/fs/1895sp.pdf>
- Jin X, Gao J, Zha J, Xu Y, Wang Z, Giesy JP, Richardson KL (2012) A tiered ecological risk assessment of three chlorophenols in Chinese surface waters. *Environ Sci Pollut R* 19:1544–1554
- Jiménez, B. E. (2001). La contaminación ambiental en México. Editorial Limusa.
- Kalkan, N. A., Aksoy, S., Aksoy, E. A., & Hasirci, N. (2012). Preparation of chitosan coated magnetite nanoparticles and application for immobilization of laccase. *Journal of Applied Polymer Science*, 123(2), 707–716.
- Karam, J., & Nicell, J. A. (1997). Potential applications of enzymes in waste treatment. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 69(2), 141–153.
- Keith LH, Telliard WA (1979) Priority pollutants I—a perspective view. *Environ Sci Technol* 13:416–423
- Kety León, J. G. (2011). Obtención de partículas de quitosano mediante radiación gamma y gelación ionotrópica . Obtenido de <http://dspace.ipen.gob.pe/bitstream/ipen/326/1/ICT%202011%20%20Pag%2015-19.pdf>
- Madati P.J. (1984). Environmental Health Criteria 29, 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D), INCHEM, International Programme On Chemical Safety (IPCS a joint venture of the United Nations Environment Programme, the International Labour Organisation, and the World Health Organization),
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., & Fernandez Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity

Via immobilization techniques. Enzyme and Microbial Technology, 40(6), 1451-1463.

Medicine, U. N. (20 de abril de 2019). 2,4,5-Trichlorophenol. Obtenido de https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_4_5-trichlorophenol

Payán, D. A. (2017). Diseño de nanopartículas de quitosano con actividad. Obtenido de Diseño de nanopartículas de quitosano con actividad: https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/833/1/tesis_AIarc%C3%B3n_Pay%C3%A1n_Dulce_Biblioteca_ECL_EGM_Corregida_11_ene_016.pdf

Plascencia-Jatomea, M. 2004. Estudio de la actividad antifúngica del quitosano en solución y en películas. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa. México, D.F. 4-24,71-87.

Raveendran S., P. V. (MAYO de 2015). Extremophilic polysaccharide nano` particles for cancer nanotherapy and evaluation of antioxidant propieties.

Rinaudo, M. 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. Prog. Polym. Sci. 31(7): 603–632.

Rinaudo, M., Milas M. y Le-Dung, P. 1993. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. Int J Biol Macromol.15: 281–285.

Riva, S. (2006). Laccases: blue enzymes for green chemistry. TRENDS in Biotechnology, 24(5), 219-226.

Sánchez, E. R. (2006). CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LACASAS DE *Pleurotus eryngii*: EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE ESTAS ENZIMAS Y APLICACIONES DE LA DEGRADACION DE CONTAMINANTES AROMATICOS. MADRID.

SNVE, S. N. (2007). Secuelas de la intoxicacion por plaguicidas(mutaciones enticas, esterilidad, neurotoxicidad, cancer. Epidemiologia: Sistema unico de Informacion.

Santos, V. P. S. D., Mendonça, C. H., Dos Santos, R. V. G., Mihos, F. C. S. S., Torres, A. G., Pereira, K. S., & Salgado, A. M. (s/f). INMOVILIZACIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO DE LA TIROSINASA DE *AGARICUS BISPORUS* EM MEMBRANA DE NYLON Y ESFERAS DE QUITOSANA. Org.ar.

Sobrero, M. C., & Ronco, A. (2004). Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. IDRC/IMTA. Canadá, Capítulo, 4, 71-79.

TELLECHEA, F. P. (3 de septiembre de 2007). Riesgos a la salud humana causados por plaguicidas.

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (2011) Química Orgánica, Manual de prácticas (2ª. Edición). Pachuca, Hgo. México. Castillo, M.G., Núñez, J., Hernández, A., Rodríguez, M.C, Quintanar, S., Luna, F., Hurtado, L.

UNEP. (2011). Convenio de estocolmo sobre contaminantes organicos persistentes. Obtenido de <http://chm.pops.int/Convention/Th>

Zulay Mármol, G. P. (20 de mayo de 2011). Quitina y Quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones.