

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**EVALUACIÓN DE ENZIMAS LACASA COMO BIORECEPTOR PARA LA  
DETECCIÓN DE UNA BIOTOXINA Y UN CONTAMINANTE EMERGENTE  
EMPLEANDO UN SISTEMA DE RESONANCIA SUPERFICIAL DE PLASMONES**

**Presenta:**

**M.C. Gabriela Elizabeth Quintanilla Villanueva**

*Va. Ba.  
Dra. Melissa Padz*

**Como requisito parcial para obtener el grado de Doctora en Ciencias con  
orientación en Microbiología Aplicada.**

**Febrero, 2021**

**EVALUACIÓN DE ENZIMAS LACASA COMO BIORECEPTOR PARA LA  
DETECCIÓN DE UNA BIOTOXINA Y UN CONTAMINANTE EMERGENTE  
EMPLEANDO UN SISTEMA DE RESONANCIA SUPERFICIAL DE PLASMONES**

Aprobación de la tesis:

---

Dra. Melissa Marlene Rodríguez Delgado

Directora

---

Dr. Edgar Allan Blanco Gámez

Co-Director

---

Dra. Alcione García González  
Comité Tutorial

---

Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu  
Comité Tutorial

---

Dr. Ulrico Javier López Chuken  
Comité Tutorial

---

Dra. María Elena Cantú Cárdenas  
Sub-Directora de Estudios de Posgrado

**EVALUACIÓN DE ENZIMAS LACASA COMO BIORECEPTOR PARA LA  
DETECCIÓN DE UNA BIOTOXINA Y UN CONTAMINANTE EMERGENTE  
EMPLEANDO UN SISTEMA DE RESONANCIA SUPERFICIAL DE PLASMONES**

**Resumen**

**Gabriela Elizabeth Quintanilla Villanueva**

**Fecha de graduación: febrero, 2021**

**Título del proyecto: EVALUACIÓN DE ENZIMAS LACASA COMO BIORECEPTOR  
PARA LA DETECCIÓN DE UNA BIOTOXINA Y UN CONTAMINANTE EMERGENTE  
EMPLEANDO UN SISTEMA DE RESONANCIA SUPERFICIAL DE PLASMONES**

**Número de páginas: 95**

**Candidata para obtener el grado de  
Doctorado en Ciencias con orientación en  
Microbiología Aplicada**

**Área de estudio: Microbiología Aplicada**

**Universidad Autónoma de Nuevo León/ Facultad de Ciencias Químicas**

**Propósito y método de estudio:** Se evaluó el uso de enzimas oxidasas de tipo lacasa como bioreceptores de dos contaminantes emergentes (clorofeno y ácido okadaico), con el fin de utilizarlas en un equipo de Resonancia Superficial de Plasmones. Se realizaron pruebas con distintas cepas bacterianas con el objetivo de encontrar especies con capacidad de producir enzimas oxidasas con potencial para usarse en un biosensor de Resonancia Superficial de Plasmones y se sometieron a distintas condiciones de cultivo. Se encontró que las cepas de *Staphylococcus aureus* (T3C3) y *Bacillus cereus* f24 (T3A1) eran capaces de producir enzimas oxidasas de tipo lacasa, al cultivarse en Medio

Mínimo (extracto de levadura 0.6%, CuSO<sub>4</sub> 100µM, pH 8, 37°C ); siendo la cepa de *S. aureus* la que presentó mejor actividad, y fue elegida para continuar con el estudio.

Se realizó la purificación parcial de las enzimas producidas por la cepa *S. aureus*, obteniendo una actividad enzimática específica de 499±14.05 U/mg, las cuales fueron parcialmente purificadas por cromatografías en columna y se determinó por electroforesis SDS-PAGE que su peso molecular es de alrededor de 35 KDa.

Se llevó a cabo la caracterización parcial de lacasas parcialmente purificadas de *S. aureus*, evaluando su actividad enzimática bajo el efecto de distintos inhibidores comunes de lacasas. Además, por medio de un diseño de experimento factorial, se buscaron las condiciones de pH y temperatura óptimas.

Por otro lado, se comprobó por medio espectrofotometría UV-vis, que la enzima lacasa es capaz de interactuar con el clorofeno y el ácido okadaico, lo cual demuestra su alto potencial como bioreceptor para el diseño del biosensor.

Se inmovilizaron lacasas sobre chips de oro previamente funcionalizados con alcanotioles y se evaluó la reacción catalítica de las enzimas inmovilizadas mediante SPR al interactuar con los analitos de interés. Se obtuvo un porcentaje de inmovilización de las enzimas comerciales del 40.39%. Por medio de microscopía electrónica de barrido y FTIR, se demostró que las lacasas fueron inmovilizadas sobre los chips de oro.

Se comprobó mediante SPR que las lacasas comerciales tienen la capacidad de interactuar con el clorofeno, mostrando una correlación lineal ( $R^2= 0.9956$ ) entre la concentración del analito y la respuesta emitida, lo cual indica que la enzima es adecuada como bio-receptor para utilizarse en la cuantificación del clorofeno, acoplada a un equipo de SPR. Se validó el método y se determinaron los parámetros analíticos de la medición por SPR en muestras reales enriquecidas con clorofeno: % de recuperación del 102.33% ± 0.01, límite de detección de 0.3 mg/L, límite de cuantificación de 1.0 mg/L y un rango de trabajo de 0-10 mg/L. No se encontraron diferencias significativas entre la concentración real y la obtenida experimentalmente.

Se validó la metodología para la determinación de clorofeno utilizando lacasas comerciales como bioreceptor acopladas a un equipo de SPR, comparando los resultados con los obtenidos por la técnica de HPLC. Para ello, se utilizó una muestra de agua de río enriquecida con clorofeno (3 mg/L) y se calcularon los porcentajes de recuperación. No se encontraron diferencias significativas entre ambas técnicas. En cuanto al ácido okadaico, se analizó una curva de calibración de ácido okadaico para validar el método, con un rango de trabajo de 3-10 mg/L y un LOD de 2.91 mg/L. Sin embargo, la correlación ( $R^2=0.9152$ ) no era tan buena como con el clorofeno ( $R^2=0.9956$ ), por lo que se descartó el seguir trabajando con el ácido okadaico, y analizar una muestra enriquecida para validarlo, ya que los resultados no serían tan confiables con ese coeficiente de correlación. Por ello, se concluyó que, en las condiciones experimentales actuales, no es tan confiable como el método para determinar clorofeno, pero es más confiable que la técnica de HPLC, con la que se obtuvo un  $R^2= 0.4795$ .

**Contribuciones y conclusiones:** Se descubrió que *Staphylococcus aureus* es capaz de producir enzimas oxidasas de tipo lacasas al cultivarse en Medio Mínimo con  $\text{CuSO}_4$  como inductor, el cual fue desarrollado al modificar medios de referencias bibliográficas. También se produjeron lacasas de *Bacillus cereus* f24, cultivando la cepa en Medio Mínimo. Las cepas de *S. aureus* fueron parcialmente caracterizadas y se encontró que eran estables en un rango de temperatura de 25°C a 60°C, así como un rango de pH de 3 a 8. Se implementó la metodología para detectar y cuantificar dos contaminantes emergentes (clorofeno y ácido okadaico). La metodología fue validada y se demostró estadísticamente que era adecuada para la detección de clorofeno y que las lacasas son bioreceptores adecuados para utilizarse acopladas a un equipo de Resonancia Superficial de Plasmones para la detección del contaminante emergente clorofeno y tienen potencial de ser utilizados para la determinación de ácido okadaico.

**Firma de la asesora de tesis:** \_\_\_\_\_

## AGRADECIMIENTOS

Mis más profundo agradecimiento, respeto y cariño a quienes han hecho posible que este proyecto se llevara a cabo:

A Dios, por hacer que todas las cosas fueran posibles, porque siempre acomodó las circunstancias y puso en mi camino a las personas correctas. Sin Él, la vida no tendría forma ni propósito.

A mis padres, por ser una gran bendición en mi vida, mis consejeros, compañeros en todos mis sueños y anhelos, así como mi guía y lo que hace que todos mis esfuerzos valgan la pena.

A mi asesora, la Doctora Melissa Marlene Rodríguez Delgado, a quien admiro como ser humano y como investigadora, mi más profundo agradecimiento por guiarme a lo largo de toda esta travesía y por apoyarme y darme ánimo en todo momento. Al Doctor Edgar Allan Blanco, mi co-asesor de tesis, por compartir conmigo sus conocimientos y por todos sus consejos, los cuales me fueron de gran ayuda en las dificultades.

Al Doctor Juan Francisco Villarreal Chiu, de mi comité tutorial, por brindarme sus valiosos consejos, los cuales contribuyeron en gran manera para obtener resultados, así como a la Doctora Alcione García y al Doctor Ulrico López, por formar también parte de mi comité tutorial y compartir sus conocimientos para que este proyecto tomara forma y se tomaran mejores decisiones.

Al Doctor Donato Luna Moreno, del Centro de Investigaciones en Óptica A.C., por todas las facilidades otorgadas durante mi estancia de investigación, así como por compartir sus conocimientos en el área de Resonancia de Plasmón Superficial.

Al Doctor Xristo Zárate, del Laboratorio de Expresión y Purificación de Proteínas así como al Doctor Alberto Gómez, del Laboratorio de Biología Molecular, por facilitarnos amablemente equipo muy necesario para llevar a cabo diversos experimentos.

A la MC Yuridia Torres Martínez, por brindarme siempre su apoyo como amiga y como encargada de laboratorio, así como por todos los buenos recuerdos que me quedan al convivir en el laboratorio con ella y mis compañeros.

A la MC Anaid Silva Salinas por donar cepas para el proyecto y por su apoyo en varios procedimientos.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, así como a la Facultad de Ciencias Químicas, por recibirme, brindarme las instalaciones necesarias y por todo el personal docente que me ha formado en el posgrado, así como por todas las valiosas experiencias que me han hecho crecer profesionalmente y como ser humano.

Al Laboratorio de Fotocatálisis y Electroquímica (LAFEAM), de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL, por facilitarnos el uso de sus instalaciones y equipos.

Al Laboratorio de Biotecnología Ambiental y Bioenergía Aplicada, por siempre apoyarnos con la mejor disposición y nos permitieron el uso de instalaciones y equipos.

Al Centro de Laboratorios Especializados de la Facultad de Ciencias Químicas (CELAES), por brindar las instalaciones y equipos necesarios para la realización de este proyecto.

Al Doctor Pasiano Rivas, por permitirnos el uso equipos de laboratorio.

A mis compañeros y amigos, por su apoyo académico y moral, y por hacer muy amena mi estancia en esta Facultad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada y su apoyo económico, sin los cuales no habría sido posible que realizara mis estudios de Doctorado.

## **DEDICATORIA**

**A mis padres.**



## ÍNDICE

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Clasificación de los contaminantes emergentes .....	3
1.2 Biotoxina: Ácido okadaico.....	6
1.3 Producto de cuidado personal: Clorofeno.....	6
1.4 Metodologías convencionales para la detección de contaminantes emergentes y sus limitaciones .....	7
1.5 Uso de biosensores para la detección de contaminantes emergentes.....	8
1.5.1 Biosensores enzimáticos.....	9
1.5.2 Biosensores con detectores de Resonancia Superficial de Plasmones.....	10
1.5.3 Fenómeno de resonancia: el ángulo crítico y su aplicación en biosensado ..	11
1.5.4 Aspectos técnicos del equipo de Resonancia Superficial de Plasmones (SPR) .....	13
1.6 Bioreceptores basados en enzimas lacasas.....	14
1.6.1 Enzimas lacasas de origen bacteriano.....	15
1.6.2 Estructura de las enzimas lacasas de origen bacteriano .....	17
1.7 Bacterias productoras de enzimas lacasas .....	18
1.7.1 Características generales de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	18
1.7.2 Características de <i>Bacillus cereus</i> .....	20
1.8 Características de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	21
CAPITULO 2. ANTECEDENTES .....	22
2.1 Métodos de detección para el ácido okadaico y el clorofeno.....	22
CAPITULO 3. APORTACION CIENTIFICA.....	24
CAPITULO 4. HIPOTESIS Y OBJETIVOS .....	25
4.1 HIPOTESIS .....	25
4.2 OBJETIVO GENERAL .....	25
4.3 OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	25
CAPITULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	26
5.1 Reactivos: los reactivos requeridos se mencionan en la siguiente lista y se presentan en orden alfabético. ....	26
5.2 Equipos : los equipos que fueron necesarios para realizar los experimentos, se muestran en la siguiente lista en orden alfabético. ....	28
5.3 Material Biológico .....	29

5.4 Muestra real de agua de río.....	29
5.5 Producción de enzimas oxidasas del tipo lacasa a partir de diferentes cepas bacterianas de la región de Nuevo León .....	29
5.5.1 Reactivación de cepas bacterianas de la región de Nuevo León.....	29
5.5.2 Tamizaje de cepas productoras de enzimas oxidasas tipo lacasa.....	31
5.5.3 Cinética de crecimiento y actividad enzimática específica .....	32
5.5.4 Purificación parcial y semi caracterización de las enzimas con actividad lacasa (pH, temperatura e inhibidores) .....	33
5.6 Evaluación cualitativa de la actividad catalítica de las enzimas libres en presencia de los analitos.....	36
5.7 Inmovilización de las enzimas con actividad lacasa en sustratos de oro.....	36
5.7.1 Funcionalización .....	36
5.7.2 Proceso de inmovilización.....	37
5.8 Evaluación de la actividad catalítica de la enzima inmovilizada. ....	38
5.9 Detección de analitos de interés a través de un biosensor enzimático basado en la técnica de SPR .....	39
5.10 Evaluación de los parámetros analíticos de la medición por SPR .....	41
5.10.1 Caracterización de la muestra real de agua de río.....	42
5.11 Validación del protocolo de medición de SPR a través de la técnica estandarizada de HPLC.....	43
5.12 Disposición de los residuos generados .....	43
CAPITULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
6.1. Producción de enzimas oxidasas de tipo lacasa a partir de diferentes cepas de la región de Nuevo León .....	45
6.1.1 Reactivación de cepas bacterianas de la región de Nuevo León.....	45
6.1.2 Tamizaje de cepas productoras de enzimas oxidasas tipo lacasa.....	46
6.1.3 Cinética de crecimiento y actividad enzimática específica .....	49
6.1.4 Purificación parcial y semi caracterización de las enzimas con actividad lacasa (pH, temperatura e inhibidores) .....	52
6.2 Evaluación cualitativa de la actividad catalítica de las enzimas libres en presencia de los analitos.....	62
6.3 Inmovilización de las enzimas con actividad lacasa en sustratos de oro.....	63
6.4 Evaluación de la actividad catalítica de la enzima inmovilizada. ....	67
6.5 Detección de analitos de interés a través de un biosensor enzimático basado en la técnica de SPR .....	67

6.6 Evaluación de los parámetros analíticos de la medición por SPR .....	74
6.7 Caracterización de la muestra real de agua de río .....	76
6.8 Validación del protocolo de medición de SPR a través de la técnica estandarizada de HPLC .....	79
6.8.1 Validación del clorofeno .....	80
6.8.2 Validación del ácido okadaico .....	81
6.9 Comparación estadística entre las técnicas de SPR y HPLC. ....	82
6.10 Análisis de la muestra real de agua por SPR .....	84
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES .....	84
8. PERSPECTIVAS .....	86
9. ANEXOS: COSTOS DEL EQUIPO DE SPR .....	87
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	88

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación de los contaminantes emergentes y algunos ejemplos. ....	4
Tabla 2. Cepas reactivadas para pruebas de producción de enzimas oxidasas .....	30
Tabla 3. Condiciones durante el proceso de aclimatación. ....	31
Tabla 4. Tabla de diseño (aleatorizada) .....	34
Tabla 5. Orden de corridas y condiciones de los experimentos. ....	35
Tabla 6. Concentración de enzimas en las fracciones purificadas con Sílica Gel 60 GF254 de la cepa T3C3. ....	53
Tabla 7. Actividad enzimática específica de las lacasas de T3C3 purificadas por cromatografía en columna con Sefarosa-DEAE.....	53
Tabla 8. Comparación entre la actividad enzimática de lacasas comerciales y lacasas de <i>S. aureus</i> .....	54
Tabla 9. Tabla de purificación de lacasas de <i>S. aureus</i> .....	55
Tabla 10. Resultados del diseño de experimentos para encontrar pH y temperatura óptimos de las lacasas de <i>S. aureus</i> (n=3). ....	57
Tabla 12. Actividad enzimática de lacasas de <i>S. aureus</i> bajo los efectos de distintos inhibidores (n=2). ....	60
Tabla 13. Resultados obtenidos al analizar una muestra de clorofeno 3 mg/L, utilizando enzimas propias y comerciales como bioreceptor.....	73
Tabla 14. Parámetros analíticos (utilizando lacasas comerciales como bioreceptor acopladas a un equipo de SPR).....	74
Tabla 15. Parámetros analíticos obtenidos con el biosensor de SPR para detectar clorofeno, utilizando enzimas propias y comerciales.....	75
Tabla 16. Caracterización fisicoquímica de la muestra de agua de río. ....	76
Tabla 17. Determinación de metales en la muestra de agua de río. ....	77
Tabla 18. Resultados obtenidos al analizar una muestra de clorofeno 3 mg/L, utilizando enzimas propias y comerciales como bioreceptor.....	78
Tabla 19. Concentraciones obtenidas por cada técnica, en mg/L. ....	82
Tabla 20. Resumen de los datos obtenidos. ....	82
Tabla 21. Análisis de varianza de un factor entre las dos metodologías.....	83
Tabla 22. Comparación entre ambas técnicas por medio de la prueba T Student .....	83
Tabla 23. Costo aproximado de la fabricación de un equipo SPR, comprando los componentes por separado.....	87
Tabla 24. Costo de adquirir un equipo SPR completo con accesorios.....	87

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del ácido okadaico. ....	6
Figura 2. Estructura del clorofeno. ....	7
Figura 3. Componentes de un biosensor. ....	9
Figura 4. Componentes de un sistema de SPR: 1) cuando fluye buffer. 2) cuando fluye muestra y existe unión con el receptor.....	11
Figura 5. Selección del ángulo de trabajo .....	12
Figura 6. Desplazamiento del ángulo crítico ( $\theta_1$ ) ante cambios de masa ( $\theta_2$ ) y su efecto sobre la intensidad de la señal .....	13
Figura 7. (a) Esquema del dispositivo de sensado de SPR y (b) Ensamblado de la celda de medición basado en la configuración de Kretschmann (imagen basada en el trabajo de Espinosa-Sánchez) <sup>31</sup> .....	14
Figura 8. Estructura de las lacasas bacterianas (tomado del trabajo de Chandra y colaboradores <sup>48</sup> ).....	18
Figura 9. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en Caldo Nutritivo y Agar Nutritivo.....	19
Figura 10. Estructura del azul de bromofenol[84].....	30
Figura 11 Esquema de funcionalización e inmovilización (adaptación de Casero, (2013) [87]. ....	37
Figura 12. Inmovilización de la enzima en los grupos carboxilo del alcanotiol [88]. ....	38
Figura 13. Proceso de selección del ángulo de trabajo.....	40
Figura 14. Curva de Reconocimiento por reacción de reconocimiento, medición en tiempo real. ....	41
Figura 15. Degradación de azul de bromofenol por cepas reactivadas de <i>Bacillus cereus</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .....	46
Figura 16. Efecto de la actividad enzimática frente al ABTS del sobrenadante obtenido de los cultivos de cepas bacterianas reactivadas. ....	47
Figura 17. Efecto de la actividad enzimática frente al ABTS del sobrenadante obtenido de los cultivos de <i>B. cereus</i> f24 y <i>S. aureus</i> .....	48
Figura 20. (a) Actividad enzimática de las fracciones recuperadas en la purificación con Sílica Gel 60 GF254 y (b) actividad enzimática de la fracción 5 .....	53
Figura 21. Electroforesis SDS-PAGE de las lacasas de <i>S. aureus</i> (último carril de la derecha) después del proceso de semipurificación. ....	56
Figura 22. Gráfica de superficie de respuesta de la estabilidad de enzimas tipo lacasas de <i>S. aureus</i> a diferentes condiciones de pH y temperatura.....	59
Figura 23. Efecto del EDTA, Cl <sup>-</sup> y metanol sobre la actividad de enzimas tipo lacasas de <i>S. aureus</i> .....	62

Figura 24. Análisis UV-vis del tratamiento enzimático en una solución de 100 ppm de (a) clorofeno y (b) ácido okadaico .....	63
Figura 25. Imagen SEM del corte transversal de un chip y análisis EDS mediante mapeo elemental de superficie en (a) chip sin tratar, (b) chip funcionalizado con alcanotioles y (c) chip posterior al proceso de inmovilización. ....	65
Figura 26 Análisis FT-IR de un chip de oro sometido al proceso de inmovilización .....	66
Figura 27. (a) Montaje del chip en la celda biosensor y (b) montaje de la celda de sensado en el equipo. ....	68
Figura 28. Desplazamiento del ángulo crítico conforme se van acumulando compuestos sobre la superficie del chip de oro.....	69
Figura 29. Proceso de inmovilización monitoreado en tiempo real .....	70
Figura 30. Sensogramas de la detección de clorofeno a diferentes concentraciones con su curva de calibración.....	71
Figura 31. Sensogramas de la detección del ácido okadaico a diferentes concentraciones con su curva de calibración.....	72
Figura 32. Curva de calibrado del clorofeno empleando lacasa comercial. ....	73
Figura 33. Efectos de la matriz de la muestra. ....	78
Figura 34. Curva de calibración del clorofeno por HPLC. ....	81
Figura 35. Curva de calibración del ácido okadaico por HPLC .....	82

## **SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS EMPLEADAS**

ABTS: ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) clorhidrato de carbodiimida

EPA: Agencia de Protección Ambiental

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

FTIR: Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier

g: gramos

GC-MS: Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas

h: horas

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia

HPLC-MS: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia Acoplada a Espectrometría de Masas

L: litros

LC-MS: Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrometría de Masas

MHDA: ácido mercaptohexadecanoico

MUD: 11-mercapto-1-undecanol

M: molar

min: minutos

mL: mililitros

mM: milimolar

$\mu$ L: microlitros

$\mu$ M: micromolar

ng: nanogramos

NHS: N-hidroxisuccinimida

mg: miligramos

R: coeficiente de correlación

rpm: revoluciones por minuto

s: segundos

SD: desviación estándar

SDS-PAGE: acrónimo de *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SPR: Resonancia Superficial de Plasmones

UV-vis: UV visible



## **CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN**

El incremento de la población, aunado al uso desmedido de productos químicos que son de consumo diario, ha derivado en la diversificación de contaminantes presentes en los sistemas acuáticos a nivel global. En este contexto, surge una nueva clasificación de compuestos nocivos para el medio ambiente y por ende para población en general, llamados “Contaminantes Emergentes”. Dentro de este grupo se involucran sustancias contenidas en productos de consumo diario, tales como artículos de cuidado personal, de limpieza, fármacos, biotoxinas, pesticidas y plastificantes(Naidu, 2016).

Los contaminantes emergentes son compuestos químicos que, tradicionalmente no eran considerados como contaminantes. Sin embargo, debido a su persistencia y bioacumulación en el ambiente, así como sus efectos adversos sobre la salud humana, han provocado que se consideren como agentes nocivos (Gavrilescu, Demnerová, Aamand, Agathos, & Fava, 2015). En general, estos contaminantes han sido relacionados con alteraciones en el metabolismo, predisposición a padecer ciertos tipos de cáncer; así como desordenes reproductivos y enfermedades crónicas(Vandermeersch et al., 2015). Además, a través de ensayos en ratas y conejos se les ha relacionado con una disminución en la fecundidad y daño en los riñones(ECHA, 2017). Por otro lado, la falta de herramientas analíticas para lograr la detección de algunos de estos compuestos ha limitado el conocimiento de su presencia en distintos sistemas y matrices(Noguera-Oviedo & Aga, 2016).

### **1.1 Clasificación de los contaminantes emergentes**

Actualmente existe una gran diversidad de contaminantes emergentes; por ello, distintos organismos internacionales tales como la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO)(Mateo-Sagasta, Marjani, Turrall, & Burke, 2017) y la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US-EPA)(EPA, 2016) han

elaborado listas de los contaminantes considerados de interés prioritario de acuerdo a su toxicidad y acumulación en el ambiente. En general estos compuestos han sido clasificados en las siguientes categorías: pesticidas, productos farmacéuticos, productos de cuidado personal, elementos tóxicos, disruptores endócrinos, retardantes de flama bromados, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) y derivados, microplásticos y biotoxinas como las toxinas marinas (ver Tabla 1) (Gavrilescu et al., 2015; Naidu, 2016; Vandermeersch et al., 2015).

Tabla 1 Clasificación de los contaminantes emergentes y algunos ejemplos.

Contaminante emergente	Ejemplos
Pesticidas	3-Hidroxycarbofuran, acefato, ácido acetocloreтанosulfónico (ESA), ácido acetocloroxanílico (OA), Captan, Cletodim(Gavrilescu et al., 2015).
Productos farmacéuticos	Antibióticos: trimetoprima, sulfametoxazol, ciprofloxacino(Gavrilescu et al., 2015).
	Dexametasona, naproxeno, ibuprofeno, ácido salicílico, diclofenaco, carbamazepina, bezafibrato, propanolol (Gavrilescu et al., 2015).
	Medios de contraste para rayos X: iopromida, iomeprol, ioxehol, iopamidol (Gavrilescu et al., 2015).
Productos de cuidado personal	Productos de cuidado personal: triclosan (Gavrilescu et al., 2015), clorofeno como conservador (Yamarik, 2004).
Elementos y especies elementales tóxicos	Arsénico, plomo, mercurio y cadmio (Vandermeersch et al., 2015).
Disruptores endócrinos	Bisfenoles, alquilfenoles, estrógenos y compuestos perfluorinados (Vandermeersch et al., 2015).
Retardantes de flama bromados	Hexabromociclododecanos, tetrabromobisfenol A, Tetra-, Penta-, Hexa- y Hepta-PBDEs (éteres de difenilpolibromados) y hexabromobifenil (Vandermeersch et al., 2015).
Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) y derivados	Benzo[a]pireno, benz[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[ghi]perileno, criseno, dibenz[a,h]antraceno e indeno[1,2,3-cd]pireno (Vandermeersch et al., 2015).
Microplásticos	Abrasivos industriales, exfoliantes y cosméticos o precursores (pellets de resinas) de otros productos (Vandermeersch et al., 2015).
Toxinas marinas	Palitoxinas, azaspirácidos (AZAs), tetrodotoxina (TTX),

(Biotoxinas)	Ácido domoico, Saxitoxinas como el ácido okadaico (OA) (Vandermeersch et al., 2015).
--------------	--

En particular, existe un creciente interés en la detección de toxinas marinas y productos de cuidado personal, debido a su amplia disseminación y daños a la salud(DOH, 2016).

Las toxinas marinas o biotoxinas se originan en las microalgas marinas (fitoplancton o microalgas bénticas). Las biotoxinas, al ser consumidas, pueden acumularse en los tejidos de peces, mariscos y otros organismos marinos(Vandermeersch et al., 2015). Éstas toxinas son termoestables (DOH, 2016), por lo que al cocinar los alimentos no son destruidas, causando daños a la salud de sus consumidores. No se ha determinado con claridad la razón por la cual algunas especies de algas producen toxinas, pero se cree que son utilizadas como un mecanismo de lucha por espacios, combatir la predación o como defensa contra un crecimiento desmesurado de otros organismos (FAO, 2005). Las biotoxinas más importantes son las toxinas de mariscos y las ciguatoxinas. Las ciguatoxinas son compuestos poliéter lipofílicos que se acumulan en peces tropicales y subtropicales y causan la intoxicación ciguatera por consumo de peces contaminados (Vandermeersch et al., 2015).

Por otro lado, los productos de cuidado personal agrupan un sin número de artículos de consumo diario y extensivo, tales como desinfectantes, fragancias, dentífricos, protectores solares, cremas, etc(Caliman & Gavrilesu, 2009). En general, todos estos compuestos han sido relacionados con alteración del metabolismo y mal desarrollo de fetos, cáncer de mama, ovario y próstata; así como desordenes reproductivos caracterizados por una disminución en el conteo espermático. Mientras que en la fauna silvestre se ha observado la feminización de machos, masculinización de hembras y disrupción de la fertilidad en aves, peces, reptiles y crustáceos(Caliman & Gavrilesu, 2009). Los productos de cuidado personal suelen llegar al medio ambiente a través de los efluentes de aguas residuales, los cuales no son eliminados con los tratamientos convencionales de las Plantas Tratadoras de Aguas(Gavrilesu et al., 2015).

## 1.2 Biotoxina: Ácido okadaico

El ácido okadaico es una de las toxinas marinas diarreicas con mayor relevancia a nivel global debido a los efectos que tiene sobre la salud animal y humana. En el ser humano, la intoxicación por ácido okadaico provoca envenenamiento diarreico por consumo de mariscos, cuyos síntomas incluyen diarrea severa, en ocasiones con náusea, calambres abdominales y escalofríos (DOH, 2016). Aunque fue aislada por primera vez de la esponja de mar *Halichondria okadai*, los principales productores son dinoflagelados marinos del género *Dinophysis* y *Prorocentrum* (Prego-Faraldo, Valdíglesias, Méndez, & Eirín-López, 2013). El ácido okadaico es un metabolito secundario tipo poliéter, el cual es lipofílico, por lo que se acumula en tejidos de organismos filtradores y así se introduce a la cadena alimenticia (Prego-Faraldo et al., 2013). El ácido okadaico se ha encontrado en alimentos como mariscos (Vandermeersch et al., 2015) y en agua de mar en concentraciones que van de 38 ng/mL hasta 45 ng/mL (Leonardo et al., 2017). El límite máximo permitido es de 160 ng/mL según normas europeas (ECR, 2004), 0.2 ng/mg según normas mexicanas (SSA, 2004) .

Por otro lado, el ácido okadaico se ha relacionado con la aparición de tumores, además de ser un inhibidor específico de la proteína fosfatasa (Fujiki, Suganuma, Watanabe, & Sueoka, 2015). En la Figura 1 se puede observar la estructura del ácido okadaico (Twiner et al., 2016).

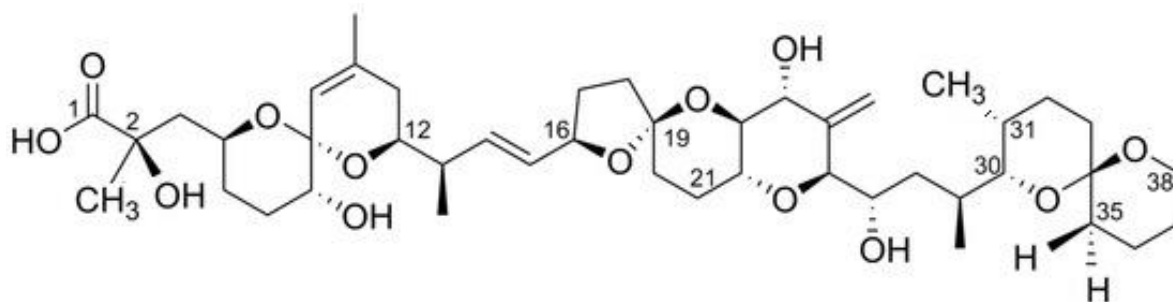


Figura 1. Estructura del ácido okadaico.

## 1.3 Producto de cuidado personal: Clorofeno

El clorofeno (2-bencil-4-clorofenol) es un compuesto fenólico halogenado, que funciona como biocida, desinfectante bactericida y fungicida, (ECHA, 2017) y como conservador

en cosméticos (Yamarik, 2004). Este compuesto es considerado de suma importancia dentro de la categoría de contaminantes emergentes ya que puede encontrarse en agua (Rayaroth, Nejumal, Subha, Usha, & Charuvila, 2015) y suelo (Bolobajev et al., 2015). Se le ha relacionado con efectos mutagénicos en mamíferos (Yamarik, 2004), además de otros efectos sobre el medio ambiente y la salud humana. Se sospecha que causa cáncer y afectaciones a la fertilidad (Yamarik, 2004). Si es inhalado, causa irritación en la piel y ojos y causa daño renal a través de una exposición prolongada (ECHA, 2017). En la Figura 2 se puede observar la estructura del clorofeno (ECHA, 2017). La concentración máxima permitida en cosméticos es de 0.2% en Europa (ECHA, 2017). En Estados Unidos, la concentración en agua potable no debe exceder los 0.02 ppm (ATSDR, 2015).

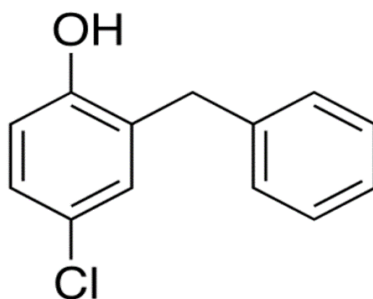


Figura 2. Estructura del clorofeno.

#### **1.4 Metodologías convencionales para la detección de contaminantes emergentes y sus limitaciones**

Para afrontar los retos que conlleva la regulación de los contaminantes emergentes, es necesario llevar a cabo distintas estrategias, dentro de las que destacan (Gavrilescu et al., 2015):

- Identificación y preparación de listas de contaminantes emergentes que sean comprensibles.
- Caracterización de las interacciones y rutas fisicoquímicas de tales contaminantes.
- Evaluación del funcionamiento del sistema agua/suelo en la presencia del contaminante

- Establecer planes de acción para agentes infecciosos emergentes y reemergentes.

Como se puede inferir, la detección y cuantificación de estos contaminantes es indispensable para poder monitorearlos, seguir su comportamiento, persistencia en el ambiente y saber si los planes de acción para controlar sus niveles de concentración en el medio ambiente han sido efectivos. Por ello, es necesario contar con metodologías y técnicas instrumentales que puedan detectarlos. Actualmente, las técnicas de detección basadas en cromatografía y espectrometría (LC-MS y GC-MS) son capaces de identificar la presencia de estos compuestos con gran precisión y exactitud, en concentraciones que van desde los ng/L a los mg/L (Pintado-Herrera, González-Mazo, & Lara-Martín, 2016). Sin embargo, son métodos costosos que requieren de personal altamente capacitado, rigurosos pre-tratamientos de muestras (lo cual limita el número de muestras a analizar), aunado a que no es posible realizar mediciones en campo debido a las condiciones específicas bajo las cuales estos equipos deben ser empleados (Pintado-Herrera et al., 2016).

### **1.5 Uso de biosensores para la detección de contaminantes emergentes**

Como se mencionó previamente, las metodologías convencionales para la cuantificación de contaminantes emergentes poseen varias limitaciones para la detección rápida y en tiempo real. En este contexto surgen los biosensores, instrumentos analíticos capaces de detectar compuestos de interés mediante el uso de biomoléculas. De acuerdo con la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), un biosensor se define como un dispositivo que usa reacciones bioquímicas específicas mediadas por enzimas, anticuerpos, organelos, tejidos o células para detectar compuestos químicos, usualmente por señales eléctricas, térmicas u ópticas (Ali, Najeeb, Ali, Aslam, & Raza, 2017).

Aunque existen muchos tipos de materiales y detectores que se pueden emplear, los biosensores constan básicamente de los siguientes componentes (Torres-Ramírez & Méndez-Albores, 2014) (1) elemento de reconocimiento del analito, (2) un transductor y (3) un detector, los cuales pueden observarse en la Figura 3. Existen 2 mecanismos principales de reconocimiento: catalítico (células, enzimas, tejidos) y de afinidad (anticuerpos, proteínas, receptores, ácidos nucleicos) (Torres-Ramírez & Méndez-

Albores, 2014). El elemento de reconocimiento (bioreceptor) será unido al transductor por medio de grupos funcionales, tales como ácido mercaptoundecanoico (MUA)(Ahmed et al., 2016) o trietoxisilano(M. M. Rodríguez-Delgado et al., 2015); los cuales servirán como puente de unión entre el transductor y el bioreceptor. Los transductores son elementos que convierten una respuesta generada de un evento bioquímico (a través del elemento de reconocimiento) en una señal cuantificable, la cual puede ser de diversa naturaleza: óptica, acústica, electroquímica, piezoeléctrica, magnética, calorimétrica o mecánica. Finalmente, los elementos de detección, son aquellos que captan la señal generada por el transductor. Estos elementos se eligen de acuerdo con el tipo de transductor, por ejemplo; si se genera un cambio de corriente eléctrica, el detector deberá ser un electrodo, si fuera una señal óptica (como un cambio en la intensidad de la luz) entonces el detector sería un fotodiodo, etc.

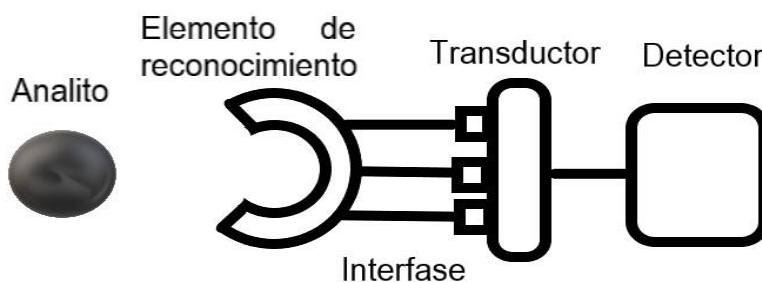


Figura 3. Componentes de un biosensor.

### 1.5.1 Biosensores enzimáticos

En particular, las enzimas han sido ampliamente utilizadas como bioreceptores en el diseño de biosensores, principalmente por su alto nivel de estabilidad y fácil monitoreo de sus propiedades catalíticas, en comparación con otras biomoléculas(M. M. Rodríguez-Delgado et al., 2015). En este sentido, las enzimas oxidasas, tales como las tirosinasas, peroxidasas y lacasas, han sido recurrentes, debido a su capacidad catalítica para reaccionar con una amplia gama de compuestos de interés, entre ellos algunos contaminantes emergentes(M. M. Rodríguez-Delgado et al., 2015). Sin embargo, a pesar de su uso extensivo, las enzimas oxidasas han sido limitadas a su uso como bioreceptores en biosensores

electroquímicos(M. M. Rodríguez-Delgado et al., 2015), en los cuales se mide su capacidad para transferir electrones durante la catálisis. Sin embargo, los cambios conformacionales que estas enzimas presentan durante la reacción catalítica/interacción con contaminantes emergentes pueden ser empleados para su uso en biosensores ópticos, donde dichos cambios conformacionales son medidos a través de cambios en el índice de refracción, tal como se ha realizado previamente a través de la técnica óptica de resonancia superficial de plasmones(Colas et al., 2016).

### **1.5.2 Biosensores con detectores de Resonancia Superficial de Plasmones**

El campo de la plasmónica estudia la interacción de la radiación electromagnética con los metales. Cuando esta radiación es acoplada con los electrones libres de un metal se genera un fenómeno conocido como plasmones de resonancia. La resonancia superficial de plasmones (SPR) es la oscilación de una densidad de carga que se genera en la interfaz de 2 medios, generalmente un metal noble (normalmente oro o plata) y un dieléctrico (principalmente vidrio)(Cao, Sun, & Grattan, 2014). Como consecuencia a la generación del plasmón, la superficie del metal será una zona extremadamente sensible a cambios de masa, los cuales se verán reflejados como cambios en el índice de refracción(Estevez, Otte, Sepulveda, & Lechuga, 2014) (Ver Figura 4). Cuando la luz pasa de un medio transparente a otro se produce un cambio en su dirección debido a la distinta velocidad de propagación que tiene la luz en los diferentes medios materiales. A este fenómeno se le llama refracción(Educaplus, 2018).

El índice de refracción es la diferencia entre el ángulo de incidencia de un haz de luz y el ángulo de salida (Educaplus, 2018). Estos cambios de masa pueden ser generados por la unión o reconocimiento de biomoléculas que ocurren sobre la superficie de oro, los cuales pueden ser monitoreados en tiempo real (Cao et al., 2014). Además de las mediciones en tiempo real, el uso de SPR como transductor posee otras ventajas, como una ultra-sensibilidad a los cambios en el índice de refracción, rápida respuesta y no son necesarios marcadores (Cao et al., 2014).



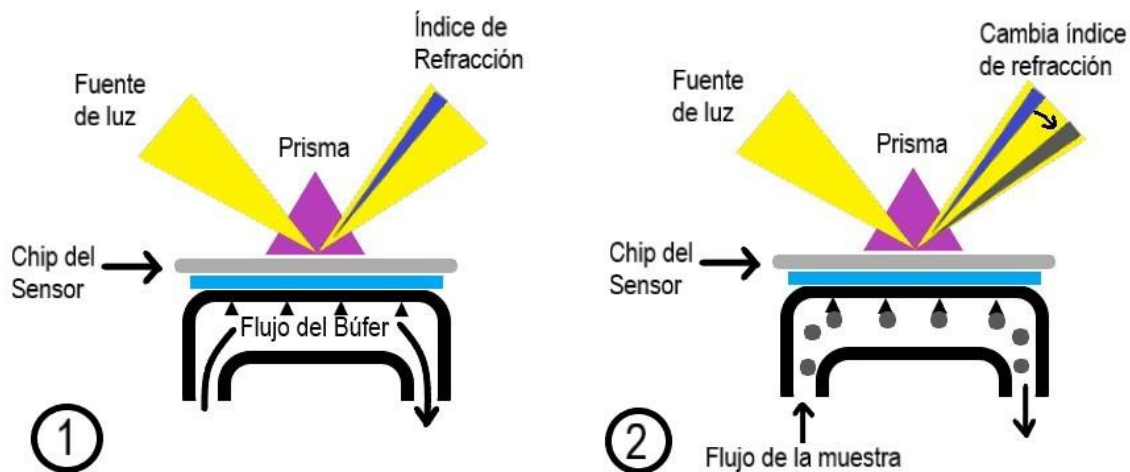


Figura 4. Componentes de un sistema de SPR: 1) cuando fluye buffer. 2) cuando fluye muestra y existe unión con el receptor.

### 1.5.3 Fenómeno de resonancia: el ángulo crítico y su aplicación en biosensado

Como se mencionó anteriormente, al presentarse el fenómeno de resonancia superficial de plasmones, ocurre una oscilación de carga en la interfase de los dos medios (metal noble/dieléctrico)(Cao et al., 2014), provocando que el haz de luz incidente se mantenga confinado en la interfase de los dos materiales. Por lo cual, el fotodetector recibirá una baja intensidad de luz, provocando que la intensidad en la señal percibida muestre su punto más bajo. El ángulo de incidencia del haz de luz con el cual ocurre este fenómeno, es llamado ángulo crítico (Figura 5). El ángulo crítico puede ser localizado de forma experimental al realizar un barrido angular del material con el que se está trabajando (en este caso el chip de oro). Sin embargo, el ángulo al que se realizan las mediciones de sensado (ángulo fijo) es seleccionado en el punto medio de la pendiente que se forma al acercarse al ángulo crítico, ya que en ese punto es donde se logra una mayor sensibilidad a cambios de intensidad de luz originados de la interacción del receptor con el analito.

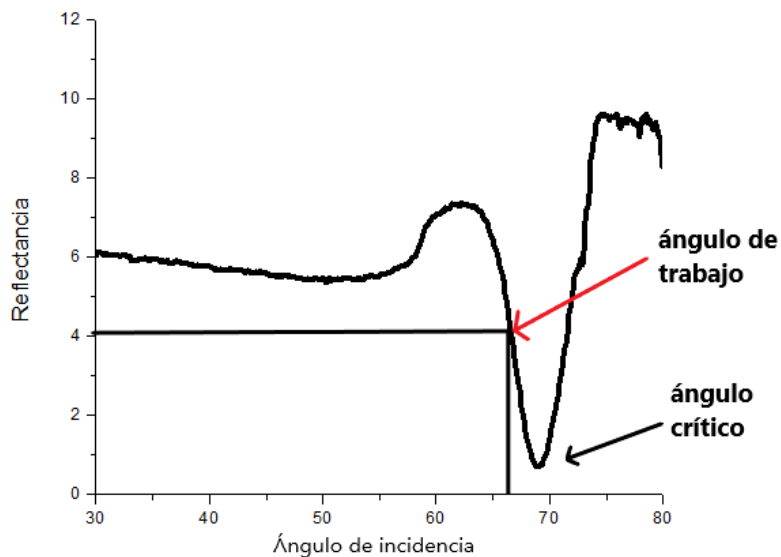


Figura 5. Selección del ángulo de trabajo

Una vez que se ha seleccionado el ángulo fijo al cual se va a trabajar la medición, la intensidad de la señal se puede monitorear a lo largo del tiempo. Lo anterior debido a que, cualquier cambio de masa sucedido sobre la superficie del material (unión de analito al receptor), va a desplazar al ángulo crítico y se podrá observar como un cambio en la intensidad de la señal, tal como se observa en la Figura 6.

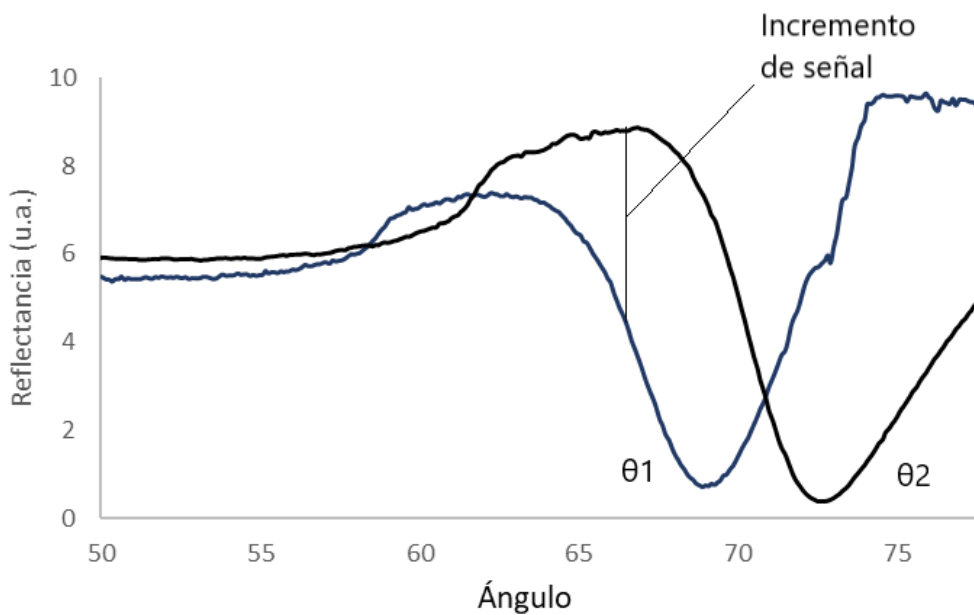


Figura 6. Desplazamiento del ángulo crítico ( $\theta_1$ ) ante cambios de masa ( $\theta_2$ ) y su efecto sobre la intensidad de la señal

#### **1.5.4 Aspectos técnicos del equipo de Resonancia Superficial de Plasmones (SPR)**

El equipo utilizado para este trabajo es el mismo descrito por Luna-Moreno y colaboradores(Luna-Moreno et al., 2019) (ver Figura 7a). El dispositivo consta de dos platinas rotatorias, con una

resolución de  $0.00025^\circ$ , las cuales se mueven de forma sincronizada con un sistema  $\theta-2\theta$ , es decir una platina se mueve con el doble de velocidad y alcanza el doble de rotación que la otra. Sobre la platina inferior se encuentra el fotodetector, integrado por un fotodiodo de Silicio (modelo S1 226-8BK), con un circuito amplificador de señal (marca Hamamatsu), el cual captura la intensidad de luz emitida por un láser polarizado en “p” He-Ne a 632.8 nm. Este tipo de laser se considera de baja potencia, e incluso tiene aplicaciones terapéuticas en áreas como la odontología(Belío-Reyes, Bojórquez-Steffani, Bucio, Jiménez, & Peraza-Garay, 2017; Oltra-Armon, España-Tost, Berini-Aytés, & Gay-Escoda, 2004), lo cual representa una ventaja, ya que podemos disminuir el riesgo de que afecte al bioreceptor y al analito. La intensidad de la luz detectada posteriormente es transformada en voltaje, con un rango de 0-12 V a través de un dispositivo DAQ.

Por otro lado, en la platina superior se adapta la montura de la celda de medición, la cual consta de una configuración tipo sándwich conformada por un prisma de vidrio BK7 acoplado a un chip de oro (con moléculas inmovilizadas), el cual a su vez está unido a un canal fluídico de teflón por el cual pasan las muestras (ver Figura 7b).

El chip de oro, fue preparado en el Centro de Investigaciones en Óptica A.C., por medio de la técnica de evaporación con cañón de electrones, en la cual, en una campana de vacío, se evapora el metal y se deposita sobre el material de vidrio, formando una capa muy delgada, de aproximadamente 50 nm(Espinosa-Sánchez, 2018). Para unir el chip

de oro al prisma BK7, se utilizó aceite de inmersión con un índice de refracción muy similar al del prisma (1.51).

En este trabajo se utilizó la configuración de Kretschmann, en la cual el vidrio acopla luz con polarización “p” (es decir, el vector de campo eléctrico es paralelo al plano incidente) en la película metálica y refleja la luz en un dispositivo detector de intensidad de luz, como un fotodiodo (Espinosa-Sánchez, 2018).

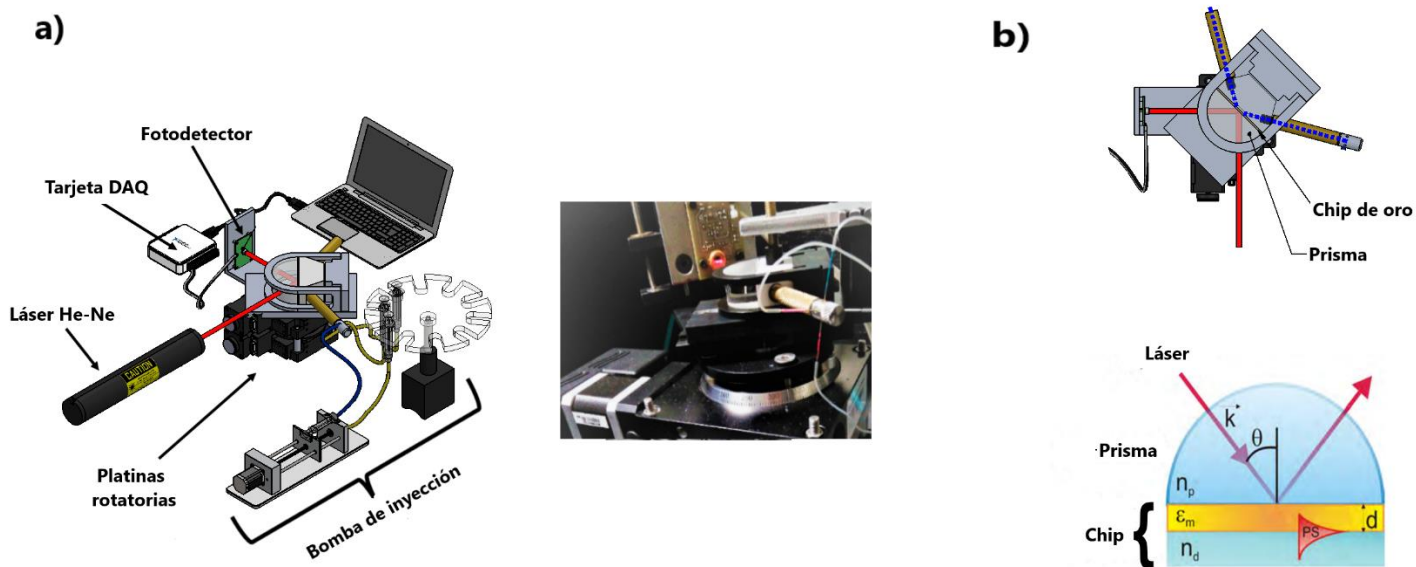


Figura 7. (a) Esquema del dispositivo de sensado de SPR y (b) Ensamblado de la celda de medición basado en la configuración de Kretschmann (imagen basada en el trabajo de Espinosa-Sánchez)<sup>31</sup>

## 1.6 Bioreceptores basados en enzimas lacasas

Las enzimas oxidasas pertenecen a la clasificación de enzimas óxido-reductasas y participan en reacciones de óxido-reducción valiéndose de la incorporación de diferentes cofactores, como iones metálicos, y una gran variedad de sustratos como donadores de electrones (Martínez et al., 2017). Estudios previos han reportado la capacidad de

distintas especies de vegetales, hongos y bacterias capaces de producir estas enzimas (Martínez et al., 2017; M. M. Rodríguez-Delgado et al., 2015; A. Verma, 2016). Entre las enzimas oxidasas más estudiadas se encuentran las lacasas, peroxidasas y tirosinasas (Martínez et al., 2017). Las lacasas son enzimas con cuatro átomos de cobre (M. M. Rodríguez-Delgado et al., 2015), las cuales han demostrado que pueden actuar sobre una gran variedad de sustratos con grupos fenólicos, diaminas y anillos aromáticos en sus estructuras químicas, como ligninas (Ab-El-Monssef, Hassan, & Ramadan, 2016), ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) y guaiacol (Kumar, Kaur, Jain, & Kumar, 2016), entre otros. Por otro lado, las peroxidasas actúan sobre una gran variedad de sustratos, incluyendo compuestos aromáticos de alto potencial redox, como colorantes sintéticos o unidades de lignina fenólicas y no fenólicas (Santos, Mendes, Brissos, & Martins, 2014). Las tirosinasas son enzimas que contienen cobre de tipo 3 que se ha encontrado ampliamente distribuida en microorganismos, plantas y animales. Cataliza la hidroxilación de monofenoles a o-difenoles y la oxidación de difenoles a o-quinonas seguida de una serie de etapas no enzimáticas que dan como resultado la formación de melanina. Esta enzima participa en muchos procesos biológicos en procariontes y eucariontes, tales como la formación de melanina en mamíferos, en el sistema inmune de las plantas, procesos reproductivos de hongos y mecanismos de protección en bacterias (Valipour & Arian, 2016).

Por las características antes mencionadas, el uso de enzimas oxidasas ha sido reportado ampliamente en la detección de fluoroglucinol, crocina, ácido ascórbico, ácido kójico y el colorante azafrán (Surwase, Patil, Srinivas, & Jadhav, 2016), así como urea y glucosa (R. Verma & Gupta, 2014), ácido úrico (Kant, Tabassum, & Gupta, 2016; Miyazaki, Shimizu, Mejía-Salazar, Oliveira, & Ferreira, 2017), colesterol (Semwal & Gupta, 2018), trombina humana (Y. Li, Hye, & Corn, 2007) y *Salmonella* en leche en polvo (Farka, Juřík, Pastucha, & Skládal, 2016), entre otros analitos.

### **1.6.1 Enzimas lacasas de origen bacteriano**

Aunque la producción de oxidasas ha sido ampliamente estudiada en hongos (Ab-El-Monssef et al., 2016; Deska & Kończak, 2019; Kumar et al., 2016; Moshtaghioun et al., 2017; Pardo et al., 2018; Piontek, Antorini, & Choinowski, 2002; M. M. Rodríguez-Delgado et al., 2015; Surwase et al., 2016), recientes estudios han explorado el potencial de distintas bacterias para producir oxidasas (de Gonzalo, Colpa, Habib, & Fraaije, 2016). Existen reportes de especies bacterianas que producen enzimas oxidasas tipo lacasas, peroxidasas (de Gonzalo et al., 2016) y ligninasas (Valipour & Arikan, 2016); por ejemplo Chauhan y colaboradores (Chauhan & Jha, 2018), trabajaron con *Pseudomonas sp.*, obteniendo lacasas termoestables resistentes a temperaturas de 80°C y un pH de 9, obteniendo una actividad específica de  $1089.70 \pm 16.8 \text{ U mg}^{-1}$ . Por otra parte, Verma et al. utilizaron una cepa silvestre de *Pseudomonas putida* (A. Verma, 2016), para producir enzimas extracelulares al cultivarse en medio M162 suplementado con Triptona-Extracto de levadura a 28°C, durante 24-48 h; el resultado obtenido fue una actividad enzimática de  $25.12 \text{ U L}^{-1}$ , obteniendo la mayor producción a pH 8. En dicho estudio, se realizaron pruebas preliminares de actividad de oxidasas usando como sustrato ABTS. Así mismo, el uso de especies de *Bacillus sp.* ha sido reportado en la producción de oxidasas. Sondhi et al. (Sondhi et al., 2015), obtuvieron lacasas extracelulares en cultivos de *Bacillus tequilensis*; estas cepas fueron aisladas en medio M162, el cual contenía extracto de levadura al 0.2 %, triptona al 0.2% y 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$ , presentando la mayor actividad enzimática a las 96 h de incubación. En otro estudio, Valipour et al. (Valipour & Arikan, 2016) produjeron tirosinasas, utilizando a *Bacillus megaterium*, a 36°C, pH 7.0, con un tiempo de incubación de 16 h, en un medio que contenía 0.4  $\text{mg mL}^{-1}$  de L-tirosina, 0.05% de extracto de levadura, 0.423% de triptona, 3.4% de NaCl y  $\text{CuSO}_4$  148.4  $\mu\text{M}$ . Mientras tanto, Allos y Hussein (Allos & Hussein, 2015) produjeron lacasas con cultivos de *Bacillus cereus*, utilizando un medio mínimo salino (pH 7), con dextrosa 0.5%, y 0.5% de extracto de levadura, incubado a 35°C, a 200 rpm por 24h. Asimismo, se ha reportado la producción de peroxidasas en *Pseudomonas putida* y *Bacillus subtilis*, cuyos genes fueron expresados en *E. coli* de acuerdo al estudio realizado por Santos y colaboradores (Santos et al., 2014).

### **1.6.2 Estructura de las enzimas lacasas de origen bacteriano**

Las lacasas bacterianas son isoenzimas con un amplio rango de especificidad. Se clasifican como enzimas EC 1.10.3.2, lo cual significa que son oxidoreductasas que actúan sobre polifenoles y sustancias relacionadas como donadores de electrones, además de usar el oxígeno molecular como aceptor de electrones (Moss, 1992). Su estructura suele ser tetramérica, suele poseer 4 átomos de Cu: uno de Tipo I, uno de Tipo II y un par de Tipo III. La oxidación del sustrato y la eficiencia de la enzima se deben principalmente al potencial redox del cobre tipo I (a mayor potencial redox, mayor eficiencia), además de su coloración azul. El sitio con cobre Tipo I es visible a 610 nm por espectrofotometría (Chandra & Chowdhary, 2015). El sitio con cobre Tipo 2 posee 4 residuos de histidina, además presenta paramagnetismo y no posee coloración, además de que no se detecta por espectrofotometría UV-vis (Chandra & Chowdhary, 2015). El cobre Tipo III posee 6 residuos de histidina y junto con el cobre Tipo II, es el sitio donde ocurre la reducción del oxígeno a agua. En la Figura 8 se puede observar la estructura de la enzima, así como sus sitios activos, la cual fue reportada por Chandra y colaboradores (Chandra & Chowdhary, 2015).

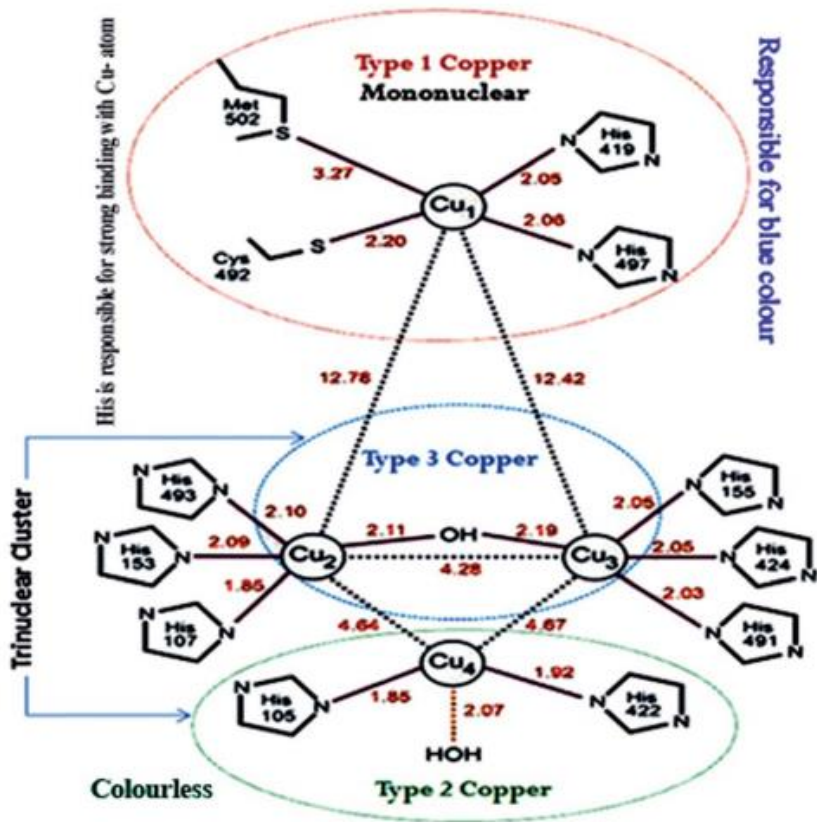


Figura 8. Estructura de las lacasas bacterianas (tomado del trabajo de Chandra y colaboradores<sup>48</sup>)

## 1.7 Bacterias productoras de enzimas lacasas

### 1.7.1 Características generales de *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria que pertenece a la familia *Pseudomonaceae*. Es un bacilo recto o ligeramente curvado Gram negativo, con un tamaño de 2–4 µm de longitud x 0.5-1 µm de diámetro, y móvil gracias a la presencia de un flagelo polar. Es aerobio, pero también tiene la capacidad de crecer en ambientes anaerobios utilizando nitratos, es catalasa y oxidasa positivo (INSHT, 2016), su metabolismo es respiratorio oxidativo y no fermenta azúcares (Guzmán-Sandoval, 2016). Produce una variedad de pigmentos, como la piocianina (un pigmento azul verdoso, que se puede observar en la



Figura 9), la pioverdina (pigmento fluorescente de color verde amarillento) y la piorrubina (de color rojo). Sus reservorios se pueden encontrar en una amplia variedad de sitios, como en agua de ríos, lagos, depósitos, duchas, bañeras, piscinas y piscinas de hidromasaje, así como en los suelos húmedos, en los vegetales y en los materiales húmedos (alimentos, fómites); también puede formar parte de la flora microbiana normal saprófita de las zonas húmedas de la piel (axilas, conducto auditivo, región perineal y mucosas) (Guzmán-Sandoval, 2016). Sus hospedadores son los humanos y animales. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, pero puede tolerar temperaturas de hasta 45°C-50°C y sobrevivir hasta 70 días en agua destilada(INSHT, 2016).

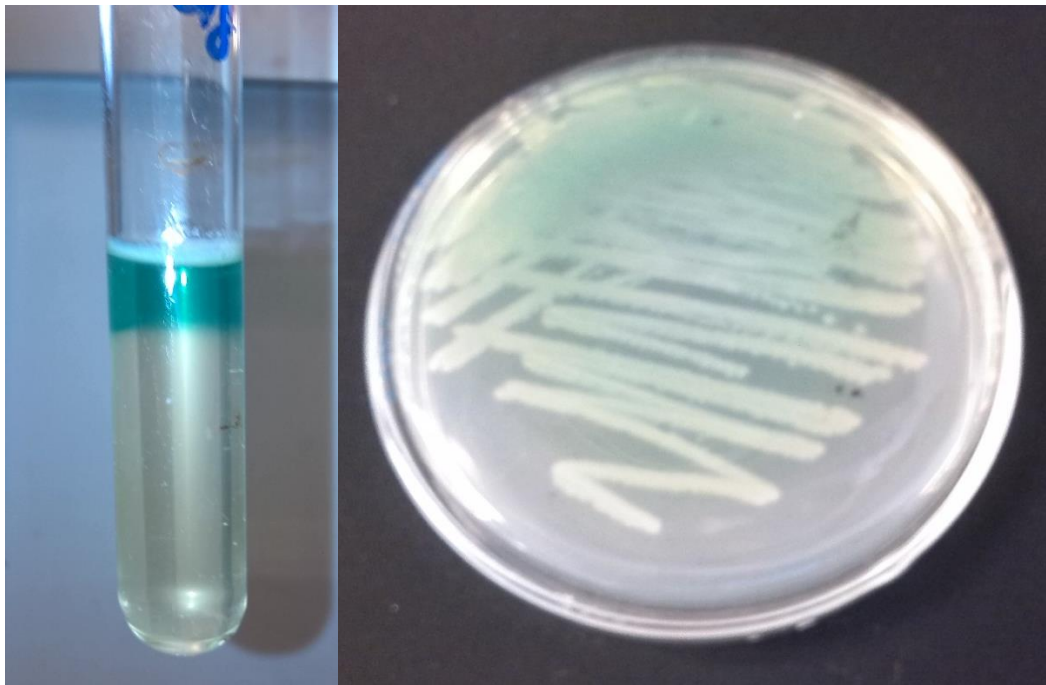


Figura 9. *Pseudomonas aeruginosa* en Caldo Nutritivo y Agar Nutritivo.

Esta bacteria es un patógeno oportunista que no suele infectar a personas sanas, pero puede transmitirse por contacto de la piel lesionada o reblandecida y de las mucosas con el agua o con los objetos contaminados. En el ámbito médico, puede transmitirse a los pacientes por medio del instrumental quirúrgico, los respiradores, los catéteres o las

manos del personal sanitario contaminadas, entre otros. Produce varias toxinas, como la Endotoxina, Endotoxina A, Exoenzima S, Exoenzima T y Exoenzima U (INSHT, 2016).

Esta especie tiene la capacidad de producir glicolípidos que contienen ramnolípidos que actúan como biosurfactantes y pueden ser utilizados en la industria (Maier & Soberon-Chavez, 2000). También se ha reportado que algunas cepas tienen la capacidad de producir lipasas, lacasas, biopolímeros, biodiesel, fármacos enantiopuros, agroquímicos y compuestos saborizantes (Borkar, Bodade, Rao, & Khobragade, 2009), así como ligninasas (de Gonzalo et al., 2016), los cuales pueden tener aplicación industrial (de Gonzalo et al., 2016).

### **1.7.2 Características de *Bacillus cereus***

*Bacillus cereus* es un bacilo Gram+, aerobio facultativo y esporulado, con una gran resistencia a condiciones ambientales extremas, como calentamiento, congelación, desecación y radiación (Social, 2011). Algunas cepas son móviles gracias a sus flagelos peritricos. Su temperatura óptima de crecimiento es de 30 a 40°C, aunque algunas cepas pueden crecer a bajas temperaturas de (4 a 7°C) y otras hasta 55°C. Su rango de pH para el crecimiento es de 4.5 a 9.5, con un pH óptimo de 6 a 7 (Social, 2011). Esta especie puede encontrarse en el intestino del hombre, animales de sangre caliente e invertebrados, alimentos crudos como verduras frescas y mínimamente procesadas, cereales y derivados, especias, leche y productos lácteos, carnes crudas y derivados así como productos como la miel (Social, 2011). También se aísla con frecuencia en suelo y plantas, sedimentos, polvo y aguas minerales (Social, 2011).

Sus esporas son resistentes a la desecación y pueden sobrevivir a cocciones menores a 100°C. Aunque el crecimiento de las células vegetativas se inhibe a un pH de 4.3, sus esporas pueden sobrevivir a la acidez gástrica (incluso a pH 1) (Social, 2011). Pueden producir toxinas eméticas estables a altas temperaturas (100°C o mayores) y a rangos de pH de 2 a 9. Produce una enzima llamada lecitinasa, fermenta la glucosa, reduce nitratos a nitritos, produce acetil metil carbinol en medio VP, es catalasa positivo, rompe moléculas de tirosina, es hemólisis positivo, no fermenta manitol, la mayor parte de sus

cepas son móviles (flagelos peritricos), capaz de crecer en medios con 7.5% de NaCl y al cultivarse en Agar Nutritivo sus colonias muestran crecimiento rizoide(UNAM, 2018). También, se ha reportado producción de enzimas lacasas en cepas de *Bacillus cereus* (Allos & Hussein, 2015), *Bacillus tequilensis* (Sondhi et al., 2015) y *Bacillus subtilis*(Mishra & Srivastava, 2016; Moszer, Danchin, & Martin-verstraete, 2001; Muthukumarasamy, Jackson, Joseph-Raj, & Sevanan, 2015).

### **1.8 Características de *Staphylococcus aureus***

Es una bacteria Gram +, pero las cepas viejas se tiñen como Gram-(Trabajo, 2012), tiene forma de coco y pueden aparecer en parejas, cadenas o racimos, mide de 0.8 a 1.5 micras de diámetro, inmóvil y algunas cepas producen una cápsula externa mucoide, es anaerobio facultativo, coagulasa positivo, catalasa positivo y oxidasa negativo(Trabajo, 2012).

Suele habitar en el ser humano, mamíferos, aves (es bacteria saprófita de piel y mucosas del hombre y animales), así como en alimentos y agua. No tiene estructuras de resistencia. Produce y secreta las enterotoxinas estafilocócicas (SEs) A,B,C1,2,3,D,E,G,H,I, que originan intoxicaciones alimentarias; así como la toxina del síndrome del shock tóxico (TSST-1)(Trabajo, 2012).

*Staphylococcus aureus* produce una gran variedad de enzimas extracelulares, como: coagulasa, estafiloquinasa, proteasa V8, serina proteasa, cisteína proteasa, metaloproteasa, lipasas, esterases, PI fosfolipasa C (PI-PLC), enzima modificadora de ácidos grasos (FAME), hialuronato liasa, nucleasas, termonucleasa,  $\beta$ -lactamasa, Endo- $\beta$ -N-acetilglucosamidasa y N-Acilmuramil-L-alanina amidasa(Arvidson, 2006). También se ha reportado que produce enzimas oxidasas multicobre(Sitthisak, Howieson, Amezola, & Jayaswal, 2005).

## CAPITULO 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Métodos de detección para el ácido okadaico y el clorofeno

Durante mucho tiempo, el método de detección convencional para la identificación del ácido okadaico ha sido a través de bioensayos en ratones, mediante la obtención de extractos de marisco empleando acetona(UE, 2005). La prueba considera positivo la muerte de dos de tres ratones inoculados con un equivalente de 5 g de hepatopáncreas de marisco o 25 g de cuerpo entero del marisco (UE, 2005). Esta biotoxina también se ha detectado por bioensayos con *Daphnia*, encontrando que la mitad de la concentración de toxicidad máxima efectiva (EC50) era de  $15 \pm 1.8 \mu\text{g/L}$  en extractos de mejillones (Prego-Faraldo et al., 2013; Vernoux et al., 1993). Sin embargo, en los últimos años el uso de Cromatografía Líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) ha sido cada vez más común en esta aplicación, alcanzado Límites de Detección (LOD) tan bajos como  $0.013 \mu\text{g/L}$  de ácido okadaico(Riccardi et al., 2018). Por otra parte, se han propuesto inmunoensayos competitivos, basados en monocapas autoensambladas (SAM)(Leonardo et al., 2017) construidas a partir de tioles y ditiolos; sobre las cuales se inmovilizan anticuerpos contra el ácido okadaico, obteniendo LODs de  $2.4 \pm 0.3 \text{ ng/mL}$  (usando tioles) y  $2.1 \pm 0.2 \text{ ng/mL}$  (usando ditiolos)(Leonardo et al., 2017).

En cuanto a otros métodos alternativos, se han realizado ensayos en cultivos celulares (Crocì, Cozzi, Stacchini, De-Medici, & Toti, 1997), con observación directa al microscopio para detectar del daño celular (Prego-Faraldo et al., 2013). Así mismo, han utilizado ensayos colorimétricos por inhibición de la actividad de la fosfatasa como método de detección indirecto, aprovechando la capacidad de ésta toxina de inhibir su actividad(Fujiki et al., 1991), obteniendo un límite de cuantificación de  $56 \mu\text{g/Kg}$ (Smienk et al., 2013).

Con respecto al uso de biosensores, previamente se reportó la aplicación de un inmunosensor para la detección de ácido okadaico, por medio de fluorescencia basado en gemas magnéticas modificadas con ácidos carboxílicos (MBs), sobre los cuales se inmovilizó el anticuerpo conjugado del ácido okadaico. Posteriormente, el ácido okadaico presente en una muestra compete por los sitios de unión del anticuerpo inmovilizado.

Mientras tanto, un segundo anticuerpo, marcado con una molécula fluorescente se une al ácido okadaico de la muestra. Por lo cual, la cantidad de fluorescencia detectada es inversamente proporcional al analito, presentando un LOD de 0.05 µg/L con un rango lineal de 0.2– 20 µg/L(Pan, Zhou, Su, Hu, & Wang, 2017).

Por otro lado, la técnica de resonancia de superficie de plasmones ha sido utilizada para el desarrollo de biosensores basados en anticuerpos inmovilizados, para la detección de la biotoxina ácido domoico, obteniendo un rango de trabajo de 4.8 a 6.9 ng/mL con anticuerpos monoclonales y 2.3–6.0 ng/mL con anticuerpos policlonales(Yakes, Buijs, Elliott, & Campbell, 2016).

Con respecto al clorofeno, los métodos convencionales para detectar su presencia, han sido reportados empleando cromatografía HPLC-MS con un límite de cuantificación de 0.01 de mg/kg en suelo (ECHA, 2017), 0.3 µg/m<sup>3</sup> en aire(Wilmer, Trau, Renneberg, & Spener, 1997) y 0.1 µg/L en agua (ECHA, 2017). Así mismo, se ha analizado por cromatografía de gases con detector de ionización de flama (GC/FID) (OSHA, 2018).

Por otro lado, no se encontraron reportes del uso de biosensores en la detección del clorofeno. Sin embargo, existen reportes del uso de principios electroquímicos basados la inmovilización de enzimas lacasas para la detección de otros contaminantes, como el pesticida clorhidrato de formetanato en muestras de frutas, con un límite de detección de  $9.5 \times 10^{-8} \pm 9.5 \times 10^{-10}$  M ( $0.02 \pm 2.6 \times 10^{-4}$  mg/kg en base a extracto seco)(Ribeiro et al., 2014). Asimismo, se han reportado trabajos donde se utilizan lacasas en un biosensor electroquímico para el análisis de dopamina mostrando un límite de detección bajo (5.71 nM) y un amplio rango lineal (30-100 nM)(G. Li et al., 2016).

En general, el uso de enzimas como bioreceptores acopladas a un sistema de Resonancia Superficial de Plasmones ha sido reportado previamente. Por ejemplo, Miyazaki y colaboradores (2017)(Miyazaki et al., 2017) inmovilizaron glucosa oxidasa y

peroxidasa en un biosensor SPR para detectar glucosa, obteniendo un LOD de 3.4  $\mu\text{mol/L}$ . En otro estudio, Surwase y colaboradores (2016)(Surwase et al., 2016) inmovilizaron lacasa en un chip de oro y lo acoplaron un sistema SPR para detectar la interacción entre las lacasas y moléculas pequeñas como ácido ascórbico, ácido kójico, floroglucinol y crocina. Los autores calcularon que estos analitos tenían una afinidad por la lacasa con constantes de unión de  $8.331 \times 10^{-8}$  M,  $6.411 \times 10^{-7}$  M y  $1.532 \times 10^{-8}$  M y  $3.204 \times 10^{-3}$  M, respectivamente. Pathak y colaboradores (2018)(Pathak, Parveen, & Gupta, 2018) utilizaron tirosinasa inmovilizada en nanotubos de carbón y SPR, para detectar sulfametoxazol, obteniendo un LOD de 0.29 nM/ $\mu\text{L}$ .

De acuerdo con lo anterior, podemos destacar que las enzimas oxidasas han sido ampliamente empleadas como bioreceptores, sin embargo, su aplicación ha sido mayormente en sistemas electroquímicos, siendo pocos reportes los que establecen biosensores enzimáticos basados en la técnica resonancia superficial de plasmones (SPR). Por otro lado, la revisión bibliográfica realizada no arrojó resultados acerca de la detección del ácido okadaico o clorofeno, mediante el uso de biosensores enzimáticos basados en SPR, lo más cercano fue la detección del ácido domoico usando anticuerpos acoplados a un sistema SPR.

Con base a los antecedentes y a la amplia información reportada acerca del comportamiento catalítico de las enzimas oxidasas, en este proyecto se propone el uso de enzimas lacasa del tipo bacteriano, para ser empleadas como bioreceptor en la detección de ácido okadaico y del clorofeno mediante su monitoreo a través de la técnica de resonancia superficial de plasmones.

### **CAPITULO 3. APORTACION CIENTIFICA**

Debido a los problemas de salud que el clorofeno y el ácido okadaico generan al entrar en contacto con el ser humano, así como las limitaciones que actualmente presentan las técnicas convencionales que son empleadas en su detección, surge la necesidad de desarrollar herramientas analíticas que brinden alternativas para superar dichas limitaciones.

En este contexto, se propone en esta investigación el desarrollo de un protocolo de detección para el ácido okadaico y el clorofeno, por medio de enzimas oxidasas del tipo lacasa de origen bacteriano, inmovilizadas en oro y acoplados a un sistema de Resonancia Superficial de Plasmones, ya que no se ha reportado previamente el uso de este tipo de biosensores para detectar estos contaminantes, siendo utilizadas en su lugar, metodologías clásicas muy laboriosas, como bioensayos con ratones y técnicas de HPLC.

## **CAPITULO 4. HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

### **4.1 HIPOTESIS**

Las enzimas oxidasas del tipo lacasa y de origen bacteriano serán capaces de interactuar con la biotoxina ácido okadaico y el contaminante emergente clorofeno, permitiendo su detección por debajo de 0.058 µg/L con un sistema de SPR, la cual es la concentración sin efectos previstos, de acuerdo con la *European Chemicals Agency* (ECHA) y la *European Commission Regulation* (ECR).

### **4.2 OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar un protocolo de detección para el ácido okadaico y el clorofeno, basado en la inmovilización de enzimas oxidasas del tipo lacasa (provenientes de bacterias del Estado de Nuevo León) sobre películas de oro y acopladas a un equipo de Resonancia Superficial de Plasmones, así como su validación por medio de la técnica de HPLC.

### **4.3 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

(1) Realizar un tamizaje entre diferentes géneros bacterianos provenientes de la región de Nuevo León, para evaluar su producción de enzimas oxidasas del tipo lacasa.

(2) Evaluar la actividad catalítica de las enzimas libres en presencia de los analitos de interés.

(3) Inmovilizar la enzima en un sustrato de oro.

(4) Evaluar la actividad catalítica de la enzima inmovilizada con respecto a la enzima libre, empleando un sustrato conocido (molécula modelo, ABTS).

(5) Evaluar la reacción catalítica de la enzima mediante SPR al interactuar con los analitos de interés.

(6) Determinar los parámetros analíticos de la medición por SPR en muestras sintéticas.

(7) Validar los resultados obtenidos mediante el protocolo de medición por SPR a través de su comparación con aquellos obtenidos por medio de una técnica estandarizada de HPLC.

## **CAPITULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS**

A continuación, se presenta la lista de reactivos, materiales y equipos empleados durante el desarrollo de este proyecto de investigación.

### **5.1 Reactivos**

En esta sección se indica el nombre y marca de los reactivos utilizados en la investigación, los cuales se encuentran en orden alfabético para facilitar su localización.

- ABTS ( ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), marca Sigma-Aldrich, grado HPLC
- Acetona, marca J.T. Baker, grado reactivo
- Aceite de inmersión con un índice de refracción de 1.51
- Ácido cítrico, marca AMRESCO, grado reactivo
- Ácido clorhídrico concentrado, marca Sigma-Aldrich, grado reactivo
- Ácido okadaico, marca Sigma Aldrich



- Ácido sulfúrico, marca JALMERCK, grado reactivo
- Agar nutritivo, marca BD BIOXON, grado microbiológico
- Agua destilada, marca LSP, grado HPLC
- Albúmina de suero bovino marca Sigma-Aldrich, 98% de pureza.
- Alcohol 96%, marca CTR, grado reactivo
- Azul de bromofenol, marca G. Frederick Smith, grado microbiológico
- Azul de metileno, marca Merck, grado microbiológico
- Caldo Nutritivo, marca BD BIOXON, grado microbiológico
- CASO (caldo-peptona de caseína-peptona de harina de soya), marca Merck.
- Carbonato de calcio, marca Sigma-Aldrich, grado reactivo
- Citrato de sodio, marca Productos Químicos Monterrey, grado reactivo
- Clorofeno, marca Sigma-Aldrich, pureza 95%
- Cloruro de bario, marca Desarrollo de Especialidades Químicas, grado reactivo
- Cloruro de sodio, marca Desarrollo de Especialidades Químicas, grado reactivo
- Cristal violeta, marca CERTISTAIN, grado microbiológico
- Dicromato de potasio, marca Sigma-Aldrich, grado reactivo
- EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) clorhidrato de carbodiimida), marca Sigma-Aldrich, grado reactivo (99% de pureza)
- EDTA, marca Sigma-Aldrich, grado reactivo.
- Etanol al 96%, marca Desarrollo de Especialidades Químicas
- Extracto de levadura, marca E.M. SCIENCE, grado microbiológico
- Fenolftaleína, marca Sigma-Aldrich
- Fosfato dibásico de potasio, marca J.T. Baker, grado reactivo
- Fosfato monobásico de potasio, marca J.T. Baker, grado reactivo
- Glicerina, marca Sigma-Aldrich, grado reactivo
- Guaiacol, marca Sigma-Aldrich, grado reactivo
- Hidróxido de sodio, marca Productos Químicos Monterrey, grado reactivo
- Lacasa de *Rhus vernicifera*, marca Sigma-Aldrich, L2157-10KU
- MES (ácido 2-(N-morfolino)etanesulfónico), marca Sigma Aldrich, pureza 99%
- Metanol al 99.9%, marca Desarrollo de Especialidades Químicas, grado reactivo
- MHDA (ácido mercaptohecaedecanoico): pureza 99%, marca Aldrich

- MUD (11-mercapto-1-undecanol): pureza 99%, marca Aldrich
- Naranja de metilo, marca Sigma-Aldrich, grado reactivo
- NHS (N-hidroxisuccinimida), marca Sigma-Aldrich, grado reactivo (98% de pureza)
- Nitrato de plata, marca Sigma-Aldrich, grado reactivo
- Nitrato de potasio, marca Sigma-Aldrich, grado reactivo
- Reactivo de Bradford, “*Quick Start™ Bradford Protein Assay*”, marca BioRad.
- Rojo Congo, marca G. Frederick Smith, grado microbiológico
- Safranina, marca CERTISTAIN, grado microbiológico
- Sefarosa-DEAE, marca Sigma-Aldrich, lote #MKCG4728
- Siringaldazina, marca Sigma-Aldrich, grado reactivo
- Sulfato de cobre, marca Productos Químicos Monterrey, grado reactivo
- Sulfato de sodio, marca Sigma-Aldrich, grado reactivo
- Silica Gel 60 GF254
- Triptona, marca Merck.

## 5.2 Equipos

A continuación, se enlista en orden alfabético, los equipos empleados en las mediciones de caracterización y cuantificación analítica, realizados durante el proyecto.

- Analizador de carbono orgánico total, modelo TOC-L, marca Shimadzu
- Autoclave, marca Heidolph Brinckmann, modelo Tuttnauer
- Bureta de 50 mL, marca Kimax
- Centrífuga con refrigeración, marca Hettich Zentrifugen, modelo MIKRO 22R
- Chip de vidrio recubierto de Cr y Au por evaporación en el Centro de Investigaciones en Óptica, A.C.
- Columna Zorbax ODS C18, 25cmx4.6 mm, 5µm. Marca SUPELCO Analytical
- Equipo de Resonancia Superficial de Plasmones (SPR)
- Espectrofotómetro UV-Vis, marca Varian, modelo Cary 50

- Incubadora con agitación, marca SHEL LAB, modelo S16
- Incubadora, marca Blue M, modelo 1000A
- Microcentrífuga Microfuge 16, marca Beckman Coulter
- Plancha de calentamiento, marca ThermoScientific, CIMAREC
- Prisma de vidrio tipo BK7, fabricado artesanalmente en el Centro de Investigaciones en Óptica, con un índice de refracción de 1.51509

### **5.3 Material Biológico**

Los microorganismos empleados en este trabajo fueron donados por la Dra. Ma Elena Cantú Cárdenas al Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Las bacterias utilizadas fueron de los géneros *Bacillus* y *Staphylococcus*. Los cuales se conservaron por medio de resiembras cada 6 meses en el Laboratorio de Innovación y Desarrollo Biotecnológico (LIDB).

### **5.4 Muestra real de agua de río**

El muestreo de agua de río se llevó a cabo en un río que atraviesa el campus del Centro de Investigaciones en Óptica, A.C. (CIO), con las coordenadas: 21°09'54.0"N 101°43'30.6"W, el día 23 de julio del año 2019. El muestreo se realizó de acuerdo con lo establecido en la NOM-230-SSA1-2002 (SSA, 2002).

### **5.5 Producción de enzimas oxidasas del tipo lacasa a partir de diferentes cepas bacterianas de la región de Nuevo León**

#### **5.5.1 Reactivación de cepas bacterianas de la región de Nuevo León**

Se reactivaron 5 cepas bacterianas de los géneros *Bacillus* y *Staphylococcus*, los cuales fueron aislados de los municipios de Monterrey, Apodaca y Pesquería, en el Estado de Nuevo León (Ver Tabla 2) de acuerdo con el trabajo previamente reportado por Silva-Salinas (Silva-Salinas, 2017). La reactivación consistió en la inoculación de las cepas en caldo nutritivo a 37°C por 24 horas en una incubadora con agitación SHEL-LAB. Posteriormente, las cepas fueron propagadas empleando un volumen de 10 mL del

mismo medio, el cual se incubó a 37 °C a una agitación constante de 110 rpm durante 2 días. Una vez que se realizó la reactivación, las cepas *B. cereus* fueron sembradas en placas de agar nutritivo mientras que *S. aureus* fue sembrado en agar caseína-peptona de harina de soya (CASO), con resiembra cada 4 semanas y conservados a 4°C.

Tabla 2. Cepas reactivadas para pruebas de producción de enzimas oxidasas

Clave	Especie	Lugar de colecta
T1B2	<i>Bacillus cereus</i> EM19	Río la Silla, Monterrey
T3A1	<i>Bacillus cereus</i> f24	Apodaca
T3C3	<i>Staphylococcus aureus</i>	Apodaca
T4A1	<i>Bacillus cereus</i> EM19	Pesquería
T4C3	<i>Bacillus cereus</i> f24	Pesquería

Una vez efectuada la activación de las cepas, estas fueron sometidas a un proceso de aclimatación en presencia del colorante azul de bromofenol al 0.001% (ver Figura 10), ya que se ha demostrado ser un sustrato que favorece la producción de oxidasas <sup>36</sup>.



Figura 10. Estructura del azul de bromofenol(NIH, 2017).

El proceso de aclimatación de las cepas consistió en su incubación de manera secuencial en caldo nutritivo, con cantidades crecientes del colorante, mientras se disminuía gradualmente la concentración de nutrientes, tal como se puede observar en la Tabla 3.

En cada medio se cultivó la cepa durante 48 h antes se inocularla en la siguiente condición de aclimatación.

Tabla 3. Condiciones durante el proceso de aclimatación.

Siembra	Gramos de medio de cultivo (por cada 100 mL)	Gramos de azul de bromofenol (por cada 100 mL)
1	8.0	0.001
2	5.3	0.01
3	2.7	0.1
4	2.0	1

Una vez que las cepas fueron aclimatadas, se tomaron 200  $\mu$ L de cultivo de la última siembra y con ella se inocularon tubos con 18 mL de caldo nutritivo y azul de bromofenol al 0.001% p/v, posteriormente, se incubaron a 30°C durante 96 h. Finalmente, se midió la absorbancia a 590 nm cada 24 h, para monitorear la degradación del colorante.

### 5.5.2 Tamizaje de cepas productoras de enzimas oxidasas tipo lacasa

Las cepas bacterianas, previamente aclimatadas fueron inoculadas (2% v/v de inóculo) en 10 ml del medio de cultivo propuesto por Sondhi *et al.* (2015)(Sondhi et al., 2015), el cual ha sido reportado favorece la producción de enzimas lacasas (Sondhi et al., 2015). El medio de cultivo está integrado por 0.6% p/v de extracto de levadura y 100  $\mu$ M de CuSO<sub>4</sub>, pH 8. Los cultivos, inoculados con cada cepa se mantuvieron en agitación durante 96 horas a 37°C y 110 rpm. Posteriormente el cultivo se propagó en 40 ml del mismo medio, por otras 96 horas a 37°C. Durante este proceso se tomaron alícuotas de los cultivos para medir su actividad enzimática. Finalmente, las muestras de cada cultivo se centrifugaron a 14,000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se conservó el sobrenadante para su posterior análisis de actividad enzimática.

El ensayo de actividad enzimática para observar la presencia de lacasas fue realizado por medio de una medición espectrofotométrica (UV-Vis), de acuerdo con el protocolo establecido por Zhang *et al.* (2018)(Z. Zhang, Liu, Fan, Wang, & Li, 2018). Para las pruebas se tomaron 200 µL del sobrenadante de cultivo y se adicionaron a la mezcla de reacción (2 ml) que contiene el sustrato correspondiente. El 2, 2'-Azinobis-3-etil- benzo-tiazolina-6-acido sulfónico (ABTS) fue utilizado como sustrato, a concentración 10mM, en buffer de acetato de sodio 0.1 M, pH 4.5. El cambio de la absorbancia fue medida a temperatura ambiente durante 30 minutos a 420 nm(Z. Zhang et al., 2018).

La actividad enzimática fue expresada como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 µM de producto por minuto (U). La actividad enzimática fue calculada con la ecuación 1:

$$Actividad\ en\ \frac{U}{L\left(\frac{\mu mol}{min \times L}\right)} = \frac{\left[\left(\frac{\Delta Abs}{min}\right) \times Vt\right]}{\epsilon \times 10^4 \times 1 \times Vm} \quad Ecuación\ 1$$

Donde:  $\Delta Abs$  es el cambio en la absorbancia,  $Vt$  es el volumen total de la celda,  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar del ABTS ( $36,000\ M^{-1}\ cm^{-1}$ ) a 420 nm o del p-nitrofenol ( $17,800\ M^{-1}\ cm^{-1}$ ) a 410 nm y  $Vm$  es el volumen de la muestra (Z. Zhang et al., 2018).

### 5.5.3 Cinética de crecimiento y actividad enzimática específica

De la prueba realizada en la metodología 5.5.2, la cepa bacteriana con mejor potencial de producción, fue inoculada nuevamente en 10 ml del caldo de producción propuesto por Sondi *et al.* (2015) (Sondhi et al., 2015). El cultivo se mantuvo en agitación durante 96 horas a 37°C y 110 rpm. Durante este periodo de incubación se tomaron alícuotas para medir la densidad óptica del cultivo a 600 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Cary 50, con la finalidad de realizar una curva de crecimiento de la cepa. Así mismo, las alícuotas posteriormente fueron centrifugadas a 14,000 rpm durante 15 minutos a 4°C y

se conservó el sobrenadante para su posterior análisis de actividad enzimática de acuerdo con la metodología previamente descrita por Zhang *et al.* (2018)(Z. Zhang et al., 2018).

Finalmente, la cuantificación de proteína en los extractos enzimáticos fue determinada por el método de Bradford, el cual consiste en la unión del colorante azul de Coomassie a la proteína. Se preparó una curva de calibrado empleando como estándar proteína albúmina sérica bovina en un rango de 0 a 1 mg/mL. La cuantificación se realizó midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

#### **5.5.4 Purificación parcial y semi caracterización de las enzimas con actividad lacasa (pH, temperatura e inhibidores)**

La purificación parcial de las lacasas presentes en el sobrenadante (extracto enzimático) del medio de cultivo fue realizado mediante cromatografía de exclusión por tamaño y posteriormente por cromatografía de intercambio iónico.

Para realizar la cromatografía por exclusión de tamaño, se empacó una columna con silica gel “60 GF254” y como fase móvil se empleó un buffer de acetato de sodio 0.1M a pH 5. Se agregaron 5 mL del sobrenadante a la columna empacada y se eluyeron utilizando buffer de acetato de sodio 0.1M a pH 5, recuperándose fracciones de 1 mL, las cuales se almacenaron a 4°C para realizarles pruebas de actividad enzimática y concentración de proteínas por medio del ensayo de Bradford.

Posteriormente, aquellas fracciones con actividad enzimática, se hicieron pasar por una columna de intercambio aniónico, de sefarosa-DEAE, utilizando un buffer acetato de sodio 0.1 M, pH 5, con un gradiente de NaCl. Al inicio se estabilizó la columna con buffer acetato de sodio 0.1 M a pH 5. Después se procedió a correr la cromatografía con un gradiente de NaCl de 0.05 a 0.30 M. Finalmente, se recolectaron fracciones de 1 ml para

su cuantificación de actividad enzimática y concentración de proteínas por medio del ensayo de Bradford.

Una vez recuperada la enzima semipurificada, ésta se sometió a un proceso de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE): Para ello, se pre-concentraron las enzimas con filtros Centiprep 30K de Millipore®. Se agregaron 1200 µL de extracto enzimático a cada filtro y se centrifugaron a 7,500 G /15 min a 4°C. De esa pre-concentración se obtuvieron aproximadamente 60 µL de enzimas por cada filtro. Se realizó un ensayo de Bradford y se determinó que las muestras tenían una concentración de 555 µg/ mL, se conservaron a 0°C.

Antes de realizar la electroforesis, se desnaturalizaron muestras de 10 µL con Buffer Laemmli en una proporción muestra: buffer de 3:1. Una vez mezclados, se calentaron a 100°C/10 min. Posteriormente se cargaron las muestras y se corrió el gel de poliacrilamida al 12% a 180 Volts. Se utilizó como marcador de peso molecular un Estándar de Proteína Preteñido Multicolor (GenScript®), el cual es una mezcla de diez proteínas preteñidas altamente purificadas que varían de 5 kDa a 270 kDa, acopladas covalentemente con cuatro cromóforos diferentes.

Por otro lado, con la finalidad de conocer la estabilidad enzimas con actividad lacasas producidas por la bacteria *S. aureus* (T3C3), se planteó un diseño de experimentos exploratorio, de tipo factorial (realizado en Minitab), con 2 factores (pH y temperatura), 1 bloque, 2 puntos centrales por bloque y 6 corridas (Ver Tabla 4).

Tabla 4. Tabla de diseño (aleatorizada)

Corrida	Bloque	A	B
1	1	+	-
2	1	0	0
3	1	-	-
4	1	+	+
5	1	-	+



6	1	0	0
---	---	---	---

Las condiciones del experimento, así como el orden de las corridas se puede observar en la Tabla 5, donde las temperaturas evaluadas fueron 25, 42.5 y 60 °C, mientras que los valores de pH fueron 8, 5.5 y 3.

Tabla 5. Orden de corridas y condiciones de los experimentos.

OrdenEst	OrdenCorrida	PtCentral	Bloques	pH	Temperatura
2	1	1	1	8	25
6	2	0	1	5.5	42.5
1	3	1	1	3	25
4	4	1	1	8	60
3	5	1	1	3	60
5	6	0	1	5.5	42.5

Los ensayos se realizaron tomando 90  $\mu$ L de la enzima y se adicionaron 10  $\mu$ L del buffer correspondiente al pH deseado (buffers de acetato de sodio y buffer de fosfato de potasio). Posteriormente las mezclas se incubaron a la temperatura correspondiente durante un periodo de 2 h, el tiempo se estableció de acuerdo con resultados de pruebas preliminares. Una vez terminada la incubación, las muestras fueron sometidas al protocolo propuesto por Zhang y colaboradores (Z. Zhang et al., 2018) (2018), para monitorear su actividad enzimática a 420 nm con ABTS como sustrato.

Finalmente, las enzimas también fueron sometidas a diferentes concentraciones de compuestos, previamente establecidos por la literatura, como inhibidores de estas enzimas. Entre ellos el EDTA, cloruros y metanol (Rodríguez-Couto & Toca, 2006).

Para lo anterior, se empleó la metodología reportada por Couto y colaboradores (2006) (Rodríguez-Couto & Toca, 2006), en la cual, una alícuota de enzimas (10% v/v) fue adicionada a tres concentraciones de EDTA: 0.5 mM, 1.75 mM y 3 mM; tres concentraciones de NaCl: 40, 100 y 200 mM y 3 concentraciones de metanol: 10, 30 y 60% v/v. En todos los casos el volumen final de la mezcla fue de 2 ml. Las muestras se incubaron durante 135 min, midiendo la absorbancia cada 20 min, a 420 nm.

## **5.6 Evaluación cualitativa de la actividad catalítica de las enzimas libres en presencia de los analitos**

Para llevar a cabo la evaluación, se preparó una mezcla de reacción que contenía 100 mg L<sup>-1</sup> de cada analito (ácido okadaico y clorofeno), 10% (v / v) de buffer de acetatos 0.1 M (pH 4.5) y 100 U mg<sup>-1</sup> de enzima con actividad lacasa, la solución se mezcló homogéneamente y se protegió de la luz hasta su uso. La solución de reacción fue monitoreada durante 5 horas usando un espectrofotómetro UV-Vis para registrar los cambios en el espectro de absorción del analito de interés (rango de 200 y 800 nm). Los cambios en el espectro de absorción del analito serían atribuidos al efecto de las enzimas.

## **5.7 Inmovilización de las enzimas con actividad lacasa en sustratos de oro.**

### *5.7.1 Funcionalización*

Como una etapa previa a la inmovilización de los bioreceptores enzimáticos es necesario realizar un tratamiento de funcionalización sobre el sustrato de oro (chips de 50 nm). Este tratamiento consta de la unión de alcanotioles al oro, los cuales sirven como puente de unión entre el oro y las enzimas. En esta etapa el chip de oro es sumergido durante 12 horas en una solución de ácido 16-mercaptohexadecanoico (250µM en etanol) (Leonardo et al., 2017). Este alcanotiol posee en su estructura un grupo funcional de azufre, el cual queda unido al oro por diferencia de electronegatividad, mientras que el otro extremo de la estructura presenta un grupo carboxilo, sitio de unión para distintos aminoácidos presentes en las enzimas (especialmente lisina e histidina). Al finalizar el periodo de funcionalización, el chip de oro es lavada con etanol (ver Figura 11).

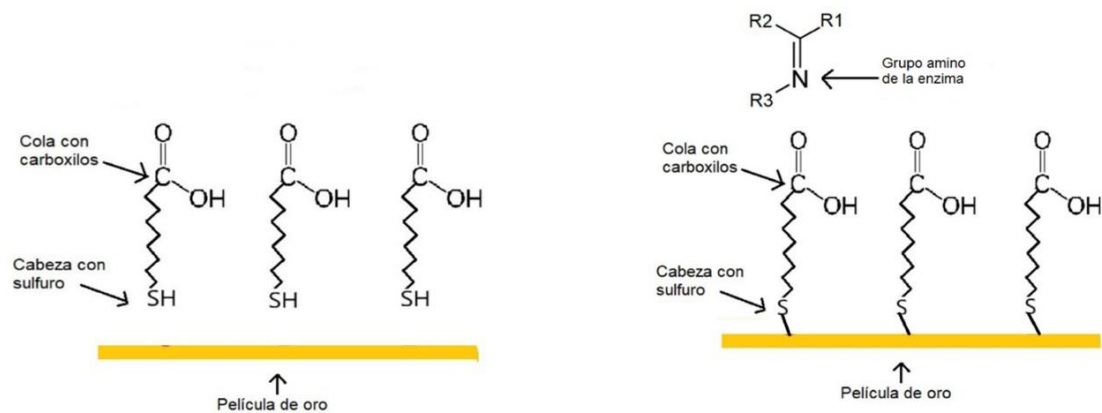


Figura 11 Esquema de funcionalización e inmovilización (adaptación de Casero, (2013) (Casero et al., 2013).

### 5.7.2 Proceso de inmovilización

Una vez funcionalizada la superficie del chip con alcanotioles, ésta deberá ser activada para que los grupos estén disponibles para la unión con las enzimas. La activación se realiza a mediante el uso de entrecruzantes EDC / NHS (0.05 M/0.2 M) mezclados en un buffer MES, de concentración 0.01 M y pH 5.0. Durante la reacción de activación, ésteres de carboimida son generados, los cuales sirven de sitios de unión para la enzima a través de la formación de un enlace amida con los aminoácidos de su estructura (ver Figura 12). En la inmovilización se emplearon  $200 \text{ U mg}^{-1}$  de lacasa y todo el proceso de unión fue monitoreado en tiempo real a través del equipo de SPR.

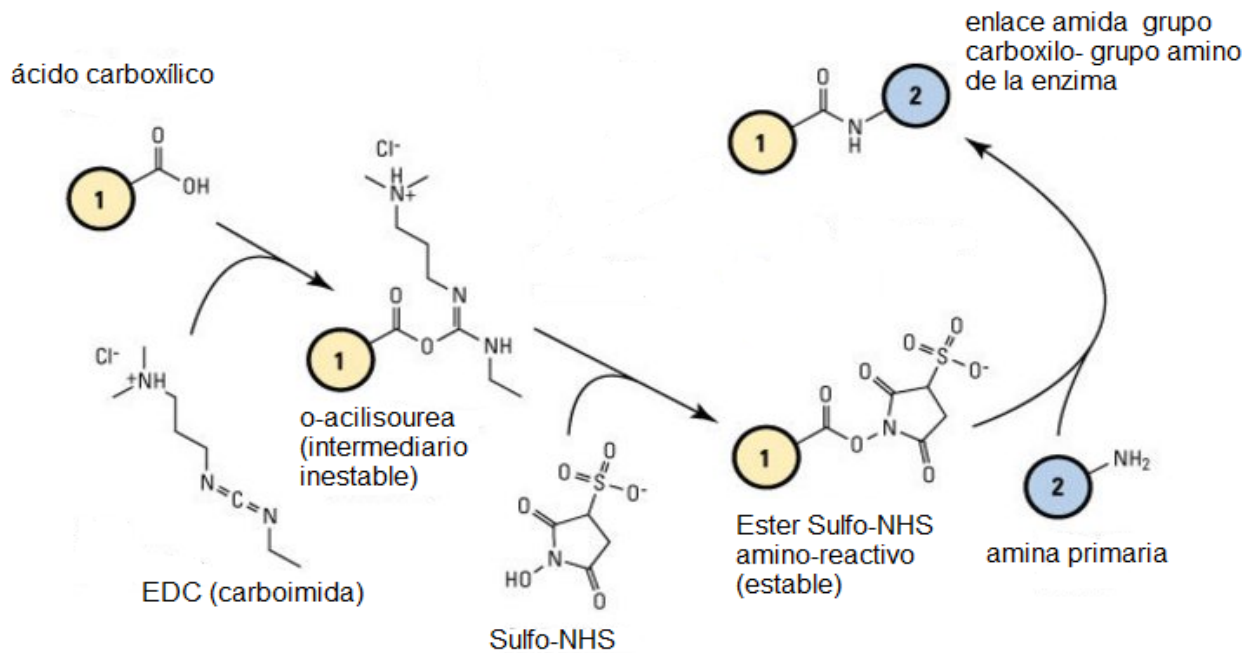


Figura 12. Inmovilización de la enzima en los grupos carboxilo del alcanotiol (TermoFisher, 2018).

En cada etapa del proceso, los chips de oro fueron sometidos a micrografías de 10,000X y mapeo elemental de superficie en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-7800F. Así mismo, se realizó una caracterización por FT-IR del chip inmovilizado. Lo anterior con la finalidad de tener mayor evidencia del resultado del proceso de inmovilización.

### 5.8 Evaluación de la actividad catalítica de la enzima inmovilizada.

La actividad catalítica de las enzimas inmovilizadas fue determinada mediante el mismo proceso explicado en la sección 5.5.3, empleando el protocolo establecido por Zhang y colaboradores (2018)(Z. Zhang et al., 2018). La diferencia radica en que la alícuota de sustrato para cada enzima fue adicionado directamente al sistema inmovilizado (chip de oro).

A través de la diferencia en la concentración de proteínas (enzimas con actividad lacasa) en la solución previa y posterior a la inmovilización, se calculó un porcentaje de inmovilización estimado. Para ello, se colocaron 150  $\mu$ L del reactivo de Bradford sobre el chip de oro y al finalizar el tiempo de reacción se recuperó la solución con ayuda de una micropipeta, para finalmente ser leída por UV-vis a 590 nm.

### **5.9 Detección de analitos de interés a través de un biosensor enzimático basado en la técnica de SPR**

El análisis de la biotoxina ácido okadaico y el contaminante emergente clorofeno, se realizó mediante el uso de un sistema de resonancia superficial de plasmones (SPR), el cual empleó como bioreceptor enzimas con actividad lacasa inmovilizadas sobre un chip de oro.

Una vez montado el chip en el equipo, se realiza un barrido angular que permite observar experimentalmente el ángulo crítico (ángulo al que incide el haz de luz sobre el chip, generando el fenómeno de resonancia superficial de plasmones), tal como se menciona en la Figura 5. Posterior a la generación de la curva de SPR, es necesario fijar el ángulo de trabajo al que se realizarán las mediciones de sensado, el cual se establece en el punto medio de la pendiente que se forma al acercarse al ángulo crítico, ya que en ese punto es donde se logra una mayor sensibilidad a cambios de intensidad de luz originados de la interacción del receptor con el analito (Ver Figura 13).

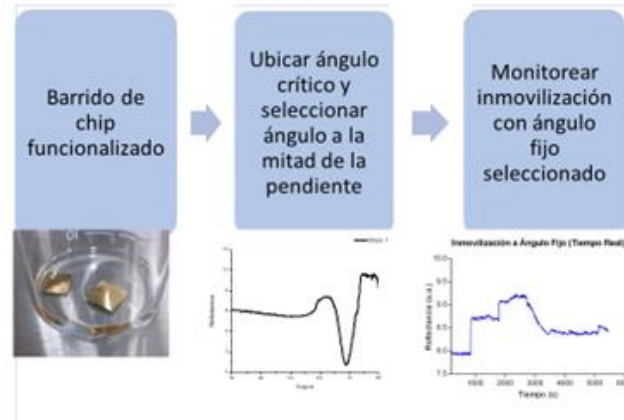


Figura 13. Proceso de selección del ángulo de trabajo.

Una vez fijado el ángulo al que ocurrirá la medición, la muestra se inyecta sobre el chip inmovilizado, a través de un canal fluídico a una velocidad de flujo de  $90 \mu\text{L} / \text{min}$ . Las muestras fueron preparadas en un rango de concentración de analito (ácido okadaico o clorofeno) de 0 a 10 ppm, disueltos en un buffer de fosfatos de potasio a pH 7.3. Dicho valor de pH permitió que la metodología fuera lo más cercano a una aplicación real en muestras de agua. La unión del analito al bioreceptor fue detectado a través de cambios en la intensidad en la señal del SPR (Ver Figura 14). Una vez terminada la detección, se adiciona una solución de lavado (NaOH 25 mM, seguida de agua bidestilada) que permite la regeneración de la superficie receptora del biosensor para recibir una nueva muestra y por tanto realizar una nueva medición. Todas las mediciones fueron realizadas por triplicado.

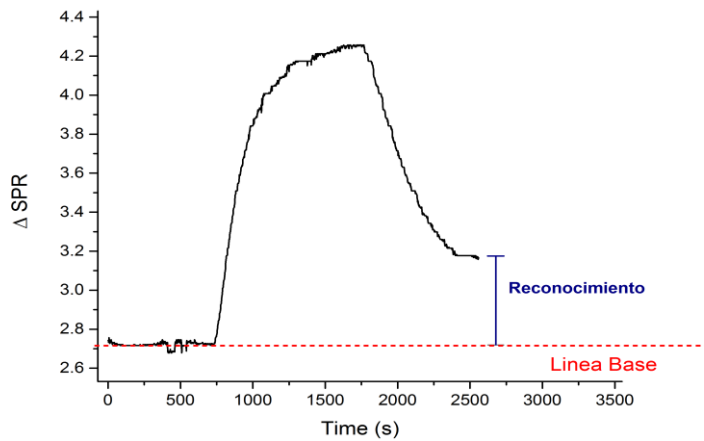


Figura 14. Curva de Reconocimiento por reacción de reconocimiento, medición en tiempo real.

Posteriormente, la interacción de la enzima y el analito (el cual actúa como sustrato) fue registrado mediante una curva de calibración, donde se observa los cambios de intensidad de la señal con respecto a las distintas concentraciones del analito.

### 5.10 Evaluación de los parámetros analíticos de la medición por SPR

Una vez graficada la curva de calibración, se realizó el cálculo del coeficiente de correlación y la ecuación de la recta. A partir de la información obtenida de la ecuación de la recta, es posible obtener la sensibilidad del método, la cual está dada por la pendiente de la misma.

En cuanto a los parámetros analíticos, el Límite de Detección (LOD), se calculó con la ecuación 2:

$$LOD = \frac{3 * SD_b}{m} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde: “SDb” es la desviación estándar del blanco de la curva y “m” es la pendiente de la ecuación de la recta.

Mientras que, el Límite de Cuantificación, fue evaluado con la ecuación 3:

$$LOQ = \frac{10 * SDb}{m} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde: “SDb” es la desviación estándar del blanco de la curva y “m” es la pendiente de la ecuación de la recta.

Debido a que es muy común que una muestra real este compuesta por una matriz compleja, que contenga interferencias que afecten la especificidad de un método, se decidió evaluar una muestra enriquecida de agua de río. La muestra se enriqueció con 3 ppm de analito y fue obtenida del muestreo de un río tal como se menciona en la sección 5.4. Una vez analizada la muestra enriquecida, se realizó una prueba T para determinar si existían diferencias significativas entre la concentración real añadida a la muestra y la concentración determinada experimentalmente.

### **5.10.1 Caracterización de la muestra real de agua de río**

La muestra de río fue caracterizada con la finalidad de saber sus componentes y si alguno de ellos pudiera causar alguna interferencia en el protocolo de medición de los analitos estudiados. Los parámetros evaluados fueron pH y sulfatos de acuerdo al procedimiento reportado por Aguilera y colaboradores (Rodríguez, Silva, & Reyes, 2010); alcalinidad total y acidez de acuerdo a la NMX-AA-036SCFI-2001 (SE, 2001); dureza de agua conforme lo reportado en la NMX-AA-072-SCFI-2001 (CONAGUA, 2001); cloruros de acuerdo a la NMX-AA-073-SCFI-2001 y carbono orgánico total (COT) con un analizador Shimadzu por oxidación catalítica de combustión. Finalmente se realizó una cuantificación de metales pesados por absorción atómica de acuerdo con la NMX-AA-051-SCFI-2016 (DOF, 2016).



### **5.11 Validación del protocolo de medición de SPR a través de la técnica estandarizada de HPLC**

Para la validación del método, se enriquecieron muestras sintéticas con 3 ppm de analito. Posteriormente se realizaron las mediciones por un protocolo estandarizado de HPLC para la detección de esos analitos HPLC y se compararon los resultados con aquellos obtenidos por medio de la técnica de SPR.

Los parámetros cromatográficos empleados en la detección de ácido okadaico mediante el equipo HPLC se basó en lo reportado por Vale y colaboradores (1999) (Vale, Antónia, & Sampayo, 1999), en donde se utilizó una columna de fase reversa (Zorbax ODS C18, 250x 4.6mmx 5mm) y una fase móvil constituida por acetonitrilo: agua (85:15), flujo de 1mL/min y medido a 290 nm (Vale et al., 1999). Mientras que el protocolo de cuantificación se basó en el uso de la misma columna pero empleando como fase móvil acetonitrilo-agua (85: 15) medido a 190 nm (ECHA, 2017).

Finalmente se realizó un análisis de ANOVA de un factor basado en la técnica instrumental usada (SPR y HPLC) y se compararon los resultados de ambas técnicas para evaluar si existían diferencias estadísticamente significativas entre ellas (n=6). Adicionalmente se llevó a cabo una prueba T de *Student* para comparar ambas técnicas.

### **5.12 Disposición de los residuos generados**

La disposición de residuos se llevó a cabo según el reglamento del Departamento de Control y Manejo de Residuos (FCQ-UANL, 2014) de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Los residuos generados fueron almacenados temporalmente en el laboratorio, en el área de contenedores, para posteriormente ser recogidos por el Departamento de Control y Manejo de Residuos. Los residuos fueron depositados en contenedores que se clasifican de acuerdo con el tipo de residuo.

Colector A: Soluciones salinas de pH 6-8, sales, ácidos y bases orgánicas. Colector B: Sólidos inorgánicos, sales inorgánicas. Colector C: Tóxicos e inflamables, aminas,

solventes orgánicos no halogenados. Colector D: Tóxicos e inflamables, aminas, solventes orgánicos halogenados. Colector E Orgánico: Muy tóxico, cancerígeno, orgánico. El clorofeno será desechado en el contenedor de pesticidas (OSHA, 2018), o en este caso, junto con el ácido okadaico, el cual, por ser un compuesto orgánico tóxico se desechará en el contenedor E. Para trabajar se usarán guantes de plástico y látex, así como campanas de extracción.

## **CAPITULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **6.1. Producción de enzimas oxidasas de tipo lacasa a partir de diferentes cepas de la región de Nuevo León**

#### **6.1.1 Reactivación de cepas bacterianas de la región de Nuevo León**

5 cepas bacterianas de los géneros *Bacillus* y *Staphylococcus*, aislados de distintas zonas del Estado de Nuevo León (Ver Tabla 2), fueron reactivados en caldo nutritivo a 37°C por 24 horas en una incubadora con agitación SHEL-LAB. Posteriormente, las cepas fueron aclimatadas, inoculadas en caldo nutritivo con azul de bromofenol al 0.001% y finalmente, monitoreadas cada 24 h. Lo anterior como una prueba preliminar para evidenciar una posible relación entre la producción de enzimas oxidasas y el decaimiento de la concentración del colorante monitoreado a 590 nm, ya que previos reportes han atribuido la degradación del azul de bromofenol a enzimas oxidasas(Kumar et al., 2016).

De acuerdo a los resultados en la prueba, la cepa que presentó mayor degradación fue T3A1(*Bacillus cereus* f24), mientras que las otras cepas mostraron solamente un ligero decremento en comparación con el valor del control. A pesar, que la prueba solamente pretendía ser exploratoria, los resultados coinciden con lo encontrado en la revisión de la literatura, donde se indica que las bacterias del género *Bacillus* presentan la capacidad de producir enzimas oxidasas del tipo lacasas (Allos & Hussein, 2015; Muthukumarasamy et al., 2015; Sondhi et al., 2015).

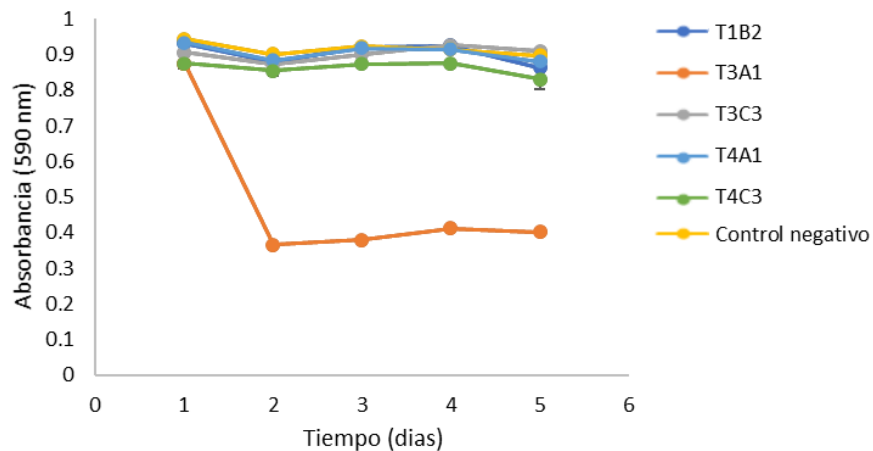


Figura 15. Degradación de azul de bromofenol por cepas reactivadas de *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*.

### 6.1.2 Tamizaje de cepas productoras de enzimas oxidasa tipo lacasa

Una vez que había indicios que las cepas bacterianas reactivadas tenían potencial para producir enzimas oxidasas, las bacterias fueron inoculadas en un medio de cultivo reportado por Sondhi *et al.* (2015) (Sondhi *et al.*, 2015) integrado por 0.6% p/v de extracto de levadura y 100  $\mu$ M de  $\text{CuSO}_4$ , pH 8. De acuerdo con dicho trabajo, el medio de cultivo favorece la producción de enzimas oxidasas del tipo lacasa, por lo cual y de acuerdo al protocolo, las bacterias inoculadas se mantuvieron en incubación con agitación durante 96 horas a 37°C y 110 rpm. Finalmente, las muestras de cada cultivo se centrifugaron a 14,000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se conservó el sobrenadante para su posterior análisis de actividad enzimática por espectrofotométrica (UV-Vis), de acuerdo con el protocolo establecido por Zhang *et al.* (2018) (Z. Zhang *et al.*, 2018).

El resultado de la medición de la actividad enzimática en el sobrenadante obtenido del cultivo de las 5 cepas reactivadas se puede observar en la Figura 16, donde es notable apreciar que solo T3A1 (*B. cereus*) y T3C3 (*S. aureus*) mostraron actividad enzimática de tipo lacasa, ya que este tipo de enzimas se caracterizan por provocar un vire de color, de verde claro a verde-azulado intenso, a causa de la oxidación del sustrato de ABTS lo cual incrementa la absorbancia. Mientras que la presencia de peroxidasas versátiles es

evidenciada por la reducción del ABTS, observable por el cambio de color de la solución, de un color verde claro a incoloro(Silva-Salinas, 2017).

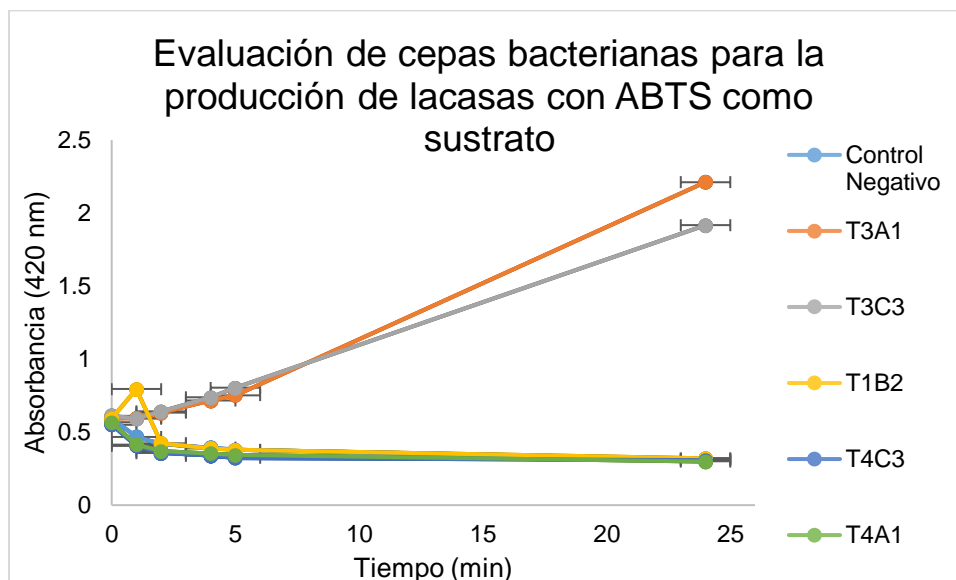


Figura 16. Efecto de la actividad enzimática frente al ABTS del sobrenadante obtenido de los cultivos de cepas bacterianas reactivadas.

Diversos reportes de la literatura han encontrado una relación de la producción de enzimas lacasas con el estrés del microorganismo en un medio de cultivo, ya sea por exposición a solventes(Wu et al., 2019), la presencia de contaminantes que actúen como sustratos(Gayosso-Canales, 2007), o porque se encuentran en la fase estacionaria del cultivo(González-Palma, Varela-Floriano, Sánchez, & Díaz-Godínez, 2008). En este caso, tanto las cepas T3A1 (*B. cereus* f24) y T3C3 (*S. aureus*) pudieron haber entrado en un estrés suficientemente alto como para inducir la producción de lacasas, dada la baja concentración de carbono inicia al ir entrando a la fase estacionaria. Con la finalidad de confirmar el efecto observado en las cepas, se repitió el experimento en las bacterias T3A1 (*B. cereus* f24) y T3C3 (*S. aureus*), observando el mismo resultado (Ver figura 17). Asimismo, el  $\text{CuSO}_4$  pudo haber inducido la producción de lacasas, ya que se ha reportado este fenómeno en hongos (Kuhar & Papinutti, 2014; Zhuo et al., 2017) y en bacterias, como en el trabajo de Muthukumarasamy y colaboradores(Muthukumarasamy

et al., 2015), quienes encontraron que el  $\text{CuSO}_4$  es capaz de incrementar la producción de lacasas en *Bacillus subtilis* MTCC 2414.

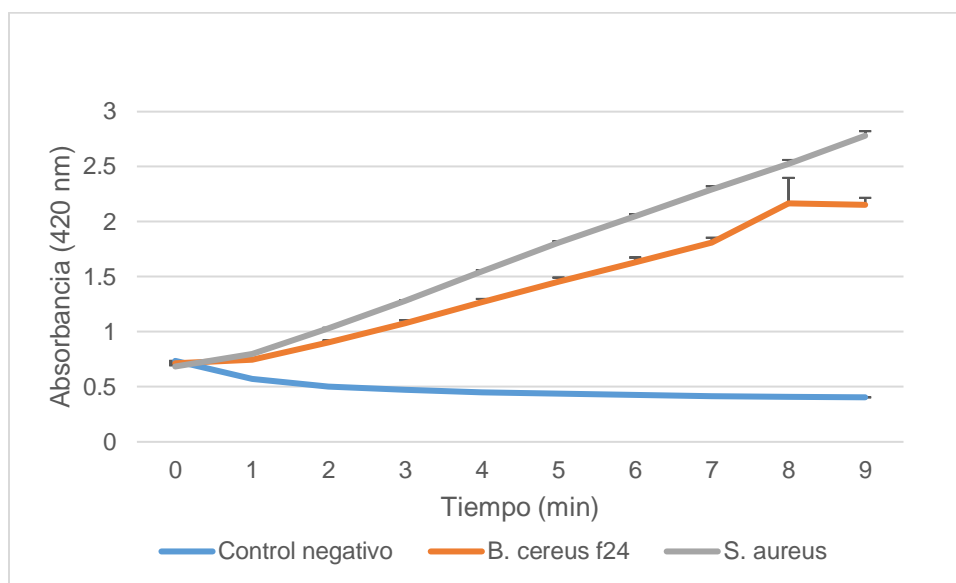


Figura 17. Efecto de la actividad enzimática frente al ABTS del sobrenadante obtenido de los cultivos de *B. cereus* f24 y *S. aureus*

La actividad enzimática calculada para T3A1 (*Bacillus cereus* f24) fue de 1,583 U/L y 1,907 U/L para T3C3 (*S. aureus*). Siendo que la cepa de *S. aureus* presentó mejor actividad, está bacteria fue elegida para continuar con los siguientes experimentos. Cabe destacar que los extractos enzimáticos fueron centrifugados a 14,000 rpm/10 min y filtrados con filtros microbiológicos con tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ , con el fin de separar las células del extracto enzimático, ya que es un microorganismo patógeno oportunista, con una dosis infectiva mínima de 100,000 UFC/g de alimento (Bertó-Navarro, 2015; Piñeros, 2015), por lo que, si se filtra el extracto enzimático con un tamaño de poro menor a 0.8  $\mu\text{m}$ , se reduciría drásticamente el riesgo de exponerse a esta bacteria, eliminándola o reduciéndola en cantidad de tal manera que no sean suficientes células para causar enfermedad. También, sería más seguro si se someten el extracto enzimático a un proceso de purificación más exhaustivo que el que se llevó a cabo en este trabajo, para asegurarse de que se estén inmovilizando únicamente enzimas lacasas sin otro tipo de

contaminantes, como otro tipo de proteínas y células. La concentración de *S. aureus* se puede comprobar fácilmente por técnicas microbiológicas clásicas como cuenta en placa (Ramírez-Gama, Urzúa-Hernández, Camacho-Cruz, Tsuzuki-Reyes, & Esquivel-Cote, 2015).

### 6.1.3 Cinética de crecimiento y actividad enzimática específica

Dado que la bacteria T3C3 (*S. aureus*), tuvo un mejor comportamiento en la producción aparente de enzimas lacasas, esta fue inoculada nuevamente en 10 ml del caldo de producción propuesto por Sondi *et al.* (2015) (Sondhi *et al.*, 2015). El cultivo se mantuvo en agitación durante 96 horas a 37°C y 110 rpm. Durante este periodo de incubación se tomaron alícuotas para medir la densidad óptica del cultivo a 600 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Cary 50, con la finalidad de realizar una curva de crecimiento de la cepa. Así mismo, las alícuotas fueron analizadas para la evaluación de su actividad enzimática de acuerdo con la metodología previamente descrita por Zhang *et al.* (2018) (Z. Zhang *et al.*, 2018) y para la cuantificación de proteína en los extractos enzimáticos de acuerdo con el método de Bradford (BioRad, n.d.).

El crecimiento bacteriano en la curva trato de ser registrado cada 2 horas (sujeto a la disponibilidad y logística del CIBYN). En la figura 18 se puede observar la curva de crecimiento del microorganismo, donde es visiblemente notable que se necesitó de cerca de 72 h para alcanzar su máximo crecimiento, lo cual puede estar relacionado al estrés de la bacteria debido a la baja concentración de nutrientes.

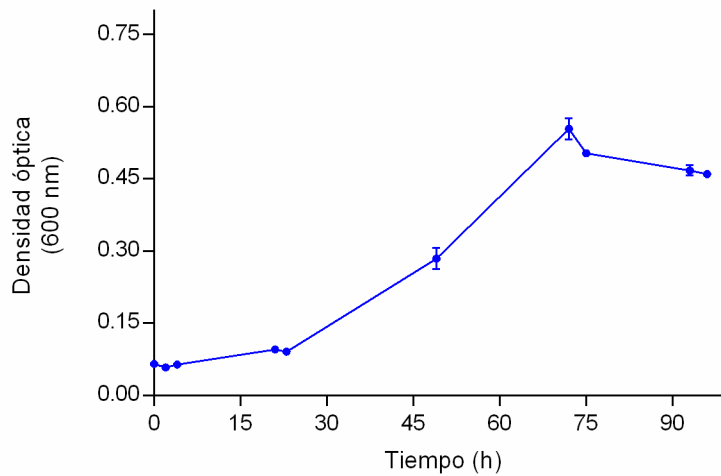


Figura 18 Curva de crecimiento de la bacteria *S. aureus* T3C3

El sobrenadante obtenido del cultivo fue evaluado frente al sustrato ABTS, ampliamente empleado en la cuantificación de la actividad enzimática (Chan-Cupul, Heredia-Abarca, & Rodríguez-Vázquez, 2016; González-Palma et al., 2008; Liu, Zhou, Wu, Sun, & Chen, 2015; M. M. Rodríguez-Delgado et al., 2015; M. Rodríguez-Delgado et al., 2016). La medición se realizó por medio espectrofotometría UV-Vis, de acuerdo con el protocolo establecido por Zhang *et al.* (2018)(Z. Zhang et al., 2018).



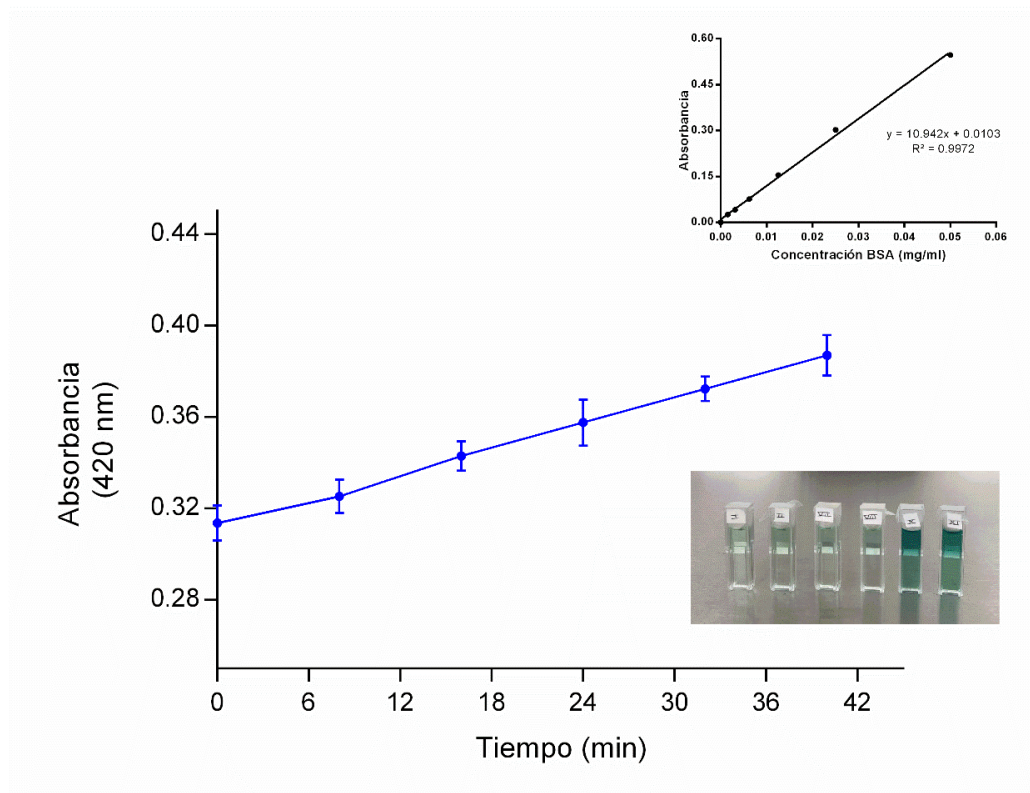


Figura 19 Actividad enzimática de sobrenadante frente a ABTS y curva de calibración de BSA para cuantificación de proteínas.

La actividad enzimática se calculó para el sobrenadante del cultivo muestreado a las 24, 48, 72 y 96 h. Sin embargo, ningún resultado de actividad se logró observar en los sobrenadantes de las primeras 72 horas. Por el contrario, fue a las 96 horas que se obtuvo el valor máximo de actividad de  $33.4 \text{ U mg}^{-1}$  (Figura 19), cuyo valor fue mejor que el reportado por Sondhi *et al.* (2015)(Sondhi et al., 2015), estudio tomado como base para la realización de este experimento. En dicho trabajo, se obtuvo una actividad enzimática de  $10.52 \text{ U mg}^{-1}$  en el sobrenadante después de 96 horas. Por otro lado, Yasar *et al.* (2019)(Yasar, Guven, Guduk, & Aktas, 2019), reportó que la actividad enzimática de lacasas en el extracto crudo producido por *Bacillus subtilis* LP2 fue de  $260.3 \text{ U/mg}$  (Yasar et al., 2019), siendo un resultado superior a lo obtenido en nuestro estudio.

#### 6.1.4 Purificación parcial y semi caracterización de las enzimas con actividad lacasa (pH, temperatura e inhibidores)

Una vez que se obtuvo el sobrenadante (extracto enzimático) del medio de cultivo de *S. aureus* T3C3, este fue sometido a una purificación parcial mediante cromatografía de exclusión por tamaño y posteriormente por cromatografía de intercambio iónico.

La cromatografía por exclusión de tamaño se realizó en una columna con silica gel “60 GF254” usando como fase móvil un buffer de acetatos 0.1M a pH 5. En este punto, 11 fracciones de 1 mL fueron recolectados. Cada fracción obtenida fue analizada para determinar su actividad enzimática frente a ABTS como sustrato, así como el contenido de proteínas.

Como puede observarse en la figura 20, únicamente la fracción 5 (F5) mostró un aumento significativo en la absorbancia monitoreada a 420 nm, característica de la oxidación del ABTS por acción de enzimas del tipo lacasa. Las demás fracciones mostraron actividad despreciable o incluso mostraron actividad tipo peroxidasa (disminuyó la absorbancia). Por otro lado, la fracción 5 resultó tener una concentración de proteína correspondiente a 0.201 mg/ml, de acuerdo con lo obtenido en la determinación de Bradford (Ver Tabla 6), resultando en una actividad enzimática de 244.8 U/mg.

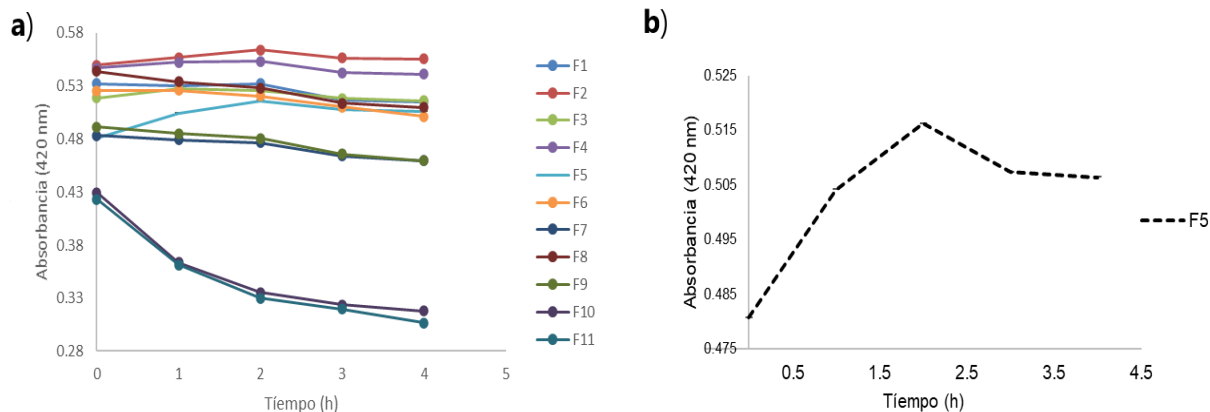


Figura 20. (a) Actividad enzimática de las fracciones recuperadas en la purificación con Sílica Gel 60 GF254 y (b) actividad enzimática de la fracción 5

Tabla 6. Concentración de enzimas en las fracciones purificadas con Sílica Gel 60 GF254 de la cepa T3C3.

Fracción	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
mg/mL	0.264	0.392	0.221	0.171	0.201	0.032	0.01	0.105	0.196	0.324	0.002

Posteriormente, la fracción 5, cuya actividad enzimática del tipo lacasa fue la más sobresaliente, se hizo pasar por una columna de intercambio aniónico (sefarosa-DEAE), utilizando un buffer acetato de sodio 0.1 M, pH 5, con un gradiente de NaCl de 0.05 a 0.30 M. En este punto se recolectaron 32 fracciones de 1 ml para su cuantificación de actividad enzimática y concentración de proteínas por medio del ensayo de Bradford.

Como puede observarse en la Tabla 7 la fracción 7 fue la que tuvo mayor actividad específica  $499 \pm 14.05$  U/mg.

Tabla 7. Actividad enzimática específica de las lacasas de T3C3 purificadas por cromatografía en columna con Sefarosa-DEAE.

Concentración de NaCl del búffer (M)	Actividad específica U/mg	Concentración de NaCl del búffer (M)	Actividad específica U/mg
0.1	0	0.2	$2 \pm 0.03$
0.1	0	0.2	$1 \pm 0.01$
0.1	0	0.2	$6 \pm 0.00$
0.1	0	0.2	0
0.1	0	0.25	0
0.1	$7 \pm 0.01$	0.25	$4 \pm 0.79$

0.1	499±14.05	0.25	0
0.1	0	0.25	3±0.22
0.1	24±1.5	0.25	0
0.1	0	0.30	0
0.15	3±0.31	0.30	0
0.15	11±0.08	0.30	1±0.31
0.15	0	0.30	0
0.15	0	0.30	0
0.15	0	0.5	0
0.20	0	0.5	0

En este punto la actividad enzimática específica de la enzima con actividad del tipo lacasa producida por *S. aureus* fue comparada con la enzima lacasa de *Rhus vernicifera* obtenida comercialmente de la compañía Sigma -Aldrich, mostrando mayor actividad la enzima producida en nuestro laboratorio (ver Tabla 8).

Tabla 8. Comparación entre la actividad enzimática de lacasas comerciales y lacasas de *S. aureus*.

<b>Enzima</b>	<b>Actividad específica (U/mg)</b>
Lacasa comercial	191±5.1
Lacasa de <i>S. aureus</i>	499±14.0

En la tabla 9 se puede observar que el proceso de purificación aumentó la actividad específica de las lacasas de *S. aureus*, con porcentaje de rendimiento final de 67% y que un incremento en la pureza en 14.9 veces.

Tabla 9. Tabla de purificación de lacasas de *S. aureus*.

Etapa	Volumen (ml)	Proteína (mg/mL)	Actividad relativa U/mL	Proteína Total (mg)	Actividad relativa total (U)	Actividad específica U/mg	Porcentaje de Rendimiento (%)	Incremento en la purificación
Extracto crudo	5	0.36	12.6	1.8	60.2	33.4	100	1
Sílica Gel 60 GF254	1	0.201	49.2	0.201	49.20	244.8	82%	7.3
Sefaros a-DEAE	1	0.081	39.9	0.081	40.44	499.3	67%	14.9

Finalmente, la enzima semipurificada, fue sometida a un proceso de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (ver Figura 21), donde se observó la presencia de proteínas de distintos pesos moleculares, que pudieran corresponder a las observadas en las fracciones mostradas en la tabla 10, siendo la más abundante aquella de peso molecular alrededor de 35 kDa. Lo anterior nos indica que es necesario realizar un proceso de purificación más exhaustivo, principalmente en la columna de exclusión de tamaño, debido a que esta separación fue ineficiente bajo las condiciones empleadas, lo cual es confirmado por el bajo nivel de purificación obtenido (Tabla 9). Por otro lado, dada la cercanía de algunas bandas en el gel de electroforesis, así como la actividad del tipo lacasa frente al ABTS de distintas fracciones, no se descarta la posibilidad de encontrar isoformas de la enzima. Tal como es el caso reportado por Roger Pezet (1998)(Pezet, 1998), acerca del hongo *Botrytis cinerea*, que mostró la producción de 2 isoformas con puntos isoeléctricos de 4.35 y 4.3. También se han reportado múltiples isoformas en otras especies de hongos, como *Trametes versicolor* reportado en el trabajo de Bertrand y colaboradores (2015)(Bertrand et al., 2015). Esta variabilidad de isoformas en una misma especie podría dar flexibilidad al organismo para adaptarse a un medio ambiente cambiante(Bertrand et al., 2015). Las lacasas suelen tener pesos moleculares en un rango de 50-70KDa(Arregui et al., 2019), como las reportadas por Muthukumarasamy y colaboradores (2015)(Muthukumarasamy et al., 2015) en *Bacillus subtilis*, las cuales,

dependiendo del sustrato sobre el que crecían, tenían pesos moleculares de 52 KDa y 55 KDa. Chefetz y colaboradores (1998)(Chefetz, Chen, & Hadar, 1998) reportaron una lacasa de 77 KDa en el hongo *Chaetomium thermophyllum*.

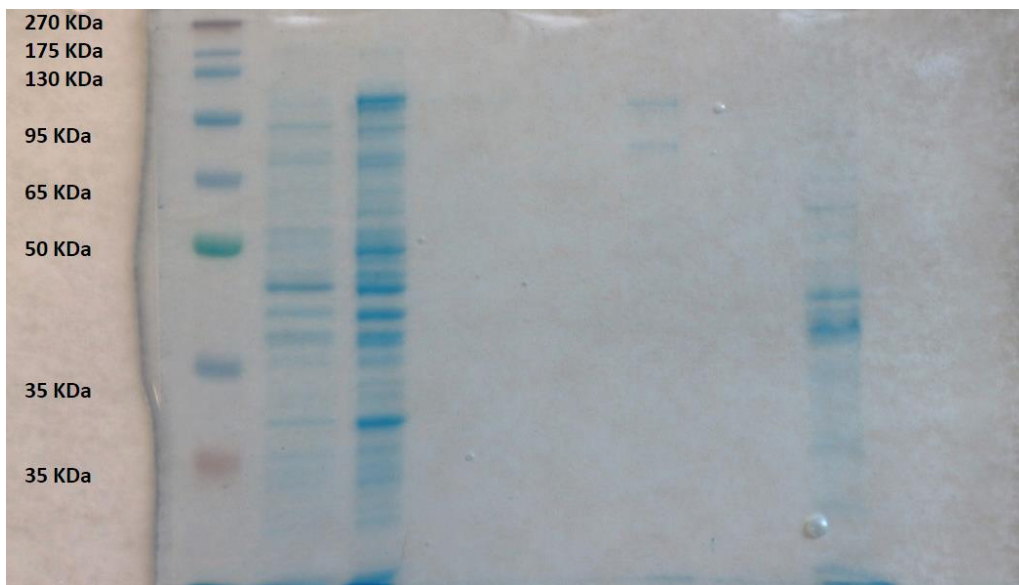


Figura 21. Electroforesis SDS-PAGE de las lacasas de *S. aureus* (último carril de la derecha) después del proceso de semipurificación.

Por otro lado, con la finalidad de conocer la estabilidad de las enzimas con actividad lacasas, producidas por la bacteria *S.aureus* (T3C3), se planteó un diseño de experimentos exploratorio, de tipo factorial, donde se probaron tres temperaturas (25, 42.5 y 60 °C) y tres pH diferentes (8, 5.5 y 3). Los resultados del ensayo realizado a partir de las seis condiciones establecidas por el diseño de experimentos se pueden observar en la Tabla 10.

Tabla 10. Resultados del diseño de experimentos para encontrar pH y temperatura óptimos de las lacasas de *S. aureus* (n=3).

Número de ensayo	pH	Temperatura	Actividad enzimática U/L	Concentración de proteína mg/L	Actividad enzimática específica U/mg
1	8	25	308.33±11	36.23±0.03	8.51± 0.095
2	5.5	42.5	215.83±11	36.23±0.03	5.96± 0.067
3	3	25	616.67±0	36.23±0.03	17.02± 0.0
4	8	60	308.33±0	36.23±0.03	8.51± 0.0
5	3	60	616.67±15	36.23±0.03	17.02± 0.26
6	5.5	42.5	185±10	36.23±0.03	5.11± 0.05

Tabla 11. Análisis de Varianza del Diseño Factorial

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	4	142.206	35.5515	98.17	0.076
Lineal	2	72.431	36.2155	100.00	0.071
pH	1	72.431	72.4310	200.00	0.045
Temperatura	1	0.000	0.0000	0.00	1.000
Interacciones de 2 términos	1	0.000	0.0000	0.00	1.000

pH*Temperatura	1	0.000	0.0000	0.00	1.000
Curvatura	1	69.775	69.7752	192.67	0.046
Error	1	0.362	0.3622		
Total	5	142.568			

Como puede observarse en la Tabla 11 y la Figura 22, el factor que tuvo más impacto sobre la actividad enzimática, fue el pH, ya que, según el ANOVA, fue el único Factor que tuvo un efecto significativo, con un valor de  $p=0.045$ . Se puede observar también que las enzimas fueron activas en un rango de pH de 3 a 8, pero los valores de actividad más altos se observaron en un rango de 3 a 5, con una actividad máxima a pH 3. Por otra parte, la temperatura no tuvo un efecto significativo, lo cual se puede observar en la tabla 10, donde los experimentos con valores de pH iguales tuvieron resultados muy similares, independientemente de la temperatura, la cual tuvo un valor de  $p=1.0$  (ver tabla 11), por lo que no es un factor relevante. Por ello, las enzimas mostraron su mayor actividad a pH 3, con una zona de máxima actividad en un rango de  $50^{\circ}$ - $60^{\circ}$ C y otra zona en un rango de temperatura de  $25^{\circ}$ - $35^{\circ}$ C. Esto corrobora que, el comportamiento de estas enzimas depende principalmente del pH y no de la temperatura. El hecho de que se encontraron dos zonas con máxima actividad puede deberse a la mezcla de enzimas con actividad tipo lacasa que aparentemente están presentes en la muestra y que fueron evidenciadas en el gel de poliacrilamida. Para poder confirmar este punto es necesario es necesario realizar una purificación de las enzimas más exhaustiva. También sería útil realizar un diseño de experimentos con más corridas y con rangos de pH y temperatura más amplios, para así conocer con más detalle el comportamiento de las enzimas, ya que el diseño fue sólo de tipo exploratorio y no se determinaron las condiciones óptimas, es decir, sólo nos proporciona una idea de las condiciones donde se podría encontrar su máxima actividad. También se sugiere realizar más réplicas del punto central, ya que entre los resultados de las réplicas hubo un coeficiente de variación de 10.86%.



Aunque las lacasas bacterianas suelen tener valores de pH óptimos en un rango de neutro a alcalino, con valores de pH hasta de 8 y 9(Arregui et al., 2019; Sondhi et al., 2015; A. Verma, 2016), las lacasas producidas por *S. aureus* tuvieron mejor actividad después de incubarse a pH ácido, actuando de manera similar a las lacasas de hongos, las cuales suelen tener mayor actividad a pH ácido(Arregui et al., 2019). La estabilidad de las enzimas bajo distintas condiciones puede deberse al patrón de glicosilación, que en hongos suele ser de 10-25% y en bacterias suele ser del 22-45%(Arregui et al., 2019). Se ha reportado que al incrementar la N-glicosilación de enzimas como la arilsulfatasa-A humana puede incrementar la estabilidad a pH ácido(Farias-Virgens, Pol-Fachin, Verli, & Saraiva-Pereira, 2014), en las xilanasas les confiere un rango de adaptación a pH más amplio, mayor actividad específica y mejor estabilidad termal y a distintos valores de pH(Chang et al., 2017). En las pepsinas aumenta la resistencia a pH bajo(Niu et al., 2016)

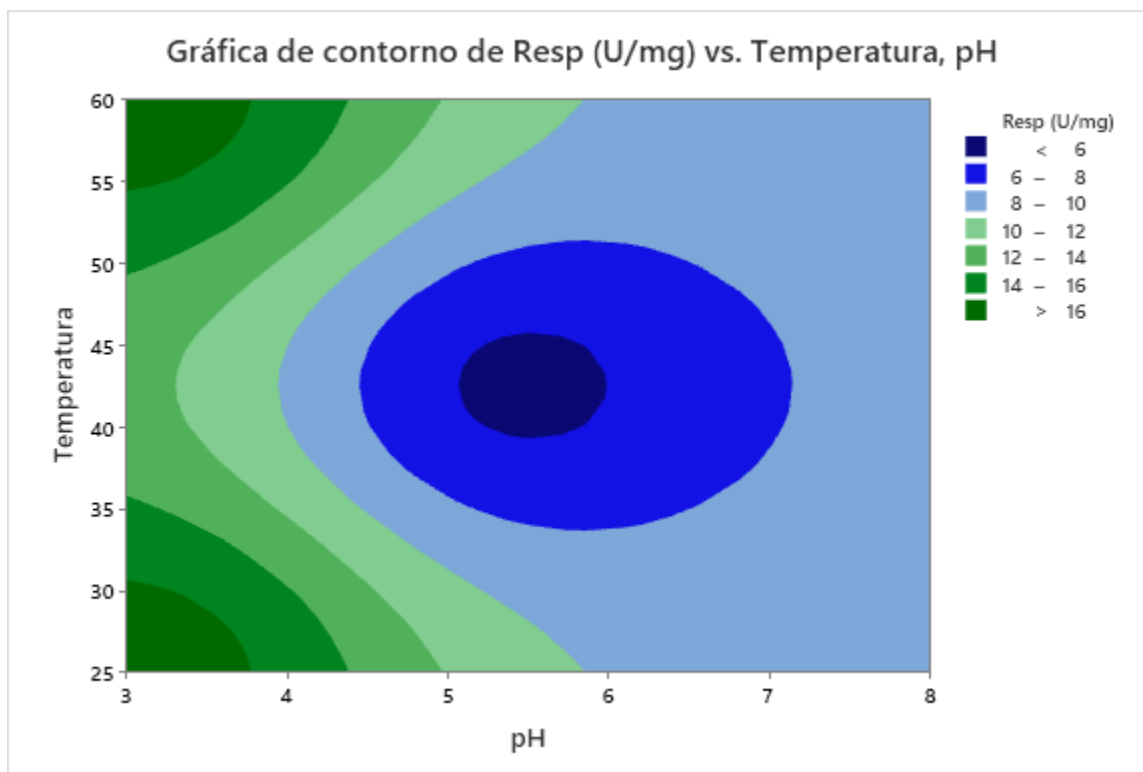


Figura 22. Gráfica de superficie de respuesta de la estabilidad de enzimas tipo lacasas de *S. aureus* a diferentes condiciones de pH y temperatura.

Finalmente, las enzimas también fueron sometidas a diferentes concentraciones de compuestos establecidos por la literatura como inhibidores. Para lo anterior, se empleó la metodología reportada por Chefetz y colaboradores (1998)(Chefetz et al., 1998) y Bollag y Leonowicz (1984)(Bollag & Leonowicz, 1984), en la cual, una alícuota de enzimas (10% v/v) fue adicionada a tres concentraciones de EDTA: 0.5 mM, 1.75 mM y 3 mM; tres concentraciones de NaCl: 40, 100 y 200 mM y 3 concentraciones de metanol: 10, 30 y 60% v/v. Los resultados del efecto de distintos tipos de inhibidores sobre la actividad enzimática pueden ser observados en la Tabla 12.

Tabla 12. Actividad enzimática de lacasas de *S. aureus* bajo los efectos de distintos inhibidores (n=2).

Muestra	Actividad enzimática U/mL	Actividad enzimática U/L	Concentración de proteínas mg/L	Actividad enzimática Específica U/mg	Porcentaje de actividad
Enzima sin inhibidor	0.62.001	616.67±1.0	36.2±0.03	21.13±0.02	100±0.10
EDTA 0.5	0.17±0.0	166.67±0.0	36.2±0.03	4.60±0.00	21.77±0.0
EDTA 1.75	0.08±0.0	83.33±0.0	36.2±0.03	2.30±0.00	10.89±0.0
EDTA 3.0	0.083±0.0	83.33±0.0	36.2±0.03	2.30±0.00	10.89±0.0
Cl <sup>-</sup> 200mM	0±0.0	0±0.0	36.2±0.03	0±0.00	0±0.0
Cl <sup>-</sup> 100mM	0±0.0	0±0.0	36.2±0.03	0±0.00	0±0.0
Cl <sup>-</sup> 40mM	0±0.0	0±0.0	36.2±0.03	0±0.00	0±0.0
Metanol 10%	0.19±0.0	194.44±0.0	36.2±0.03	5.37±0.00	25.40±0.0
Metanol 30%	0±0.0	0±0.0	36.2±0.03	0±0.00	±0.0
Metanol 60%	1.39±0.0	1388.89±0.0	36.2±0.03	38.34±0.00	181.43±0.0

Como puede observarse, las lacasas mostraron actividad en todas las concentraciones de EDTA, teniendo mayor actividad en la concentración más baja (0.5 M) y sin mostrar diferencias en las concentraciones más altas (1.75M y 3.0M). La tolerancia al EDTA fue

mucho mayor que la que se ha reportado en otros trabajos, como en especies de hongos tales como *B. cinerea*, *F. annosus*, *P. mutabilis*, *P. ostreatus*, *P. anserina*, *R. praticola* y *T. versicolor*, las cuales muestran inhibición a concentraciones de EDTA de 3mM(Bollag & Leonowicz, 1984; Rodríguez-Couto & Toca, 2006).

En lo que respecta a los cloruros, las enzimas libres de *S. aureus* presentaron inhibición en todas las concentraciones probadas (40 mM. 100 mM y 200mM), esto podría atribuirse a que los cloruros y otras sales incrementan la fuerza iónica y modifica las interacciones electrostáticas de las enzimas, interfiriendo en la interacción entre la enzima y el sustrato(Rodríguez-Couto & Toca, 2006).

Por otro lado, con respecto a la adición de metanol en concentraciones del 10-30% se ha reportado que puede haber incremento en la actividad de las lacasas(Al-Adhami, Bryjak, & Greb-Markiewicz, B. Peczyńska-Czoch, 2002; Rodríguez-Couto & Toca, 2006) (ver Figura 23). En este sentido, Wu(Wu et al., 2019) y colaboradores encontraron que lacasas D-Lac de hongos mostraron su mayor actividad tras incubarse con metanol a una concentración de 10% v/v y a concentraciones mayores su actividad disminuía ligeramente. En el citado estudio, los autores mencionaban que las proteínas se desplegaban durante la incubación y se volvían a plegar, mostrando un incremento en su actividad. Por lo anterior, se sugiere que el incremento en la actividad observado en las enzimas producidas en nuestro estudio, pudiera ser ocasionado por un plegamiento distinto después de incubarse con metanol al 60%.

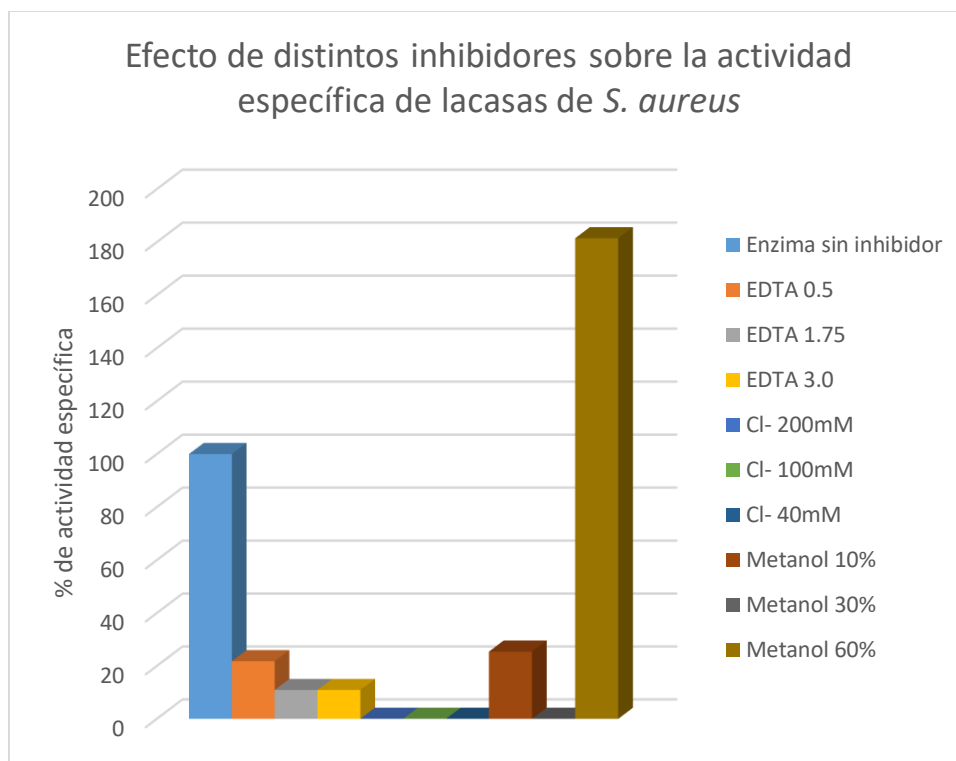


Figura 23. Efecto del EDTA, Cl<sup>-</sup> y metanol sobre la actividad de enzimas tipo lacasas de *S. aureus*.

## 6.2 Evaluación cualitativa de la actividad catalítica de las enzimas libres en presencia de los analitos

Para llevar a cabo el análisis, se preparó una solución constituida por 100 ppm de cada analito (ácido okadaico y clorofeno), 10% (v / v) de buffer de acetatos 0.1 M (pH 4.5) y 100 U/mg de enzima. La prueba consistió en evaluar los cambios en los espectros de absorción de cada analito, los cuales serían atribuidos al efecto de la presencia de las enzimas, evidenciando la posible interacción entre la enzima y la estructura del analito.

En la Figura 24 se observa un ligero decremento en el pico de absorción del clorofeno (285 nm), lo cual se puede atribuir a los grupos funcionales OH<sup>-</sup> de los difenoles que puede oxidar la lacasa (Arregui et al., 2019). Lo anterior concuerda con el estudio de Alver y Metin (2017) (Alver & Metin, 2017), quien demostró la capacidad de la enzima lacasa para oxidar el fenol, logrando una degradación del 80%. Mientras que, para el caso del

ácido okadaico, se observan cambios en el espectro de absorción, donde se observa la aparición de nuevos picos y valles, lo cual sugiere que sí existe interacción entre la lacasa y el ácido okadaico, dada la estructura.

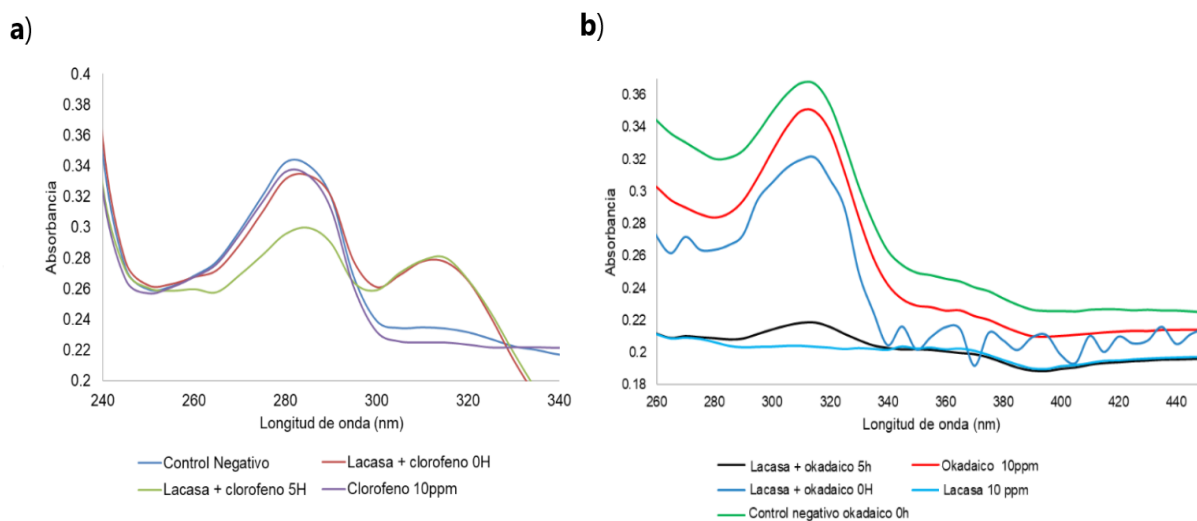


Figura 24. Análisis UV-vis del tratamiento enzimático en una solución de 100 ppm de (a) clorofeno y (b) ácido okadaico

### 6.3 Inmovilización de las enzimas con actividad lacasa en sustratos de oro.

El proceso de inmovilización de las enzimas se realizó a través de la funcionalización de un chip de oro (film de 50 nm), con alcanotioles, los cuales sirven como puente de unión entre el oro y el bioreceptor. Una vez transcurridas 12 horas de incubación, los alcanotioles son activados a través del proceso con los entrecruzantes EDC / NHS, quienes forman ésteres de carboimida que unen a la enzima mediante un enlace amida.

Durante las etapas del proceso de inmovilización, el chip de oro fue sometido a la toma de micrografías en corte transversal, mediante un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-7800F. Lo anterior permitió observar cambios en el grosor de la superficie del film de oro, así como algunas irregularidades que se atribuyen a la unión secuencial de las moléculas que conformaron el proceso de inmovilización. Así mismo, se realizó

un análisis EDS mediante mapeo elemental de la superficie del chip, a lo largo de la inmovilización. Como se puede observar en la Figura 25, antes del comienzo del proceso de funcionalización (chip de oro desnudo), el grosor del film era cercano a los 50.6 nm, sin embargo, posterior a la funcionalización con alcanotioles el ancho se vio incrementado, finalizando con un grosor entre 58 - 71 nm al término de la inmovilización con la enzima. Además, se puede observar cómo va disminuyendo el porcentaje de Au conforme va quedando cubierta la superficie del chip con alcanotioles, lo que provoca la aparición de átomos de S y aumento en la cantidad de C, para finalmente observar la presencia de N una vez terminada la inmovilización. Las irregularidades de las capas pudieran estar relacionados a la formación de sistemas multicapa, que pueden ser ocasionados cuando existe exceso de entrecruzante (EDC/NHS) que favorecen la unión enzima-enzima entre los amino y carboxilos presentes en los aminoácidos de las enzimas (Yang, Wang, Zhao, Sun, & Sun, 2006), lo cual también puede involucrar inactivación enzimática (decaimiento de actividad).

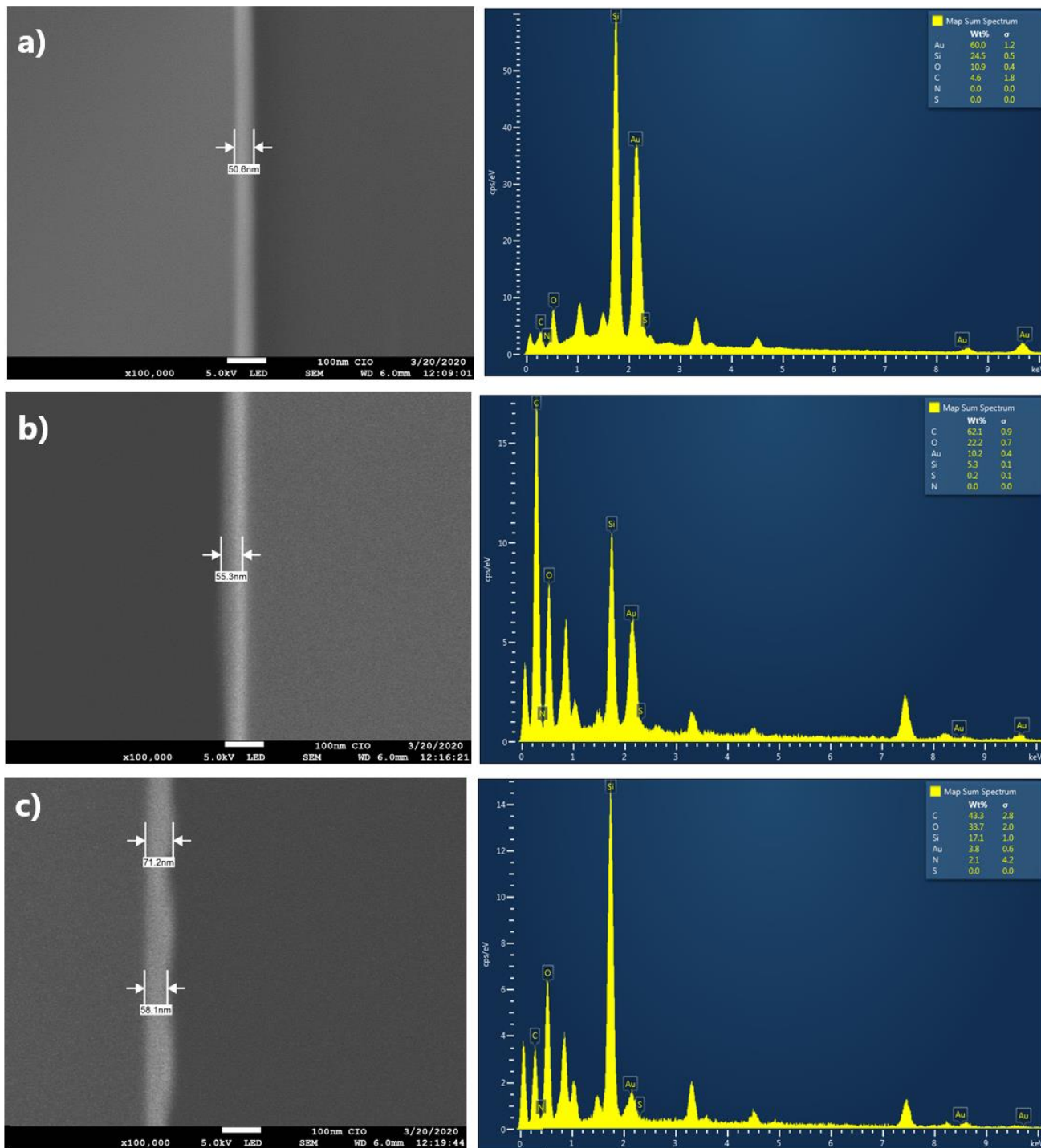


Figura 25. Imagen SEM del corte transversal de un chip y análisis EDS mediante mapeo elemental de superficie en (a) chip sin tratar, (b) chip funcionalizado con alcanotrioles y (c) chip posterior al proceso de inmovilización.

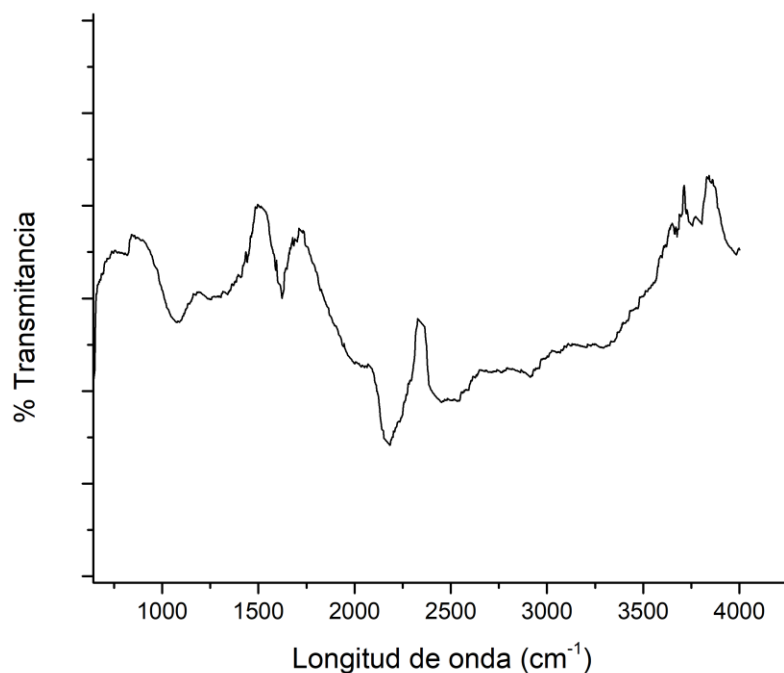


Figura 26 Análisis FT-IR de un chip de oro sometido al proceso de inmovilización

Finalmente, los chips inmovilizados se caracterizaron por FT-IR, obteniendo bandas características de aminas primarias a  $1,580\text{ cm}^{-1}$  (N-H, *bending*),  $3,500$  (N-H, *stretching*), y ácidos carboxílicos a  $1760\text{ cm}^{-1}$  (C=O, *stretching*) las cuales se atribuyen a los aminoácidos de las enzimas inmovilizadas. Sin embargo, también se encontró una señal a  $2,120\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al grupo carbodiimida (N=C=N, *stretching*) así como una banda característica de tioles a  $2550\text{-}2600\text{ cm}^{-1}$  (S-H, *stretching*), lo cual se infiere es debido a que quedaron sitios activos en los que no se unió la proteína, quedando libres. Ya que, la presencia de enlaces N=C=N está presente en la molécula 1-etil-3(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), empleada como entrecruzante.



#### **6.4 Evaluación de la actividad catalítica de la enzima inmovilizada.**

Posterior a la inmovilización, se efectuó la estimación de la actividad enzimática de las lacasas inmovilizadas. Por lo cual, se tomó como referencia el valor de la actividad de las enzimas libres, empleadas en la inmovilización. El resultado de la actividad enzimática específica de las enzimas inmovilizadas fue de 97 U/mg, por lo tanto, se estima una pérdida en el 48.5% en la actividad con respecto a la actividad inicial (enzimas libres). La pérdida de la actividad enzimática posterior a una inmovilización es comúnmente relacionado al bloqueo del sitio activo de la enzima durante el proceso de unión, ya que las inmovilizaciones no están orientadas y ocurren de manera aleatoria (Talbert & Goddard, 2012), por lo cual tener un decaimiento es esperado. Por ejemplo, Fan y colaboradores (2017), reportaron una pérdida del 40% en la actividad de enzimas esterasas inmovilizadas en sílice, basado en un método de inmovilización a través de enlaces covalentes, al igual que en nuestro trabajo (Fan, Liang, Li, Li, & Liu, 2017).

#### **6.5 Detección de analitos de interés a través de un biosensor enzimático basado en la técnica de SPR**

El análisis de la biotoxina ácido okadaico y el contaminante emergente clorofeno, se realizó mediante el uso de un sistema de resonancia superficial de plasmones (SPR), empleando como bioreceptor enzimas con actividad lacasa inmovilizadas sobre un chip de oro.

Una vez montado el chip en el equipo (ver figura 27), se realizó un barrido angular que permite observar experimentalmente el ángulo crítico (ángulo al que incide el haz de luz sobre el chip, generando el fenómeno de resonancia superficial de plasmones).

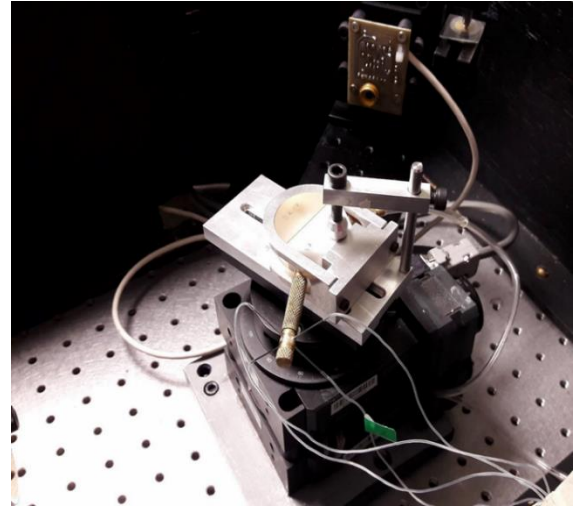
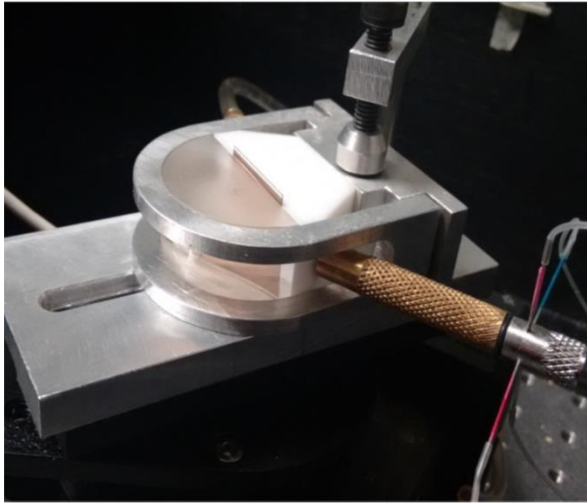


Figura 27. (a) Montaje del chip en la celda biosensor y (b) montaje de la celda de sensado en el equipo.

En la figura 28, se puede observar cómo ocurren desplazamientos en el ángulo crítico conforme se realizaron las etapas de inmovilización. Lo anterior debido a que, cualquier cambio de masa sucedido sobre la superficie del material va a desplazar al ángulo crítico, (para este caso es debido a la adición de moléculas durante el proceso de inmovilización).

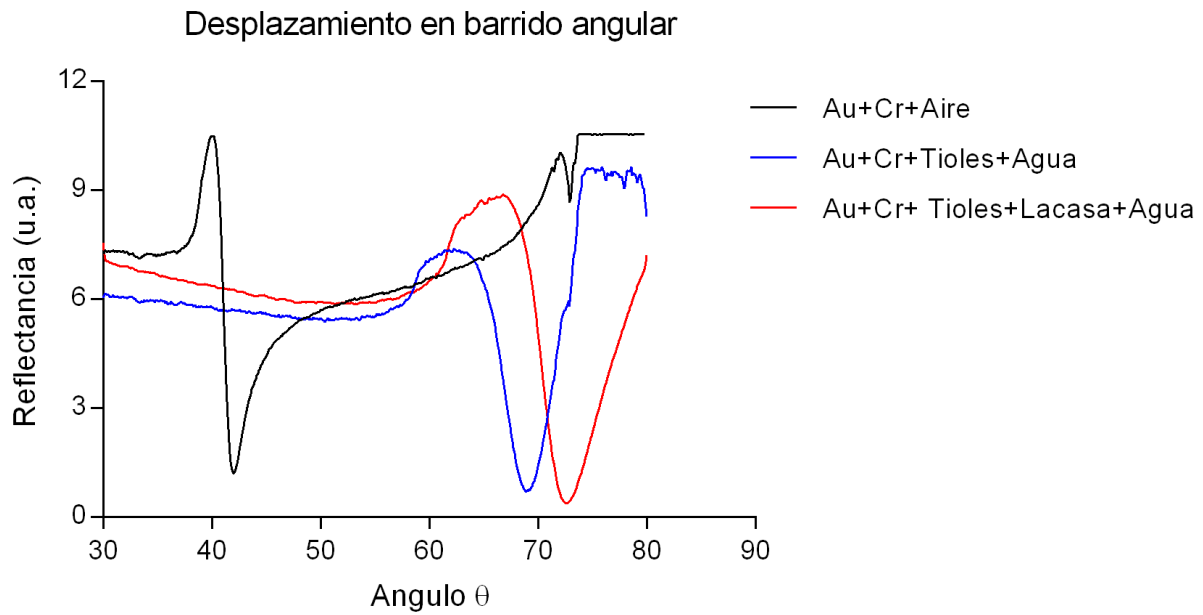


Figura 28. Desplazamiento del ángulo crítico conforme se van acumulando compuestos sobre la superficie del chip de oro.

Lo anterior también se puede apreciar cuando realizamos el monitoreo de la inmovilización a ángulo fijo, lo cual se aprecia en la Figura 29, donde es visible el aumento en la intensidad de la señal, conforme se adicionan los reactivos de inmovilización.

## Inmovilización a Ángulo Fijo (Tiempo Real)

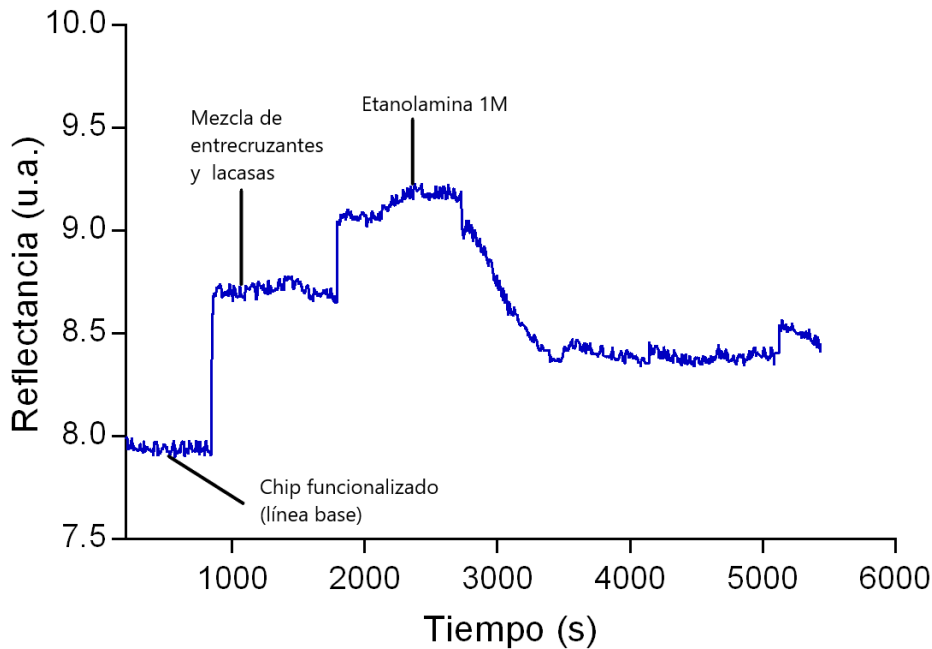


Figura 29. Proceso de inmovilización monitoreado en tiempo real

Una vez finalizado el proceso de inmovilización y habiendo fijado el ángulo de trabajo al que ocurrirá la medición, una serie de muestras seriadas fueron inyectadas sobre el chip. Las muestras fueron preparadas en un rango de concentración de analito (ácido okadaico o clorofeno) de 0 a 10 ppm, disueltos en un buffer de fosfatos de potasio a pH 7.3. Cada muestra se inyectó con una velocidad de flujo de 90  $\mu\text{L}/\text{min}$  y todas las mediciones fueron realizadas por triplicado.

La figura 30 muestra la señal promediada de las réplicas del análisis de clorofeno a diferentes concentraciones, así como su curva de calibración. Debido a que las enzimas tuvieron la capacidad de oxidar el clorofeno y utilizarlo como sustrato, fue posible obtener una correlación lineal donde hubo un incremento de la reflectancia directamente proporcional a la concentración del analito.

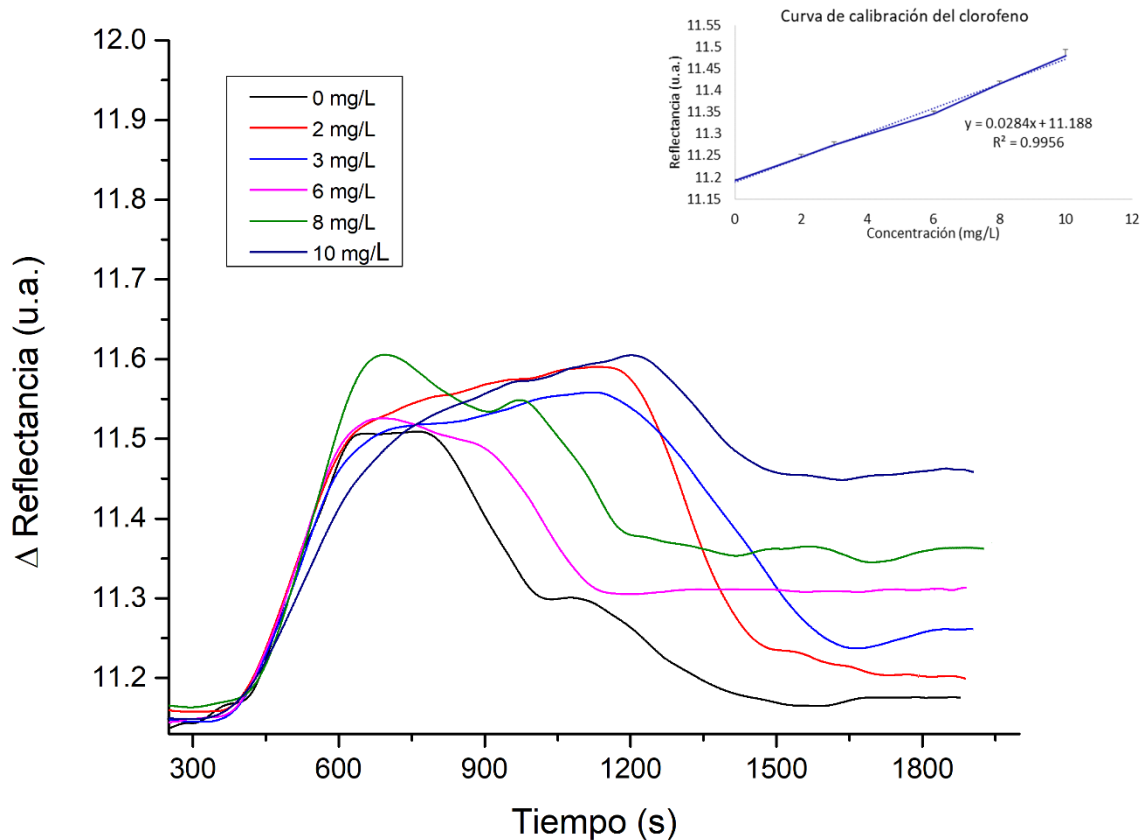


Figura 30. Sensogramas de la detección de clorofeno a diferentes concentraciones con su curva de calibración

Mientras que, la figura 31 muestra la señal promediada de las réplicas del análisis de ácido okadaico bajo diferentes concentraciones. Sin embargo, fue evidente que no se logró obtener una buena correlación lineal en la curva de calibración de dicho analito. Al analizar las señales de la curva de calibrado es posible inferir que a altas concentraciones de ácido okadaico habría mejor linealidad, ya que es evidente que pequeños cambios en la concentración no son posible detectarlos. Sin embargo, usar concentraciones más altas de analito supone una desventaja para el uso de la metodología en aplicaciones

reales, ya que las normas de distintos países tienen límites de detección muy bajos para esta biotoxina, siendo de  $0.16\mu\text{g/g}$  de carne en la Unión Europea(UE, 2005) y en México, la Secretaría de Salud establece como límite  $0.2\mu\text{g/g}$  de carne de moluscos(SSA, 2004) (en muestras previamente sometidas a extracción con solventes). Por lo cual, es necesario realizar más investigación en la mejora de la interacción entre el analito y la enzima, para así favorecer la sensibilidad del método.

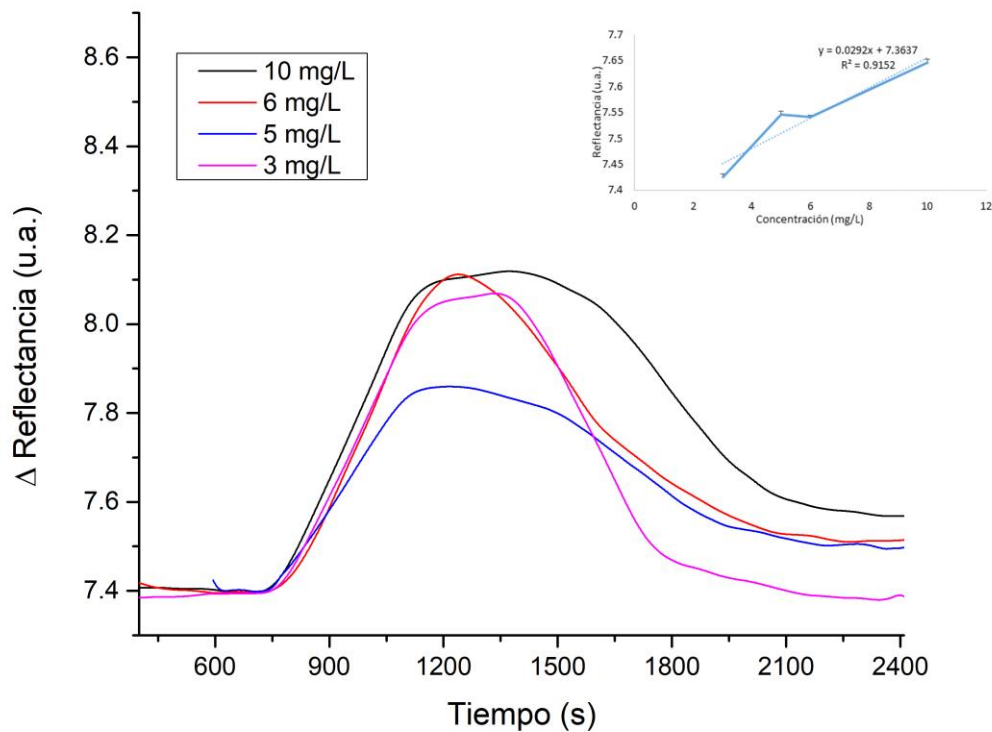


Figura 31. Sensogramas de la detección del ácido okadaico a diferentes concentraciones con su curva de calibración

A modo de comparación, también se realizó el estudio de la detección de clorofeno empleando enzimas comerciales de origen *Rhus verticifera* (Sigma-Aldrich), dando como resultado la curva de calibrado observada en la figura 32.

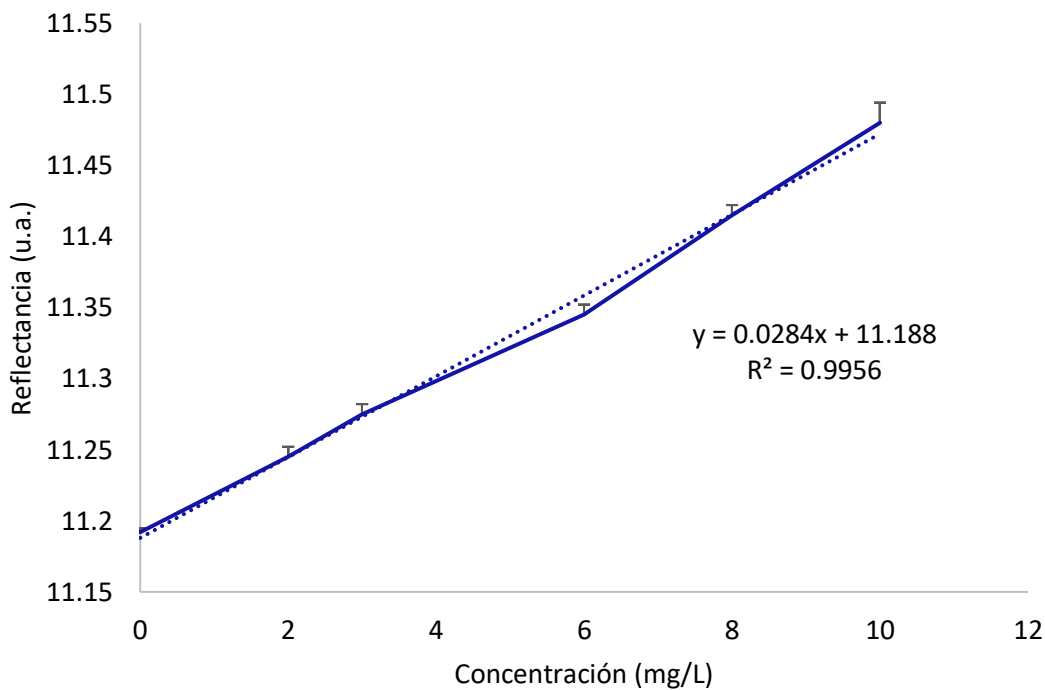


Figura 32. Curva de calibrado del clorofeno empleando lacasa comercial.

La tabla 13 permite observar la comparación de los resultados obtenidos en la medición del clorofeno en una muestra de concentración 3 mg/L, empleando enzimas propias en y comerciales. Estos resultados se analizaron a través de una prueba T de Student, evidenciando que no había diferencias significativas entre ambas técnicas.

Tabla 13. Resultados obtenidos al analizar una muestra de clorofeno 3 mg/L, utilizando enzimas propias y comerciales como bioreceptor.

Origen enzima	Propias	Comerciales
Señal 1	3.06	3.071
Señal 2	3.27	3.07
Tcal=0.81		
Ttab= 4.3		

## 6.6 Evaluación de los parámetros analíticos de la medición por SPR

Mediante la curva de calibración de los analitos, fue posible obtener la sensibilidad del método y los parámetros analíticos.

La curva de calibración del clorofeno presentó una buena correlación lineal ( $R^2=0.9956$ ), lo cual indica que se pueden realizar mediciones confiables en ese rango de trabajo (2-10 mg/L). En la Tabla 14 se pueden observar los parámetros de calidad del método de detección de clorofeno utilizando lacasas comerciales como biorreceptores acopladas a un equipo de SPR.

Tabla 14. Parámetros analíticos (utilizando lacasas comerciales como bioreceptor acopladas a un equipo de SPR).

LOD	0.3 mg/L
LOQ	1.0 mg/L
% Recuperación	102.33 ± 0.01
Resultados prueba T	No hay diferencia significativa (95% de confianza) Tcal= 0.28 Ttab=4.3
Ecuación de la recta	$y=0.0284x+11.188$
R <sup>2</sup>	0.9956
Tiempo de vida del chip con lacasas	6 días a temp. Ambiente sin cambios en la señal. Almacenar en buffer de fosfato de potasio pH 7.0
Ángulo fijo de trabajo (con enzimas ya inmovilizadas)	66.8°
Fuente de luz	Láser Helio-Neón a 632.8 nm

Mientras que los resultados del analíticos usando enzimas propias se muestran en la Tabla 15, donde se pueden hacer comparaciones con los parámetros analíticos de las lacasas comerciales de *Rhus vernicifera*.



Tabla 15. Parámetros analíticos obtenidos con el biosensor de SPR para detectar clorofeno, utilizando enzimas propias y comerciales.

<b>Parámetro</b>	<b><i>S. aureus</i></b>	<b>Comerciales</b>
Rango de la curva	0-6 mg/L	0-10 mg/L
Límite de detección	0.88 mg/L	0.30 mg/L
Límite de cuantificación	2.93 mg/L	1.00 mg/L
R <sup>2</sup>	0.9729	0.9956
% Recuperación	105.33±4.63	102.33 ± 0.01
Ecuación de la recta	y=0.0483x+1.3723	y=0.0284x+11.188

En la Tabla 15 se puede observar que los límites de detección y cuantificación son mejores al utilizar lacasas comerciales. Esto podría deberse a que las lacasas comerciales estaban purificadas, a diferencia de las lacasas propias que se utilizaron semipurificadas. Sin embargo, a pesar de estos inconvenientes, las lacasas propias de *S. aureus* mostraron muy buenos porcentajes de recuperación, lo cual las convierte en una buena competencia para las lacasas comerciales. Es posible que, si se utilizan lacasas de *S. aureus* purificadas y concentradas, los resultados en los LOD y LOQ sean mejorados. También puede observarse que, las lacasas comerciales poseen una mayor correlación lineal y un mayor rango de trabajo, ya que, con las lacasas de *S. aureus*, la curva perdía linealidad a concentraciones mayores a 6 mg/L. Por ello, en las actuales condiciones experimentales, y basándonos en los parámetros analíticos, las lacasas comerciales fueron más adecuadas para detectar el clorofeno. Cabe mencionar que es necesario llevar a cabo una purificación más exhaustiva de las lacasas de *S. aureus*, con el fin de aumentar la sensibilidad del biosensor, ya que las lacasas se encontrarían más concentradas y sin contaminantes que pudieran interferir en su actividad.

Por otro lado, los parámetros analíticos de la detección de ácido okadaico también fueron calculados, obteniendo un rango de trabajo de 3-10 mg/L y un LOD de 2.91 mg/L. Sin embargo, la correlación ( $R^2=0.9152$ ) no era tan buena como con el clorofeno ( $R^2=0.9956$ ), por lo que se descartó el seguir trabajando con el ácido okadaico, ya que

no cumplía con los requerimientos establecidos por la normativa, los cuales son estrictamente necesarios para ser empleado en esta aplicación. Sin embargo, el valor de  $R^2=0.9152$ , indica que el biosensor muestra cierta linealidad, cuya tendencia iba en aumento al interactuar con el analito a altas concentraciones, por lo que no se descarta que si se modificaran algunas condiciones de trabajo, se pudiera mejorar el método.

### 6.7 Caracterización de la muestra real de agua de río

Debido a que es muy común que una muestra real este compuesta por una matriz compleja, que contenga interferencias que afecten la especificidad de un método, se decidió evaluar una muestra enriquecida de agua de río. La muestra de río fue caracterizada con la finalidad de saber sus componentes y si alguno de ellos pudiera causar alguna interferencia en el protocolo de medición de los analitos estudiados.

Los resultados de la caracterización fisicoquímica se pueden observar en la Tabla 16 , donde cabe mencionar que el agua presenta una dureza total de  $220.7 \pm 6.4$  mg/L, lo cual la convierte en un agua muy dura(USGS, 2019). Esta dureza puede deberse a que, al correr el agua a través del suelo, ciertas sales son solubilizadas (como carbonatos, cloruros y sulfatos). Mientras que el carbono orgánico presente pudo provenir de la materia orgánica en descomposición, ya que el sitio de muestreo era un río, y por lo tanto el agua estaba en contacto con tierra y restos de hojas que caían de los árboles.

Tabla 16. Caracterización fisicoquímica de la muestra de agua de río.

Dureza total	Dureza parcial	Dureza por Mg	Acidez	Alcalinidad total	pH	Cloruros	Sulfatos	Carbono orgánico total	Carbono total	Carbono inorgánico
$220.7 \pm 6.4$ mg/L	$151.3 \pm 10.3$ mg/L	$69.5 \pm 3.9$ mg/L	$0 \pm 0$ mg/L	$145.69 \pm 9.81$ mg/L	$8.05 \pm 0.07$ mg/L	$10.99 \pm 0.49$ mg/L	$32.11 \pm 1.85$ mg/L	23.66 mg/L	37.07 mg/L	60.75 mg/L

Por otra parte, la riqueza en carbonatos genera pH alcalino en el agua y suelo (en este caso  $\text{pH}=8$ ) y provocar alcalinidad ( $145.69 \pm 9.81$  mg/L en la muestra

analizada)(Rodríguez-Fuentes H., 2015). Esta alcalinidad pudo provocar la poca movilidad de los metales en el suelo (ver Tabla 17), ya que estos presentan una menor lixiviación en condiciones alcalinas que en condiciones ácidas(García-Arreola et al., 2018; Rodríguez-Fuentes H., 2015), por lo que no se detectaron en las muestras de agua.

Tabla 17. Determinación de metales en la muestra de agua de río.

As	Cu	Cr	Fe	Hg	Ni	Pb	Zn
<0.003 mg/L	<0.1 mg/L	<0.2 mg/L	<0.2 mg/L	<0.001 mg/L	<0.2 mg/L	<0.2 mg/L	<0.05 mg/L

Al realizar el análisis de una muestra de agua de río, se determinó que no existían señales de unión inespecífica relacionados al efecto matriz (ver Figura 33). Así mismo, se analizó una muestra de río enriquecida con 3mg/L de clorofeno, empleando enzimas propias y comerciales. La figura 33 muestra que al inyectar la muestra de agua de río la señal se mantiene en la línea base, a diferencia de las muestras enriquecidas con el analito.

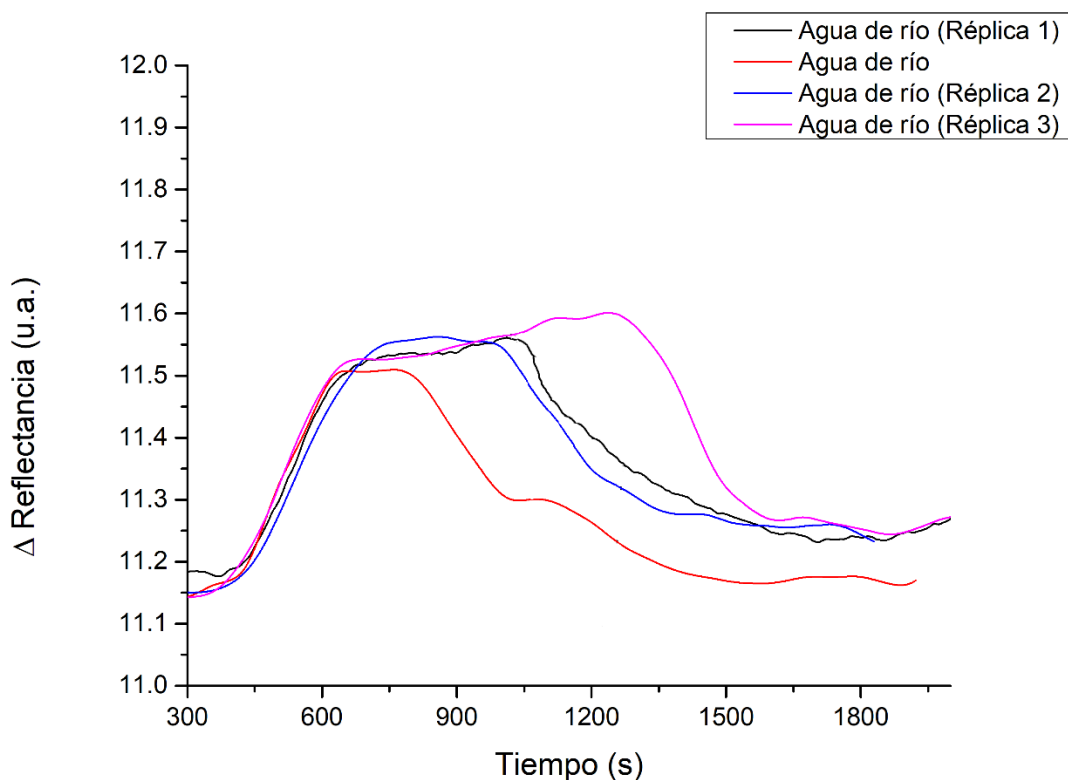


Figura 33. Efectos de la matriz de la muestra.

Al finalizar el estudio se realizó una prueba T para determinar si existían diferencias significativas entre la concentración real añadida a la muestra y la concentración determinada experimentalmente, utilizando enzimas propias y comerciales. En la Tabla 18, se pueden observar los resultados

Tabla 18. Resultados obtenidos al analizar una muestra de clorofeno 3 mg/L, utilizando enzimas propias y comerciales como bioreceptor.

Origen enzima	Propias	Comerciales
Señal 1	3.06	3.071
Señal 2	3.27	3.07
Señal 3	3.17	3.071

Por otro lado, la muestra de agua de río contenía  $10.99 \pm 0.49$  mg/L (0.18 mM) de cloruros, lo cual no causó inhibición en las enzimas, las cuales en su forma libre y bajo las concentraciones de  $\text{Cl}^-$  probadas (40mM, 100 mM y 200 mM) si tuvieron un 100% en la pérdida de su actividad. Esto podría ser gracias a la inmovilización, ya que se ha demostrado que favorece que las enzimas sean más estables(Y. Li et al., 2018). Sin embargo, si fue notorio que las lacasas de *S. aureus* inmovilizadas mostraron peor detección al analizar una muestra real de agua de río enriquecida con 3 mg/L, a diferencia de la muestra sintética con 3 mg/L (libre de cloruros). Mientras que, las enzimas comerciales mantuvieron buenas señales independientemente de la presencia de cloruros. Estas diferencias entre la estabilidad de las lacasas comerciales y propias podrían deberse a que *Rhus vernicifera* posee un porcentaje de glicosilación del 40% a diferencias de las especies bacterianas varía entre 22-45% (Arregui et al., 2019), así que, es probable que existan diferencias en el patrón de distribución de la glicosilación, la cual influye en la estabilidad de las lacasas(Chang et al., 2017; Farias-Virgens et al., 2014; Niu et al., 2016).

### **6.8 Validación del protocolo de medición de SPR a través de la técnica estandarizada de HPLC**

Para la validación del método, se enriquecieron muestras sintéticas con 3 mg/L de analito. Posteriormente se realizaron las mediciones por un protocolo estandarizado de HPLC para la detección de estos compuestos y se compararon los resultados con aquellos obtenidos por medio de la técnica de SPR.

Los parámetros cromatográficos empleados en la detección de ácido okadaico mediante el equipo HPLC se basó en lo reportado por Vale y colaboradores (1999) (Vale et al., 1999) , en dónde se utilizó una columna de fase reversa (Zorbax ODS C18, 250x 4.6mmx 5mm) y una fase móvil constituida por acetonitrilo: agua (85:15), flujo de 1mL/min y medido a 290 nm(Vale et al., 1999). Mientras que el protocolo de cuantificación para el

ácido okadaico se basó en el uso de la misma columna pero empleando como fase móvil acetonitrilo-agua (85: 15) medido a 190 nm (ECHA, 2017).

Finalmente se realizó un análisis de ANOVA de un factor basado en la técnica instrumental usada (SPR y HPLC) y se compararon los resultados de ambas técnicas para evaluar si existían diferencias estadísticamente significativas entre ellas (n=6). Adicionalmente se llevó a cabo una prueba T de Student para comparar ambas técnicas.

### **6.8.1 Validación del clorofeno**

Se llevó a cabo la validación del método, con la técnica de HPLC, obteniendo una buena correlación lineal de  $R^2=0.9995$ , un LOD de 0.07 mg/L y LOQ de 0.22 mg/L, con un rango de trabajo de 1-30 mg/L. Al igual que en SPR, la señal emitida por el analito fue considerablemente más alta que para el ácido okadaico, ya que, al tener un grupo OH- y un halógeno, emite una señal detectable en el espectro UV-vis (Rousseac & Rousseac, 2003). Los LOD y LOQ del HPLC fueron ligeramente más bajos que por SPR (LOD= 0.3 mg/L y LOQ= 1.0 mg/L para SPR), pero en un orden de magnitud muy similar, por lo que la técnica de SPR podría competir con la de HPLC, ya que, además, el equipo de SPR podría miniaturizarse para volverse portátil (Bianco et al., 2017; Trzaskowski, Napiórkowska, Augustynowicz-Kopeć, & Ciach, 2018; X. Zhang et al., 2017).

Al igual que en SPR, se analizó por triplicado una muestra de agua de río enriquecida con 3 mg/L de clorofeno, obteniéndose un porcentaje de recuperación de  $102.33\% \pm 0.01$ , además se realizó una prueba T con un 95% de confianza y no se encontraron diferencias significativas entre la concentración determinada experimentalmente y la concentración teórica añadida.

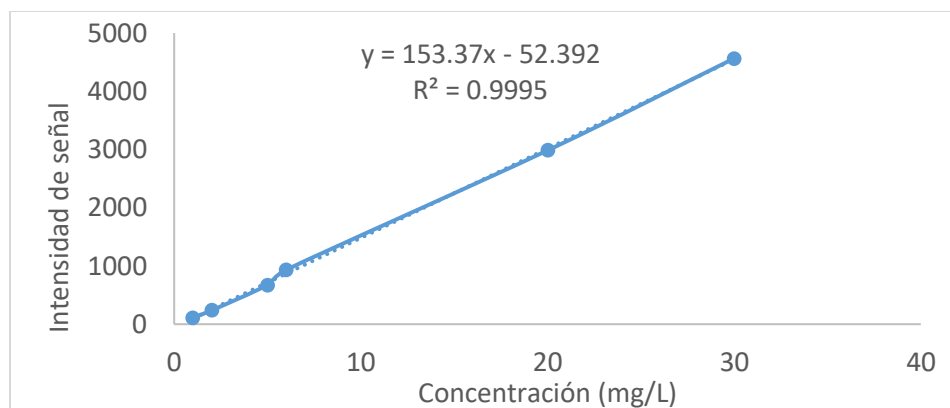


Figura 34. Curva de calibración del clorofeno por HPLC.

### 6.8.2 Validación del ácido okadaico

De la misma manera que se validó el método para determinar clorofeno, se llevó a cabo la validación del ácido okadaico, comparando la metodología implementada en este trabajo con la técnica de HPLC. A diferencia del clorofeno, con el ácido okadaico no se obtuvo una correlación lineal, ya que el analito generaba una señal muy débil por UV-vis, debido probablemente a que la molécula no posee enlaces conjugados que generen una señal apreciable en el espectro, por lo que sería necesario usar otras formas de detección, como la derivatización (Res, Xie, Wang, Wu, & Ou, 2018) o acoplar al HPLC un detector de masas (Vale et al., 1999).

Se obtuvo una  $R^2=0.4795$  (rango de 0-10 mg/L), lo cual indica que la correlación era muy débil, además de que poseía muy baja sensibilidad a pequeños cambios de concentración, por lo que sería necesario utilizar concentraciones muy altas del analito (mayores a 100 mg/L). Debido a que la curva de calibración no mostró una buena correlación lineal, bajo las condiciones establecidas, no se analizó una muestra enriquecida ni se determinó el porcentaje de recuperación.

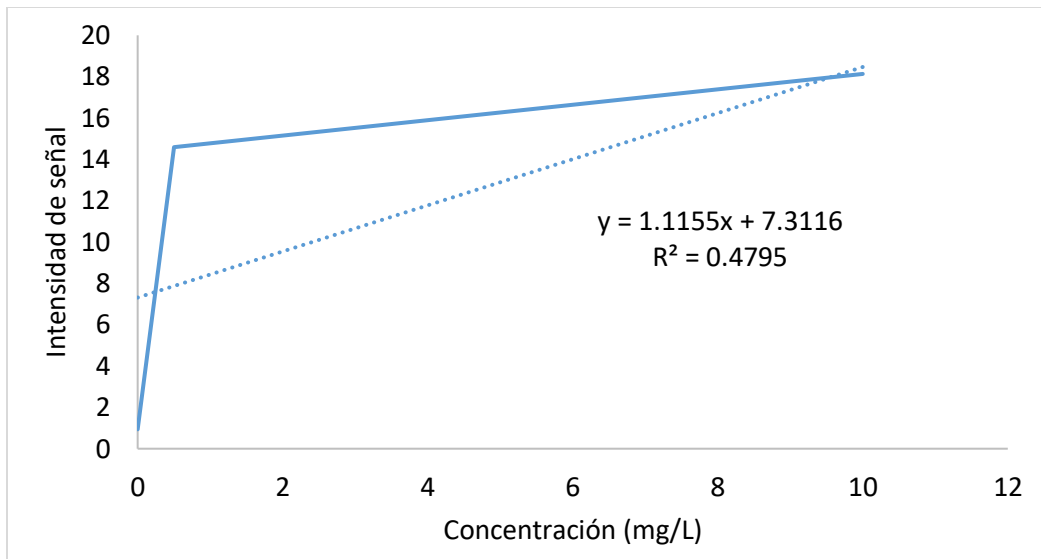


Figura 35. Curva de calibración del ácido okadaico por HPLC

## 6.9 Comparación estadística entre las técnicas de SPR y HPLC.

### Comparación entre las técnicas de SPR y HPLC por ANOVA:

Se realizó un análisis de varianza de un factor para determinar si existían diferencias significativas entre ambos métodos. Para ello, se analizaron los resultados obtenidos por ambas técnicas al analizar muestras de agua de río enriquecidas con 3 mg/L de clorofeno.

Tabla 19. Concentraciones obtenidas por cada técnica, en mg/L.

Técnica	Valor 1	Valor 2	Valor 3
HPLC	3.04 mg/L	2.94 mg/L	3.15 mg/L
SPR	3.071 mg/L	3.07 mg/L	3.071 mg/L

Tabla 20. Resumen de los datos obtenidos.

<b>RESUMEN</b>				
----------------	--	--	--	--



<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	3	9.13	3.04333333	0.01103333
Columna 2	3	9.212	3.07066667	3.3333E-07

Tabla 21. Análisis de varianza de un factor entre las dos metodologías.

<b>ANÁLISIS DE VARIANZA</b>						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.00112067	1	0.00112067	0.20313586	0.67555249	7.70864742
Dentro de los grupos	0.02206733	4	0.00551683			
Total	0.023188	5				

Como puede observarse en el análisis de varianza (ANOVA), al comparar los resultados del análisis de la muestra de agua enriquecida con 3 mg/L, no se encontraron diferencias significativas, es decir, tuvieron resultados muy similares, además de poseer buena precisión y exactitud, ya que en ambas metodologías se obtuvieron valores experimentales muy cercanos al real y con desviaciones estándar bajas, como se puede observar en las secciones de validación del método por las técnicas de SPR y HPLC.

Aunque los límites de detección y cuantificación en la técnica de HPLC fueron ligeramente más bajos, la técnica de SPR puede ser competitiva.

Tabla 22. Comparación entre ambas técnicas por medio de la prueba T Student

Tcal=	0.28
Ttab=	4.3
Nivel de significancia	0.05

## 6.10 Análisis de la muestra real de agua por SPR

Cabe destacar, que a pesar de la gran cantidad de carbonatos disueltos, además de la presencia de cloruros y sulfatos, así como el pH alcalino, las enzimas mostraron una buena estabilidad y suficiente actividad catalítica como para generar una señal detectable por el equipo de SPR, lo cual pudo deberse al amplio rango de condiciones de trabajo que se ha reportado para estas enzimas (Muthukumarasamy et al., 2015; Pardo et al., 2018), así como al proceso de inmovilización (Y. Li et al., 2018).

Asimismo, la materia orgánica presente puede retener gran cantidad de compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos (Ruiz, 2016), los cuales podrían provocar interferencias al analizar una muestra ambiental y provocar resultados erróneos (más altos o bajos que el valor real). Sin embargo, el método de determinación de clorofeno utilizando lacasas acopladas a SPR, demostró un buen porcentaje de recuperación a pesar de todas las posibles interferencias que estuvieran presentes en una matriz tan compleja como una muestra ambiental.

## CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

Se realizaron pruebas con distintas cepas bacterianas aisladas del estado de Nuevo León, encontrando que las cepas de *Staphylococcus aureus* (T3C3) y *Bacillus cereus* f24 (T3A1) eran capaces de producir enzimas oxidasas de tipo lacasa, al cultivarse en Medio Mínimo (extracto de levadura 0.6%,  $\text{CuSO}_4$  100  $\mu\text{M}$ , pH 8, 37°C).

La cepa de *S. aureus* presentó la mejor actividad enzimática, obteniendo un valor de  $499 \pm 14.05$  U/mg, después de haber sido parcialmente purificadas por cromatografías de exclusión de tamaño e intercambio iónico en columna. Sin embargo, el análisis por electroforesis SDS-PAGE mostró que había mezcla de proteínas y su nivel de purificación fue evaluado en 14.9.

Las enzimas semipurificadas se caracterizaron parcialmente y se encontró que eran estables en un rango de temperatura de 25°C a 60°C, así como en un rango de pH de 3 a 8, siendo este factor el que más influyó en su actividad. Además, las lacasas mostraron actividad en un rango de concentraciones de EDTA de 0.5 a 3 M y su actividad se

incrementaba al incubarse en metanol al 60%, pero fueron completamente inhibidas por cloruros a 40 mM. 100 mM y 200mM.

Por otro lado, se comprobó por medio espectrofotometría UV-vis, que la enzima lacasa es capaz de interactuar con el clorofeno y el ácido okadaico, lo cual demostró su potencial como bioreceptor para el diseño del biosensor.

Las enzimas fueron inmovilizadas sobre chips de oro y fueron caracterizadas por microscopía electrónica de barrido y FTIR. Sin embargo, durante el proceso de inmovilización hubo una pérdida del 48.5% de su actividad.

Se comprobó mediante SPR que las lacasas tienen la capacidad de actuar como bioreceptor del clorofeno y son adecuadas para detectar clorofeno, mostrando una correlación lineal ( $R^2= 0.9956$ ) entre la concentración del analito y la muestra. Se validó el método, obteniendo un porcentaje de recuperación del  $102.33\% \pm 0.01$  de la muestra enriquecida, un límite de detección de 0.3 mg/L, límite de cuantificación de 1.0 mg/L y un rango de trabajo de 0-10 mg/L. No se encontraron diferencias significativas entre la concentración real y la obtenida experimentalmente.

Se validó la metodología para la determinación de clorofeno utilizando lacasas comerciales como bioreceptor acopladas a un equipo de SPR, se compararon estadísticamente los resultados con los obtenidos por la técnica de HPLC y no se encontraron diferencias significativas entre ambas técnicas.

En cuanto al ácido okadaico, su rango de trabajo fue de 3-10 mg/L y su límite de detección fue de 2.91 mg/L. Su coeficiente de correlación ( $R^2=0.9152$ ) no fue bueno a bajas concentraciones, por lo cual pequeños cambios en la concentración no es posible detectarlos y eso implica una desventaja para el uso de la metodología en aplicaciones reales.

## 8. PERSPECTIVAS

- Realizar un proceso de purificación más exhaustivo de las lacasas de *S. aureus*.
- Llevar a cabo más pruebas de caracterización, incluyendo parámetros como punto isoeléctrico, secuenciación de aminoácidos, patrón de glicosilación, entre otros.
- Optimizar la producción de lacasas con cepas de *B. cereus* y *S. aureus*, utilizando un diseño de experimentos.
- El biosensor desarrollado podría tener aplicaciones en la industria de cosméticos, ya que la concentración máxima permitida en estos productos es de 0.2%.
- Utilizar las lacasas producidas como receptores en la detección de distintos analitos por SPR o, por otro tipo de biosensores, como los electroquímicos.
- Utilizar las enzimas producidas en remediación de agua y suelos contaminados con compuestos fenólicos y compuestos con grupos donadores de electrones, que sean susceptibles a la actividad oxidorreductasa de las lacasas.

## 9. ANEXOS: COSTOS DEL EQUIPO DE SPR

El costo aproximado de fabricación de un equipo de Resonancia Superficial de Plasmones (sin incluir el equipo de cómputo) comprando los componentes más indispensables por separado es el siguiente:

Tabla 23. Costo aproximado de la fabricación de un equipo SPR, comprando los componentes por separado.

Componente	Proveedor /Precio (pesos mexicanos sin IVA)
Fotodiodo	INTECS (INTECS, 2020)/ \$5,252
Componente óptico	INTECS(INTECS, 2020)/\$ 34,891
USB multifuncional 100 kS/s	NI(NI, 2020)/ \$15,967
USB alta velocidad	NI(NI, 2020)/ \$672
Bomba peristáltica	ATL/\$19,421
Montura óptica	INTECS(INTECS, 2020)/\$18,032
Software	Proporcionado por el Centro de Investigaciones en Óptica A.C., ubicado en León, Guanajuato, México.
Automuestreador (opcional)	LEACSA(LEACSA, 2020)/ \$219,544(sin control de temperatura)
<b>Costo total:</b>	<b>\$ 313,779 pesos mexicanos</b>

Asimismo, se ofrece en el mercado el equipo completo con accesorios, el cual implica un mayor costo:

Tabla 24. Costo de adquirir un equipo SPR completo con accesorios.

Equipo/ descripción	Proveedor/ Costo (pesos mexicanos sin IVA)
<p><b>Sistema BI-4500 SPR:</b> Sistema de análisis semi automatizado de 5 canales que incluye el instrumento BI-SPR, sistema de inyección BI-DirectFlow™, computadora y software de análisis. Control de temperatura para estudios termodinámicos. Incluye: Kit de accesorios SPR: 5 piezas de Chips de Au SPR, "matching fluid" de 8cc, Pinzas, dos jeringas de 20 ml, una jeringa de inyección de vidrio de 500ul, loop de muestra de 500 ul, botella de desechos y Buffer degasificador.</p> <p><b>INCLUYE:</b> Instalación y entrenamiento práctico en las instalaciones donde se encuentre el equipo por 1.5 días.</p>	Logitlab(Logitlab, 2018)/ \$2,011,022

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ab-El-Monssef, R., Hassan, E., & Ramadan, E. (2016). Production of laccase enzyme for their potential application to decolorize fungal pigments on aging paper and parchment. *Annals of Agricultural Sciences*, 61(1), 145–154. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2015.11.007>
- Ahmed, M., Hossain, M., Safavieh, M., Wong, Y., Rahman, I., Zourob, M., & Tamiya, E. (2016). Toward the development of smart and low cost point-of-care biosensors based on screen printed electrodes. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(3), 495–505. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.992387>
- Al-Adhami, A., Bryjak, J., & Greb-Markiewicz, B. Peczyńska-Czoch, W. (2002). Immobilization of wood-rotting fungi laccases on modified cellulose and acrylic carriers. *Process Biochemistry*, 37, 1387–1394.
- Ali, J., Najeeb, J., Ali, M., Aslam, M., & Raza, A. (2017). Biosensors : their fundamentals , designs , types and most recent impactful applications : a review. *J Biosens Bioelectron*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.4172/2155-6210.1000235>
- Allos, M. M., & Hussein, A. A. (2015). Optimum Conditions for Laccase Production by Local Isolate of *Bacillus Cereus* B5. *Journal of Al-Nahrain University-Science*, 18(2), 133–140. <https://doi.org/10.22401/jnus.18.2.17>
- Alver, E., & Metin, A. (2017). Chitosan based metal-chelated copolymer nanoparticles: Laccase immobilization and phenol degradation studies. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 125, 235–242. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0964830517309423>
- Arregui, L., Ayala, M., Gómez-Gil, X., Gutiérrez-Soto, G., Hernández-Luna, C., Herrera De Los Santos, E., ... Valdez-Cruz, N. A. (2019). Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 1–33. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1248-0>
- Arvidson, S. (2006). Extracellular enzymes. In *Gram Positive Pathogens* (pp. 478–479). Retrieved from <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555816513.chap39>
- ATSDR. (2015). Public Health Statement Asbestos Public Health Statement. Retrieved November 11, 2019, from <https://www.atsdr.cdc.gov/phs/phs.asp?id=939&tid=195>

- Belío-Reyes, I., Bojórquez-Steffani, A., Bucio, L., Jiménez, J., & Peraza-Garay, F. (2017). Aplicación de láser terapéutico en algunos movimientos ortodónticos. *Revista Mexicana de Ortodoncia*, 5(4), 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.rmo.2018.01.005>
- Bertó-Navarro, R. (2015). Staphylococcus aureus en la industria alimentaria. Retrieved from Betelgeux website: <https://www.betelgeux.es/blog/2015/07/09/staphylococcus-aureus-en-la-industria-alimentaria/#:~:text=Son resistentes a enzimas proteolíticos,por gramo de alimento analizado.>
- Bertrand, B., Martínez-Morales, F., Tinoco-Valencia, R., Rojas, S., Acosta-Urdapilleta, L., & Trejo-Hernández, M. (2015). Biochemical and molecular characterization of laccase isoforms produced by the white-rot fungus *Trametes versicolor* under submerged culture conditions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 122, 339–347. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1381117715300886>
- Bianco, M., Sonato, A., De Girolamo, A., Pascale, M., Romanato, F., Rinaldi, R., & Arima, V. (2017). An aptamer-based SPR-polarization platform for high sensitive OTA detection. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 241, 314–320. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.10.056>
- BioRad. (n.d.). Quick Start Bradford. Retrieved September 4, 2019, from <https://www.bio-rad.com/es-mx/product/quick-start-bradford-protein-assay?ID=5ec149ee-0cd1-468b-8651-a2fe9de6944d>
- Bollag, J. M., & Leonowicz, A. (1984). Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(4), 849–854. <https://doi.org/10.1128/aem.48.4.849-854.1984>
- Bolobajev, J., Bilgin, N., Öncü, M., Viisimaa, M., Trapido, M., Goi, A., & Balcioglu, I. (2015). Column experiment on activation aids and biosurfactant application to the persulphate treatment of chlorophene-contaminated soil. *Environmental Technology*, 36(3), 348–357. Retrieved from <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09593330.2014.948493>
- Borkar, P. S., Bodade, R. G., Rao, S. R., & Khobragade, C. N. (2009). Purification and characterization of extracellular lipase from a new strain: *Pseudomonas aeruginosa* SRT 9. *Brazilian Journal of Microbiology: [Publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 40(2), 358–366. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220090002000028>
- Caliman, F. A., & Gavrilescu, M. (2009). Pharmaceuticals, Personal Care Products and Endocrine Disrupting Agents in the Environment - A Review. *CLEAN - Soil, Air, Water*, 37(4–5), 277–303. <https://doi.org/10.1002/clen.200900038>
- Cao, J., Sun, T., & Grattan, K. (2014). Gold nanorod-based localized surface plasmon resonance biosensors: A review. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 195, 332–351. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.01.056>
- Casero, E., Petit-Domínguez, M. D., Vázquez, L., Ramírez-Asperilla, I., Parra-Alfambra, a M., Pariente,

- F., & Lorenzo, E. (2013). Laccase biosensors based on different enzyme immobilization strategies for phenolic compounds determination. *Talanta*, *115*, 401–408.  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.05.045>
- Chan-Cupul, W., Heredia-Abarca, G., & Rodríguez-Vázquez, R. (2016). Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática ligninolítica de macromicetos del estado de Veracruz, México. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, *32*(3), 339–351.  
<https://doi.org/10.20937/RICA.2016.32.03.08>
- Chandra, R., & Chowdhary, P. (2015). Environmental Science Processes & Impacts Properties of bacterial laccases and their application in bioremediation of industrial wastes. *Environmental Sciences: Processes Impacts*, 326–342. <https://doi.org/10.1039/c4em00627e>
- Chang, X., Xu, B., Bai, Y., Luo, H., Ma, R., Shi, P., & Yao, B. (2017). Role of N-linked glycosylation in the enzymatic properties of a thermophilic GH 10 xylanase from *Aspergillus fumigatus* expressed in *Pichia pastoris*. *PLoS ONE*, *12*(2), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171111>
- Chauhan, P., & Jha, B. (2018). Pilot scale production of extracellular thermo-alkali stable laccase from *Pseudomonas* sp. S2 using agro waste and its application in organophosphorous pesticides degradation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *93*(4), 1022–1030.  
<https://doi.org/10.1002/jctb.5454>
- Chefetz, B., Chen, Y., & Hadar, Y. (1998). Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(9), 3175–3179. <https://doi.org/10.1128/aem.64.9.3175-3179.1998>
- Colas, F., Crassous, M., Laurent, S., Litaker, R., Rinnert, E., Le Gall, E., ... Compère, C. (2016). A surface plasmon resonance system for the underwater detection of domoic acid. *Limnology and Oceanography: Methods*, *14*(7), 456–465. <https://doi.org/10.1002/lom3.10104>
- CONAGUA. (2001). NMX-AA-072-SCFI-2001. Water analysis-Determination of total hardness in treated natural, sewage and residual waters-Test method. Retrieved April 6, 2016, from [http://lasa.ciga.unam.mx/monitoreo/images/biblioteca/45 NMX-AA-072-SCFI-2001\\_Dureza.pdf](http://lasa.ciga.unam.mx/monitoreo/images/biblioteca/45%20NMX-AA-072-SCFI-2001_Dureza.pdf)
- Croci, L., Cozzi, L., Stacchini, A., De-Medici, D., & Toti, L. (1997). A rapid tissue culture assay for the detection of okadaic acid and related compounds in mussels. *Toxicon.*, *35*, 223–230.
- de Gonzalo, G., Colpa, D., Habib, M., & Fraaije, M. (2016). Bacterial enzymes involved in lignin degradation. *Journal of Biotechnology*, *236*, 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.08.011>
- Deska, M., & Kończak, B. (2019). Immobilized fungal laccase as “green catalyst” for the decolourization process – state of the art. *Process Biochemistry*, (May), 0–1.  
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.05.024>



- DOF. (2016). NMX-AA-051-SCFI-2016:WATER ANALYSIS-MEASUREMENT OF METALS BY ATOMIC ABSORPTION IN NATURAL, DRINKING, RESIDUAL AND TREATED WASTE WATERS- TEST METHOD. Retrieved October 31, 2019, from [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5464459&fecha=07/12/2016](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5464459&fecha=07/12/2016)
- DOH. (2016). Shellfish Poisoning: Paralytic, Domoic Acid, or Diarrhetic. Retrieved February 12, 2018, from Washington Department of Health website: <https://www.doh.wa.gov/Portals/1/Documents/5100/420-077-Guideline-ShellfishPoisoning.pdf>
- ECHA. (2017). Chlorophene Product-type 2 (Disinfectants and algacides not intended for direct application to humans or animals): Assesment Report. Retrieved February 19, 2018, from file:///C:/Users/User/Downloads/Chlorophene y dichlorophene\_Assessment\_Report.pdf
- ECR. *European Commision Regulation No. 853/2004.* , (2004).
- Educaplus. (2018). Refracción de la luz. Retrieved May 9, 2018, from <http://www.educaplus.org/luz/refraccion.html>
- EPA. (2016). Contaminants of Emerging Concern including Pharmaceuticals and Personal Care Products. Retrieved May 17, 2018, from <https://www.epa.gov/wqc/contaminants-emerging-concern-including-pharmaceuticals-and-personal-care-products>
- Espinosa-Sánchez, Y. (2018). *Actualización y primera etapa de diseño y fabricación de un sistema de Resonancia Superficial de Plasmones.*
- Estevez, M.-C., Otte, M. a, Sepulveda, B., & Lechuga, L. M. (2014). Trends and challenges of refractometric nanoplasmonic biosensors: a review. *Analytica Chimica Acta*, 806, 55–73. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.10.048>
- Fan, X., Liang, W., Li, Y., Li, H., & Liu, X. (2017). Identification and immobilization of a novel cold-adapted esterase, and its potential for bioremediation of pyrethroid-contaminated vegetables. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 149.
- FAO. (2005). Biotoxinas marinas. Retrieved March 3, 2018, from <http://www.fao.org/3/a-y5486s.pdf>
- Farias-Virgens, M., Pol-Fachin, L., Verli, H., & Saraiva-Pereira, M. (2014). Effects of glycosylation and pH conditions in the dynamics of human arylsulfatase A. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 32(4), 567–579. <https://doi.org/10.1080/07391102.2013.780982>
- Farka, Z., Juřík, T., Pastucha, M., & Skládal, P. (2016). Enzymatic precipitation enhanced surface plasmon resonance immunosensor for the detection of Salmonella in powdered milk. *Analytical Chemistry*, 88(23), 11830–11836. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03511>
- FCQ-UANL. (2014). Procedimiento para la disposición final de residuos peligrosos. Retrieved March 13,

- 2018, from <http://www.fcq.uanl.mx/wp-content/uploads/2015/05/Disposicion-Final-de-Residuos.pdf>
- Fujiki, H., Suganuma, M., Watanabe, T., & Sueoka, E. (2015). *Progressive Insight into Tumor Promotion with. 1*, 1–4.
- Fujiki, H., Suganuma, M., Yoshizawa, S., Nishiwaki, S., Winyar, B., & Sugimura, T. (1991). Mechanisms of Action of Okadaic Acid Class Tumor Promoters on Mouse Skin. In *Environmental health perspectives* (Vol. 93). <https://doi.org/10.1289/ehp.9193211>
- García-Arreola, M. E., Flores-Vélez, L. M., Loredó-Tovías, M., Aguillón-Robles, A., López-Doncel, R. A., Cano-Rodríguez, I., & Soriano-Pérez, S. H. (2018). Assessment of the acid drainage neutralization capacity and the toxic metals lixiviation of tailing from Guanajuato mining district, Mexico. *Environmental Earth Sciences*, 77(9), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s12665-018-7521-4>
- Gavrilescu, M., Demnerová, K., Aamand, J., Agathos, S., & Fava, F. (2015). Emerging pollutants in the environment: Present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. *New Biotechnology*, 32(1), 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.01.001>
- Gayosso-Canales, M. (2007). Evaluación de la actividad enzimática de *Pleurotus ostreatus* en presencia de bifenilos policlorados. *El Cultivo de Setas Pleurotus Spp. En México*, 191–197. Retrieved from <https://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/bitstream/handle/123456789/7432/6.pdf?sequence=1&isAllowed=y%0Ahttp://www.uaeh.edu.mx/investigacion/producto.php?producto=3065%5Cnhttp://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/handle/123456789/7432>
- González-Palma, M., Varela-Floriano, V., Sánchez, C., & Díaz-Godínez, R. (2008). PRODUCCIÓN DE LACASAS DE *Pleurotus ostreatus* POR FERMENTACIÓN SÓLIDA SOBRE ESPUMA DE POLIURETANO Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD SOBRE DIFERENTES SUSTRATOS. *Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*, 2008.
- Guzmán-Sandoval, A. (2016). *Identificación de Pseudomona aeruginosa en el equipo de anestesia inhalatoria en 20 clínicas y hospitales veterinarios de la ciudad de Quito mediante estudios microbiológicos*. Universidad de las Américas.
- INSHT. (2016). Fichas de agentes biológicos: *Pseudomonas aeruginosa*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/269001>
- INTECS. (2020). Instrumentación. Retrieved September 10, 2020, from <http://intecssa.com.mx/#inicio>
- Kant, R., Tabassum, R., & Gupta, B. (2016). Fiber Optic SPR-Based Uric Acid Biosensor Using Uricase Entrapped Polyacrylamide Gel. *IEEE Photonics Technology Letters*, 28(19), 2050–2053. <https://doi.org/10.1109/LPT.2016.2571722>
- Kuhar, F., & Papinutti, L. (2014). Optimization of laccase production by two strains of *Ganoderma*

- lucidum using phenolic and metallic inducers | Optimización de la producción de lacasa por dos cepas de *Ganoderma lucidum* utilizando inductores fenólicos y metálicos. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(2), 144–149. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84902813830&partnerID=MN8TOARS>
- Kumar, R., Kaur, J., Jain, S., & Kumar, A. (2016). Optimization of laccase production from *Aspergillus flavus* by design of experiment technique: Partial purification and characterization. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 14(1), 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.05.006>
- LEACSA. (2020). Instrumentación. Retrieved October 9, 2020, from <http://leacsa.com.mx/>
- Leonardo, S., Toldrà, A., Rambla-Alegre, M., Fernández-Tejedor, M., Andree, K., Ferreres, L., ... Campàs, M. (2017). Self-assembled monolayer-based immunoassays for okadaic acid detection in seawater as monitoring tools. *Marine Environmental Research*, 133(October 2017), 6–14. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.11.004>
- Li, G., Sun, K., Li, D., Lv, P., Wang, Q., Huang, F., & Wei, Q. (2016). Biosensor based on bacterial cellulose-Au nanoparticles electrode modified with laccase for hydroquinone detection. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 509, 408–414. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.09.028>
- Li, Y., Hye, J., & Corn, R. (2007). Detection of protein biomarkers using RNA aptamer microarrays and enzymatically amplified surface plasmon resonance imaging. *Analytical Chemistry*, 79(3), 1082–1088. <https://doi.org/10.1021/ac061849m>
- Li, Y., Ogorzalek, T., Wei, S., Zhang, X., Yang, P., Jasensky, J., ... Chen, Z. (2018). Effect of immobilization site on the orientation and activity of surface-tethered enzymes. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 20(2), 1021–1029. <https://doi.org/10.1039/c7cp06063g>
- Liu, H., Zhou, P., Wu, X., Sun, J., & Chen, S. (2015). Radical scavenging by acetone: A new perspective to understand laccase/ABTS inactivation and to recover redox mediator. *Molecules*, 20(11), 19907–19913. <https://doi.org/10.3390/molecules201119672>
- Logitlab. (2018). Instrumentación. Retrieved from <https://www.elevate.com.mx/project/pagina-web-logitlab/>
- Luna-Moreno, D., Sánchez-álvarez, A., Islas-Flores, I., Canto-Canche, B., Carrillo-Pech, M., Villarreal-Chiu, J., & Rodríguez-Delgado, M. (2019). Early detection of the fungal banana black sigatoka pathogen *Pseudocercospora fijiensis* by an SPR immunosensor method. *Sensors (Switzerland)*, 19(3), 1–12. <https://doi.org/10.3390/s19030465>
- Maier, R., & Soberon-Chavez, G. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(5), 625–633.

- Martínez, A., Ruiz-Dueñas, F., Camarero, S., Serrano, A., Linde, D., Lund, H., ... Alcalde, M. (2017). Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations. *Biotechnology Advances*, 35(6), 815–831. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.06.003>
- Mateo-Sagasta, J., Marjani, S., Turrall, H., & Burke, J. (2017). Water pollution from agriculture: a global review Executive summary. *FAO and IWMI*, 35. Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-i7754e.pdf>
- Mishra, S. K., & Srivastava, S. K. (2016). Production of extracellular laccase from bacterial strain *Bacillus subtilis* MTCC 1039 using different parameter. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 13(3), 1645–1650. <https://doi.org/10.13005/bbra/2312>
- Miyazaki, C., Shimizu, F., Mejía-Salazar, J., Oliveira, O., & Ferreira, M. (2017). Surface plasmon resonance biosensor for enzymatic detection of small analytes. *Nanotechnology*, 28(14). <https://doi.org/10.1088/1361-6528/aa6284>
- Moshtaghioun, S. M., Dadkhah, M., Bahremandjo, K., Haghbeen, K., Aminzadeh, S., & Legge, R. L. (2017). Optimization of simultaneous production of tyrosinase and laccase by *Neurospora crassa*. *Biocatalysis and Biotransformation*, 35(1), 1–10. <https://doi.org/10.1080/10242422.2016.1266617>
- Moss, P. (1992). *Enzyme Nomenclature*. Retrieved from <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/>
- Moszer, I., Danchin, A., & Martin-verstraete, I. (2001). CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. *Society*, 183(18), 5426–5430. <https://doi.org/10.1128/JB.183.18.5426>
- Muthukumarasamy, N., Jackson, B., Joseph-Raj, A., & Sevanan, M. (2015). Production of Extracellular Laccase from *Bacillus subtilis* MTCC 2414 Using Agroresidues as a Potential Substrate. *Biochemistry Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/765190>
- Naidu, R. (2016). Emerging contaminant uncertainties and policy : The chicken or the egg conundrum. *Chemosphere*, 154(July), 350–357. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.03.068>
- NI. (2020). Instrumentación. Retrieved September 24, 2020, from <https://www.ni.com/es-mx.html>
- NIH. (2017). Bromophenol blue. Retrieved July 12, 2018, from [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bromophenol\\_blue#section=Top](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bromophenol_blue#section=Top)
- Niu, C., Luo, H., Shi, P., Huang, H., Wang, Y., Yang, P., & Yao, B. (2016). N-glycosylation improves the pepsin resistance of histidine acid phosphatase phytases by enhancing their stability at acidic pHs and reducing Pepsin's Accessibility to its cleavage sites. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(4), 1004–1014. <https://doi.org/10.1128/AEM.02881-15>
- Noguera-Oviedo, K., & Aga, D. S. (2016). Lessons learned from more than two decades of research on emerging contaminants in the environment. *Journal of Hazardous Materials*, 316, 242–251. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.04.058>

- Oltra-Armon, D., España-Tost, A., Berini-Aytés, L., & Gay-Escoda, C. (2004). Aplicaciones del láser de baja potencia en Odontología. *Rcoe*, 9(5), 517–524. <https://doi.org/10.4321/s1138-123x2004000500003>
- OSHA. (2018). Chlorophene. Retrieved February 20, 2018, from [https://www.osha.gov/dts/chemicalsampling/data/CH\\_227855.html](https://www.osha.gov/dts/chemicalsampling/data/CH_227855.html)
- Pan, Y., Zhou, J., Su, K., Hu, N., & Wang, P. (2017). A Novel Quantum Dot Fluorescence Immunosensor Based on Magnetic Beads and Portable Flow Cytometry for Detection of Okadaic Acid. *Procedia Technology*, 27, 214–216. <https://doi.org/10.1016/j.protcy.2017.04.090>
- Pardo, I., Rodríguez-Escribano, D., Aza, P., de Salas, F., Martínez, A., & Camarero, S. (2018). A highly stable laccase obtained by swapping the second cupredoxin domain. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34008-3>
- Pathak, A., Parveen, S., & Gupta, B. (2018). Fibre Optic SPR Sensor Using Functionalized CNTs for the Detection of SMX: Comparison with Enzymatic Approach. *Plasmonics*, 189–202. <https://doi.org/10.1007/s11468-017-0499-z>
- Pezet, R. (1998). Purification and characterization of a 32-kDa laccase-like stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. *FEMS Microbiology Letters*, 167(2), 203–208. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(98\)00391-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(98)00391-7)
- Piñeros, J. (2015). *Staphylococcus aureus*. *Databio*, 1–4. Retrieved from [http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas de agentes biologicos/Fichas/Bacterias/Staphylococcus aureus.pdf](http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Bacterias/Staphylococcus%20aureus.pdf)
- Pintado-Herrera, M., González-Mazo, E., & Lara-Martín, P. (2016). In-cell clean-up pressurized liquid extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry determination of hydrophobic persistent and emerging organic pollutants in coastal sediments. *Journal of Chromatography A*, 1429, 107–118. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.12.040>
- Piontek, K., Antorini, M., & Choinowski, T. (2002). Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-?? resolution containing a full complement of coppers. *Journal of Biological Chemistry*, 277(40), 37663–37669. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204571200>
- Prego-Faraldo, M., Valdíglesias, V., Méndez, J., & Eirín-López, J. (2013). Okadaic acid meet and greet: An insight into detection methods, response strategies and genotoxic effects in marine invertebrates. *Marine Drugs*, 11(8), 2829–2845. <https://doi.org/10.3390/md11082829>
- Ramírez-Gama, R., Urzúa-Hernández, M., Camacho-Cruz, A., Tsuzuki-Reyes, G., & Esquivel-Cote, R. (2015). *Técnicas básicas de microbiología y su fundamento* (Trillas, Ed.).

- Rayaroth, M., Nejumal, K., Subha, S., Usha, A., & Charuvila, A. (2015). Identification of chlorophene in a backwater stream in Kerala (India) and its sonochemical degradation studies. *CLEAN - Soil, Air, Water*, 43(9), 1338–1343. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/clen.201400508/full>
- Res, M., Xie, J., Wang, L., Wu, W., & Ou, J. (2018). *Minireview Recent Advances on Determination Methods of Mycotoxins and Marine Biotoxins Minireview*. 1–7. <https://doi.org/10.21127/yaoyimr20180011>
- Ribeiro, F., Barroso, M., Morais, S., Viswanathan, S., de Lima-Neto, P., Correia, A., ... Delerue-Matos, C. (2014). Simple laccase-based biosensor for formetanate hydrochloride quantification in fruits. *Bioelectrochemistry*, 95, 7–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2013.09.005>
- Riccardi, C., Buiarelli, F., Di Filippo, P., Distratis, S., Giannetti, L., Manganelli, M., ... Stefanelli, M. (2018). Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Method for the Screening of Eight Paralytic Shellfish Poisoning Toxins, Domoic Acid, 13-Desmethyl Spirolide C, Palytoxin and Okadaic Acid in Seawater. *Chromatographia*, 81(2), 277–288. <https://doi.org/10.1007/s10337-017-3440-x>
- Rodríguez-Couto, S., & Toca, J. (2006). Inhibitors of Laccases: A Review. *Current Enzyme Inhibition*, 2(4), 343–352. <https://doi.org/10.2174/157340806778699262>
- Rodríguez-Delgado, M. M., Alemán-Nava, G. S., Rodríguez-Delgado, J. M., Dieck-Assad, G., Martínez-Chapa, S. O., Barceló, D., & Parra, R. (2015). Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 74, 21–45. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.05.008>
- Rodríguez-Delgado, M., Orona-Navar, C., García-Morales, R., Hernandez-Luna, C., Parra, R., Mahlnecht, J., & Ornelas-Soto, N. (2016). Biotransformation kinetics of pharmaceutical and industrial micropollutants in groundwaters by a laccase cocktail from *Pycnoporus sanguineus* CS43 fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 108, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.12.003>
- Rodríguez-Fuentes H., R.-A. J. (2015). *Métodos de análisis de suelos y plantas* (3era ed.; E. Trillas, Ed.). México: Editorial Trillas.
- Rodríguez, A., Silva, P., & Reyes, M. (2010). Determinación De Sulfato Por El Método Turbidimétrico En Aguas Y Aguas Residuales. Validación Del Método. *Revista Cubana de Química*, XXII(3), 39–44.
- Rousseac, F., & Rousseac, A. (2003). *Análisis Químico. Métodos y técnicas instrumentales modernas*. (5a ed.; McGraw-Hill, Ed.).
- Ruiz, C. (2016). Contenido de materia orgánica y fertilidad. Retrieved June 4, 2016, from [http://stadium.unad.edu.co/preview/UNAD.php?url=/bitstream/10596/9789/1/401543\\_Material\\_didac](http://stadium.unad.edu.co/preview/UNAD.php?url=/bitstream/10596/9789/1/401543_Material_didac)

- Santos, A., Mendes, S., Brissos, V., & Martins, L. (2014). New dye-decolorizing peroxidases from *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas putida* MET94: Towards biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(5), 2053–2065. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5041-4>
- SE. (2001). NMX-AA-036 SCFI-2001. Determination of acidity and alkalinity in treated natural, sewage and residual waters - Test method. Retrieved March 6, 2020, from Diario Oficial de la Federación website: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/166776/NMX-AA-036-SCFI-2001.pdf>
- Semwal, V., & Gupta, B. (2018). LSPR- and SPR-Based Fiber-Optic Cholesterol Sensor Using Immobilization of Cholesterol Oxidase over Silver Nanoparticles Coated Graphene Oxide Nanosheets. *IEEE Sensors Journal*, 18(3), 1039–1046. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2017.2779519>
- Silva-Salinas, A. (2017). *Degradación del ibuprofeno a través de la aplicación de microorganismos productores de oxidoreductasas en el area de Nuevo León, México*. UANL.
- Sitthisak, S., Howieson, K., Amezola, C., & Jayaswal, R. K. (2005). *Characterization of a Multicopper Oxidase Gene from Staphylococcus aureus*. 71(9), 5650–5653. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5650>
- Smienk, H., Domínguez, E., Rodríguez-Velasco, M., Clarke, D., Kapp, K., Katikou, P., ... Mata, L. (2013). Quantitative determination of the okadaic acid toxins group by a colorimetric phosphatase inhibition assay: Interlaboratory study. *Journal of AOAC International*, 96(1), 77–85. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.11-465>
- Social, M. de S. y P. (2011). Perfil de riesgo *Bacillus cereus* en alimentos listos para consumo no industrializados. Retrieved December 26, 2018, from <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/Perfil-bacillus-cereus.pdf>
- Sondhi, S., Sharma, P., George, N., Chauhan, P., Puri, N., & Gupta, N. (2015). An extracellular thermo-alkali-stable laccase from *Bacillus tequilensis* SN4, with a potential to biobleach softwood pulp. 3 *Biotech*, 5(2), 175–185. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0207-z>
- SSA. (2002). NOM-230-SSA1-2002, Environmental health. Water for human use and consumption, sanitary requirements that must be met in public and private supply systems during water management. Sanitary procedures for sampling. Retrieved April 6, 2016, from <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/230ssa102.html>
- SSA. (2004). PROY-NOM-216-SSA1-2002. Retrieved March 2, 2018, from <http://legismex.mty.itesm.mx/normas/ssa1/ssa1214p-03c.pdf>
- Surwase, S., Patil, S., Srinivas, S., & Jadhav, J. (2016). Interaction of small molecules with fungal

- laccase: A Surface Plasmon Resonance based study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82, 110–114. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.043>
- Talbert, J. N., & Goddard, J. M. (2012). Enzymes on material surfaces. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 93, 8–19. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.01.003>
- TermoFisher. (2018). EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride). Retrieved December 25, 2018, from <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/22980>
- Torres-Ramírez, E., & Méndez-Albores, A. (2014). Biosensores enzimáticos. *Revista Digital Universitaria*, 15(12). Retrieved from <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art97/>
- Trabajo, I. N. de S. e H. en el. (2012). Fichas de agentes biológicos: Staphylococcus aureus. Retrieved December 26, 2018, from <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas de agentes biologicos/Fichas/Bacterias/Staphylococcus aureus.pdf>
- Trzaskowski, M., Napiórkowska, A., Augustynowicz-Kopeć, E., & Ciach, T. (2018). Detection of tuberculosis in patients with the use of portable SPR device. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 260, 786–792. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.12.183>
- Twiner, M., Doucette, G., Pang, Y., Fang, C., Forsyth, C., & Miles, C. (2016). Structure-activity relationship studies using natural and synthetic okadaic acid/dinophysistoxin toxins. *Marine Drugs*, 14(11). <https://doi.org/10.3390/md14110207>
- UE. (2005). Reglamento (CE) n° 2074/2005 de la comisión. *Diario Oficial de La Unión Europea*, 59. Retrieved from <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005R2074&from=ES>
- UNAM, F. de Q. de la. (2018). Determinación de Bacillus cereus en alimentos. Retrieved December 26, 2018, from Metodología de microorganismos no normados website: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/3patogenos3-no-normados\\_6425.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/3patogenos3-no-normados_6425.pdf)
- USGS. (2019). Hardness of water. Retrieved October 29, 2019, from [https://www.usgs.gov/special-topic/water-science-school/science/hardness-water?qt-science\\_center\\_objects=0#qt-science\\_center\\_objects](https://www.usgs.gov/special-topic/water-science-school/science/hardness-water?qt-science_center_objects=0#qt-science_center_objects)
- Vale, P., Antónia, M., & Sampayo, M. (1999). Esters of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in Portuguese bivalves related to human poisonings. *Toxicon*, 37(8), 1109–1121. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00247-5](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00247-5)
- Valipour, E., & Arian, B. (2016). Increased production of tyrosinase from Bacillus megaterium strain M36 by the response surface method. *Archives of Biological Sciences*, 68(3), 659–668. <https://doi.org/10.2298/ABS151002058V>



- Vandermeersch, G., Lourenço, H., Alvarez-Muñoz, D., Cunha, S., Diogène, J., Cano-Sancho, G., ... Robbens, J. (2015). Environmental contaminants of emerging concern in seafood - European database on contaminant levels. *Environmental Research*, 143(January 2018), 29–45.  
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.06.011>
- Verma, A. (2016). Hyper-Production of Laccase By *Pseudomonas putida* LUA15.1 through Mutagenesis. *Journal of Microbiology & Experimentation*, 3(1), 1–8. <https://doi.org/10.15406/jmen.2016.03.00080>
- Verma, R., & Gupta, B. (2014). A novel approach for simultaneous sensing of urea and glucose by SPR based optical fiber multianalyte sensor. *Analyst*, 139(6), 1449–1455.  
<https://doi.org/10.1039/c3an01983g>
- Vernoux, J., Le-Baut, C., Masselin, P., Marais, C., Baron, B., Choumiloff, R., ... Bohec, M. (1993). The use of *Daphnia magna* for detection of okadaic acid in mussel extracts. *Food Addit Contam.*, 10(5), 603–608. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8224329/>
- Wilmer, M., Trau, D., Renneberg, R., & Spener, F. (1997). Amperometric Immunosensor for the Detection of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) in Water. *Analytical Letters*, 30(3), 515–525.  
<https://doi.org/10.1080/00032719708001798>
- Wu, M., Lin, M., Lee, C., Yu, S., Wang, A., & Ho, T. (2019). Enhancement of laccase activity by pre-incubation with organic solvents. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45118-x>
- Yakes, B., Buijs, J., Elliott, C., & Campbell, K. (2016). Surface plasmon resonance biosensing: Approaches for screening and characterising antibodies for food diagnostics. *Talanta*, 156–157, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.05.008>
- Yamarik, T. (2004). Safety assessment of dichlorophene and chlorophene. *International Journal of Toxicology*, 23(1), 1–27. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15162836>
- Yang, W., Wang, J., Zhao, S., Sun, Y., & Sun, C. (2006). Multilayered construction of glucose oxidase and gold nanoparticles on Au electrodes based on layer-by-layer covalent attachment. *Electrochemistry Communications*, 8(4), 665–672.
- Yasar, G., Guven, U. G., Guduk, E., & Aktas, F. (2019). Partial purification and characterization of the novel halotolerant and alkalophilic laccase produced by a new isolate of *Bacillus subtilis* LP2. *Biocatalysis and Biotransformation*, 37(2), 268–27.
- Zhang, X., Liu, Y., Fan, T., Hu, N., Yang, Z., Chen, X., ... Yang, J. (2017). Design and performance of a portable and multichannel SPR device. *Sensors (Switzerland)*, 17(6), 1–7.  
<https://doi.org/10.3390/s17061435>

Zhang, Z., Liu, J., Fan, J., Wang, Z., & Li, L. (2018). Detection of catechol using an electrochemical biosensor based on engineered *Escherichia coli* cells that surface-display laccase. *Analytica Chimica Acta*, 1009, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.01.008>

Zhuo, R., Yuan, P., Yang, Y., Zhang, S., Ma, F., & Zhang, X. (2017). Induction of laccase by metal ions and aromatic compounds in *Pleurotus ostreatus* HAUCC 162 and decolorization of different synthetic dyes by the extracellular laccase. *Biochemical Engineering Journal*, 117, 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.09.016>