



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental

Degradación de rojo Congo en agua por una lacasa inmovilizada a un
soporte híbrido fotocatalítico magnético

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestra en Ciencia y Tecnología ambiental

Presenta

IBT. Silvia Gabriela Rangel Duarte

Dirigido por:

Dr. Aldo Amaro Reyes

Co-director:

Dra. Jazmín Edith Méndez Hernández

Querétaro, Querétaro, Diciembre 2024

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental

Degradación de rojo Congo en agua por una lacasa inmovilizada a un soporte
híbrido fotocatalítico magnético

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestra en Ciencia y Tecnología ambiental

Presenta

IBT. Silvia Gabriela Rangel Duarte

Dirigido por:

Dr. Aldo Amaro Reyes

Co-dirigido por:

Dra. Jazmín Edith Méndez Hernández

Dr. Aldo Amaro Reyes
Presidente

Dra. Jazmín Edith Méndez Hernández
Secretaría

Dr. José Santos Cruz
Vocal

Dr. Miguel Angel Ramos López
Suplente

Dr. José Alberto Rodríguez Morales
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Diciembre 2024

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE:

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

Silvia Gabriela Rangel Duarte

Nombre del estudiante

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de maestría con número de CVU 1233404 otorgada para la realización de este proyecto.

A la Universidad Autónoma de Querétaro y al Posgrado en Ciencia y Tecnología Ambiental de la Facultad de Química, por otorgarme la oportunidad de realizar este proyecto.

A mi asesor, el Dr. Aldo Amaro Reyes, le agradezco sinceramente por aceptarme en su grupo de trabajo, por su constante apoyo y guía durante el desarrollo de este proyecto. Su disposición para escucharme y animarme a continuar con mis estudios ha sido invaluable.

A mi co-asesora, la Dra. Jazmín Edith Méndez Hernández, le agradezco por su interés y consejos que me han orientado en la realización de este trabajo.

A mis sinodales el Dr. José Santos Cruz por recibirme en su laboratorio, al Dr. Miguel Angel Ramos López por mantenerme motivada a avanzar en el proyecto y al Dr. José Alberto Rodríguez Morales por su buena disposición e interés en el proyecto.

Finalmente, a mi familia, y en especial a mi esposo, quiero expresar mi agradecimiento por su apoyo incondicional y paciencia a lo largo de este proceso. Sin su respaldo, este logro no habría sido posible.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	4
2.1. La contaminación del agua	4
2.2. La industria textil y los colorantes	5
2.3. Colorantes azo	6
2.4. Métodos para la remoción de colorantes	8
2.4.1. Métodos físicos.....	8
2.4.2. Métodos químicos	9
2.4.3. Métodos biológicos	10
2.5. Métodos enzimáticos	11
2.5.1. Inmovilización enzimática.....	12
2.5.2. Tipos de soportes enzimáticos	13
3. HIPÓTESIS	18
4. OBJETIVOS	19
4.1. Objetivo general	19
4.2. Objetivos particulares	19
5. METODOLOGÍA	20
5.1. Sitio de estudio	20
5.2. Objetivo específico 1. Determinar el efecto del material híbrido fotocatalítico magnético en la remoción del rojo Congo en agua.	20

5.2.1.	Síntesis del soporte.....	20
5.2.2.	Evaluación del efecto de la radiación UV sobre el soporte en la degradación de rojo Congo	21
5.3.	Objetivo específico 2. Determinar el efecto de las condiciones de entrecruzamiento entre el soporte híbrido fotocatalítico magnético en la actividad enzimática.	22
5.3.1.	Inmovilización de la enzima en el soporte.....	22
5.3.2.	Medición de la actividad enzimática	23
5.4.	Objetivo específico 3. Caracterizar las propiedades físicas, químicas y bioquímicas de la enzima inmovilizada en el soporte híbrido fotocatalítico magnético.	23
5.4.1.	Efecto del pH y temperatura sobre la actividad lacasa	23
5.4.2.	Evaluación de la degradación de rojo Congo.....	24
5.4.3.	Evaluación de la reutilización del sistema	24
5.4.4.	Caracterización de la enzima inmovilizada al soporte fotocatalítico	25
5.5.	Análisis estadístico	25
5.6.	Consideraciones éticas	25
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
6.1.	Síntesis del soporte	26
6.2.	Evaluación del efecto de la radiación UV sobre los soportes en la degradación de rojo Congo	28
6.3.	Inmovilización de la enzima al soporte.....	32
6.4.	Efecto del pH y temperatura sobre la actividad de la lacasa inmovilizada.....	34
6.5.	Evaluación de la degradación de rojo Congo	36
6.6.	Evaluación de la reutilización del sistema	38
6.7.	Caracterización de la enzima inmovilizada al soporte fotocatalítico	40
7.	CONCLUSIONES	43
8.	REFERENCIAS.....	44

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Principales métodos para el tratamiento de aguas residuales (Rashid et al., 2021)	8
2	Uso de lacasa inmovilizada para la degradación de contaminantes en agua	16
3	Posiciones de los picos (cm ⁻¹) de los modos vibracionales de la anatasa pura (Mahdjoub, et al., 2010)	27
4	Actividad, rendimiento, eficiencia y recuperación de actividad de la lacasa inmovilizada a diferentes valores de pH.	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Espectro Raman del polvo de dióxido de titanio (TiO ₂), línea azul corresponde al material sin tratamiento térmico y la morada al material con tratamiento térmico.	26
2	Evaluación del efecto de la luz solar sobre los soportes de relación 1:1, 1:2 y 2:1 en la degradación de rojo Congo a concentraciones de 400 mg L ⁻¹ y 600 mg L ⁻¹ . Los datos representan la media para las replicas (n=3).	29
3	Evaluación del efecto de la luz UV sobre los soportes de relación 1:1, 1:2 y 2:1 en la degradación de rojo Congo a concentraciones de 400 mg L ⁻¹ y 600 mg L ⁻¹ , usando una lámpara UV de 254 nm. Los datos representan la media para las replicas (n=3).	30
4	Tiempo de degradación media del rojo Congo obtenido con cada tipo de soporte (relación 1:1, 1:2 y 2:1) al evaluar en concentraciones de rojo Congo de 400 mg L ⁻¹ y 600 mg L ⁻¹ usando usando luz solar y lámpara UV de 254 nm	31
5	Efecto del pH (A) y temperatura (B) en la actividad de la enzima libre e inmovilizada con ABTS 0.5 mM.	35
6	Evaluación del efecto de la luz solar (A) y lámpara UV de 254 nm (B) sobre la enzima inmovilizada (S + E _{activa}), el soporte con la enzima inactiva (S + E _{inactiva}) y el soporte	37

en la degradación de rojo Congo (800 mg L⁻¹) a pH 5 y a una temperatura de 50 °C. Los datos representan la media para las replicas (n=3).

7	Tiempo de degradación media de la enzima inmovilizada, el soporte con enzima inactiva y el soporte contra rojo Congo (800 mg L ⁻¹) con luz solar	38
8	Tiempo de degradación media de la enzima inmovilizada, el soporte con enzima inactiva y el soporte contra rojo Congo (800 mg L ⁻¹) con lámpara UV de 254 nm	39
9	(A) Distribución del volumen de poro y volumen de poro del material. (B) Isotherma de adsorción del soporte con la enzima inmovilizada	41
10	Espectro de FTIR de (A) quitosano, (B) Fe ₃ O ₄ , (C) lacasa, (D) TD@Fe ₃ O ₄ @Quitosano y (E) TD@Fe ₃ O ₄ @Quitosano@Lacasa	42

RESUMEN

Los colorantes azo son uno de los compuestos principales en los efluentes de la industria textil. Estos son tóxicos y recalcitrantes que al desecharse en cuerpos de agua pueden causar problemas ambientales. En este trabajo se evaluó la degradación del colorante rojo Congo en agua utilizando una lacasa inmovilizada a un soporte híbrido fotocatalítico y magnético. El dióxido de titanio (TD), usado como material fotocatalítico, se obtuvo por síntesis sonoquímica. Se evaluó el efecto de la radiación UV sobre los soportes híbridos para degradar el colorante usando una lámpara UV de 254 nm y luz solar. Posteriormente, se entrecruzó la enzima con el material híbrido, variando el pH de la reacción para identificar su efecto sobre el rendimiento de inmovilización. La actividad enzimática se determinó con 2,2'-azino-bis(3-etilbenzo-tiazolin-6-ácido sulfónico) y se cuantificó la proteína soluble con el ensayo de Bradford. Se evaluó el efecto del pH, temperatura y la radiación UV sobre la actividad de la lacasa inmovilizada para degradar el colorante. Finalmente se caracterizó la estructura del sistema enzima-soporte. En la síntesis de los soportes se obtuvo un rendimiento de sólidos promedio del 73.59%. Se evaluaron las proporciones 1:1, 1:2 y 2:1 de TD:Fe₃O₄ contra rojo Congo a concentraciones de 400 y 600 mg L⁻¹. El soporte 2:1 fue el más eficiente en la remoción de rojo Congo (400 mg L⁻¹), siendo 16.8 y 2.2 veces más rápido que los soportes 1:1 y 1:2 respectivamente. El rendimiento y actividad de inmovilización a pH 5 se vio estadísticamente favorecida comparada con los otros pH evaluados. La inmovilización de la lacasa en este soporte optimizó su actividad enzimática y aumentó su estabilidad ante cambios de pH y temperatura. La aplicación de soportes con actividad fotocatalítica para inmovilizar enzimas podría ser una tecnología viable en plantas de tratamiento de aguas residuales industriales, especialmente en las industrias de textiles y tintes, donde se emplean con frecuencia colorantes azo.

Palabras clave: rojo Congo, lacasa, soporte híbrido, inmovilización enzimática, colorantes azo

ABSTRACT

Azo dyes among the primary compounds found in textile industry effluents. They are toxic, recalcitrant, and can cause environmental issues when discharged into water bodies.. In this study, the degradation of Congo red dye in water was evaluated using immobilized laccase on a hybrid photocatalytic and magnetic support. Titanium dioxide (TD), the photocatalytic material, was synthesized through a sonochemical method. The effect of UV radiation on the hybrid supports for dye degradation was assessed using a UV lamp at 254 nm and sunlight. Subsequently, the enzyme was cross-linked with the hybrid material, and the reaction pH was varied to determine its effect on immobilization efficiency. Enzymatic activity was measured using 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), and soluble protein was quantified using the Bradford assay. The effects of pH, temperature, and UV radiation on the activity of the immobilized laccase for dye degradation were also evaluated. Finally, the structure of the enzyme-support system was characterized. During the synthesis of the supports, an average solid yield of 73.59% was achieved. Ratios of 1:1, 1:2, and 2:1 of TD:Fe₃O₄ were tested against Congo red at concentrations of 400 and 600 mg L⁻¹. The 2:1 support was the most efficient at removing Congo red (400 mg L⁻¹), being 16.8 and 2.2 times faster than the 1:1 and 1:2 supports, respectively. The performance and immobilization activity at pH 5 was statistically favored compared to the other pH levels evaluated. The immobilization of laccase on this support optimized its enzymatic activity and enhanced its stability against pH and temperature variations. The use of photocatalytic supports for enzyme immobilization could be a viable technology in industrial wastewater treatment plants, particularly in the textile and dye industries, where azo dyes are commonly used.

Key words: azo dye, Congo red, laccase, enzymatic immobilization, hybrid support

1. INTRODUCCIÓN

La actividad humana, la industrialización, el crecimiento poblacional, el desarrollo tecnológico, la elaboración de productos, entre otras actividades, generan una amplia variedad de desechos. Los cuales, si no se tratan adecuadamente, pueden perjudicar al ambiente. Los humanos estamos expuestos a estos contaminantes, que pueden llegar a comprometer nuestra salud, y nuestros recursos. Uno de ellos, y uno de los más importantes, el agua. Desarrollar métodos que permitan remover contaminantes de manera efectiva y eficiente son de creciente importancia para disminuir, y evitar la afectación al ambiente. Una alternativa ampliamente usada para el tratamiento de agua son los métodos biológicos. Estos son atractivos ya que son asequibles, no generan subproductos tóxicos, son biodegradables, y sencillos. En estos se emplean microorganismos o enzimas. El uso de estas últimas se ha popularizado debido a que son las principales responsables de la degradación de contaminantes durante los tratamientos biológicos de aguas residuales. Sin embargo, su uso se ve limitado ya que tienden a perder su actividad catalítica durante el proceso de tratamiento. Con la finalidad de mejorar su estabilidad y permitir el reuso de la enzima se ha optado por su inmovilización a un soporte. En años recientes, se han desarrollado materiales híbridos para la inmovilización enzimática que le confieran propiedades más adecuadas a la proteína y su actividad se vea favorecida. En el presente trabajo se determinó la degradación de rojo Congo en agua mediante el uso de lacasa inmovilizada a un soporte híbrido fotocatalítico magnético.

2. ANTECEDENTES

2.1. La contaminación del agua

Durante el último siglo, la contaminación del agua se ha vuelto una preocupación creciente (Jun et al., 2019). A pesar de que tres cuartas partes del planeta son agua, solo el 2.5 % corresponde a agua dulce, y cerca del 70 % de esta agua se encuentra inaccesible en glaciares y mantos profundos. El agua disponible para usarse en actividades humanas está distribuida en aguas subterráneas y aguas superficiales, las cuales retienen menos del 1 % del agua dulce no congelada. El desarrollo de la humanidad además de representar un incremento en el consumo de este líquido también trae consigo la generación de aguas residuales. Se estima que a nivel mundial entre el 85 y 90 % del agua residual se descarga sin recibir ningún tratamiento previo (SEMARNAT, 2022).

La descarga de aguas residuales, de diferentes orígenes, municipales, agrícolas e industriales sin tratamiento provoca la contaminación de las aguas superficiales y subterráneas, lo cual pone en riesgo la salud humana y la integridad de los ecosistemas. La contaminación del agua se determina mediante su caracterización física y química, y su comparación con estándares y normas de calidad. Esta evaluación principalmente se realiza con base a cuatro indicadores: Demanda Bioquímica de Oxígeno a cinco días (DBO_5), Demanda Química de Oxígeno (DQO), Sólidos Suspendidos Totales (SST) y Coliformes Fecales (CF). Los SST indican la cantidad de sólidos sedimentables, sólidos y materia orgánica en suspensión y coloidal. El incremento de los SST hace que un cuerpo de agua pierda la capacidad de soportar la diversidad acuática. La DBO_5 y la DQO son indicadores de la cantidad de materia orgánica que se encuentra en el agua. La DBO_5 se refiere a la cantidad de materia orgánica biodegradable, en tanto que la DQO indica el total de materia orgánica. El incremento de DBO_5 tiene como efecto la disminución de los niveles de oxígeno disueltos en los cuerpos de agua ocasionando consecuencias negativas en los ecosistemas acuáticos. EL aumento

de DQO indica la presencia de sustancias provenientes de descargas de aguas residuales de origen agrícola o industrial (CONAGUA, 2018).

Las aguas residuales producidas en 2017 generaron 2 millones de toneladas de DBO_5 , siendo las aguas industriales las que aportaron mayor cantidad de contaminantes orgánicos, y hasta 3 veces más contaminación que la generada por las aguas municipales. La descarga de aguas industriales en México ha aumentado, entre el 2000 y 2014, se incrementó 19.6 %, pasando de 169.9 a 211.4 $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$. En 2015, las descargas fueron de alrededor 6.67 miles de km^3 al año (211.4 $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$), de los cuales se trataron 2.07 miles de km^3 al año (65.6 $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$) (SEMARNAT, 2022). Actualmente los sectores industriales agroalimentario, del papel, y textil son considerados los de mayor consumo de agua y mayor aporte de contaminantes (Crini y Lichtfouse, 2018).

2.2. La industria textil y los colorantes

Desde el siglo XIX en varios países de América Latina se hizo evidente un importante crecimiento del sector industrial. El desarrollo de la industria textil en México fue la punta de lanza del crecimiento industrial (Gómez-Galvarriato, 1999). Hasta 2002, era uno de los sectores más importantes dentro de la manufactura nacional en términos de empleo, unidades económicas y valor agregado bruto que generaba (Rodríguez y Fernández, 2006).

Los efluentes de esta industria están compuestos de altas cantidades de colorantes, DQO, DBO, SST y metales pesados. Siendo los colorantes el componente principal de estas aguas debido a su alta concentración (Sushvanth et al., 2021).

En un inicio los colorantes eran producidos a pequeña escala a partir de materiales naturales como plantas e insectos. Sin embargo, tenían la desventaja de una limitada variedad de colores, así como tonalidades apagadas que se desteñían cuando se exponían al sol y con los lavados (Katheresan et al., 2018).

En 1856 se elaboró el primer colorante sintético, para 1970 cerca del 60 % eran de este tipo (Selvaraj et al., 2021). Estos vinieron a resolver los inconvenientes que presentaban los colorantes naturales. En la actualidad los colorantes sintéticos son los más utilizados en la industria textil (Katheresan et al., 2018). Estos generalmente están hechos de subproductos del petróleo y minerales (Sarkar et al., 2017). Debido a que están diseñados para ser estables a procesos químicos y fotoquímicos son altamente persistentes en el ambiente. En general son sustancias recalcitrantes, bio-acumulativas, tóxicas, mutagénicas y carcinogénicas (Ardila-Leal et al., 2021).

En la industria textil se usan alrededor de 100 L de agua para producir 1 kg de tela, durante este proceso se tiñe, y se estima que hasta el 50 % del colorante no se adhiere a esta, resultando en una alta concentración remanente en las aguas después del proceso de tinción. Además, durante el proceso de síntesis y teñido, alrededor de un 10 a 15 % de la mezcla es liberada en cuerpos de agua (Srivastava et al., 2021). La mayoría de los colorantes son visibles a concentraciones de 1 mg L^{-1} , los efluentes provenientes del proceso textil liberan agua con altas concentraciones en el rango de 10 a 200 mg L^{-1} , lo cual puede causar problemas estéticos y ambientales (Selvaraj et al., 2021).

Existen más de 100, 000 tipos de colorantes comercialmente disponibles y se estima que se producen cerca de 700, 000 toneladas anualmente en el mundo, de los cuales cerca del 70 % corresponde a colorantes tipo azo (Bukola et al., 2022).

2.3. Colorantes azo

Los colorantes azo son el grupo más amplio de colorantes sintéticos aromáticos usados en la industria textil debido a que su síntesis es simple, se adhieren mejor que otros a las telas, y no se decoloran fácilmente. Estos constan de uno o más grupos azo ($-\text{N}=\text{N}-$) los cuales le confieren alta estabilidad a la molécula. Basados en el número de grupos azo, se pueden clasificar en mono-azo, diazo, triazo o poliazos. El grupo azo es el cromóforo del colorante, tienen la característica de

atraer electrones y su presencia es la responsable del color de la molécula tras la absorción de luz visible. También contienen uno o más auxocromos que son donadores de electrones, como aminas, grupos carboxilo, hidroxilo, entre otros, y le confieren al colorante alta solubilidad en agua, así como una alta adherencia a la tela. El número total de enlaces azo, grupos funcionales, y su acomodo influyen en gran medida su capacidad de degradación (Sreedharan y Bhaskara Rao, 2019).

Aunque generalmente la toxicidad aguda de la mayoría de los colorantes azo ronda valores de dosis letal media entre 250 y 2000 mg kg⁻¹ de peso corporal, las propiedades mutagénicas o carcinogénicas de algunos de ellos confirmadas en animales se debe principalmente a sus productos metabolizados (Weldegebrieal, 2020). Debido a la facilidad de ser inhalados, o su rápida solubilización en agua, los colorantes azo pueden ser fácilmente absorbidos por la piel lo cual lleva al riesgo de reacciones alergias, irritación ocular, cáncer, entre otros (Selvaraj et al., 2021). Se ha observado que los colorantes azo que contienen como base bencidina, como el colorante rojo Congo, son reconocidos como agentes potencialmente capaces de producir cáncer en humanos y tumores en animales (Sarkar et al., 2017). Este colorante es abundante en los efluentes de la industria textil, es un colorante diazo y se prepara por acoplamiento de bencidina tetrazotizada con dos moléculas de ácido naftiónico. Tiene una coloración roja en un rango de pH de 5 a 10, y es el primer colorante sintético capaz de teñir algodón directamente. Es muy sensible a ácidos, y su color cambia de rojo a azul en presencia de ácidos orgánicos por debajo de pH 5 (Purkait, Maiti, DasGupta, y De, 2007). Se ha reportado ser extremadamente carcinogénico y tóxico para el ambiente y para el ser humano (lark et al., 2019).

La descarga de colorantes azo y sus subproductos tóxicos, mutagénicos y de alta persistencia pueden conducir a serios problemas ambientales. Por lo tanto, el tratamiento de aguas residuales provenientes de la industria textil es necesario antes de su descarga final al ambiente (Sun et al., 2022).

2.4. Métodos para la remoción de colorantes

En general la remoción de contaminantes en aguas residuales se hace mediante procesos físicos, químicos y biológicos como podemos ver en el Cuadro 1, los cuales tienen la intención de encontrar la manera más rentable y eficiente de lograrlo.

Cuadro 1. Principales métodos para el tratamiento de aguas residuales (Rashid et al., 2021)

Físicos	Químicos	Biológicos
Adsorción	Ozonización	Microorganismos
Coagulación/ Floculación	Procesos avanzados de oxidación	Enzimáticos
Filtración con membrana		

2.4.1. Métodos físicos

La transferencia de masa es la base de la remoción de contaminantes por métodos físicos. Estos métodos se emplean debido a su simplicidad, flexibilidad, alta eficiencia, y bajo requerimiento de reactivos. Dentro de los métodos físicos la adsorción es considerado el método más rentable en relación costo y efectividad. En este proceso básicamente el soluto, es decir, el contaminante, es transportado de una fase líquida a la superficie de una fase sólida, y mediante interacciones fisicoquímicas el soluto adsorbido se queda unido a la superficie sólida llamada adsorbente. Su eficiencia de remoción puede alcanzar hasta un 99.9% dependiendo del tipo de adsorbente que se utilice. Sin embargo, algunas desventajas de este método son la limitada eficiencia de adsorción asociada a

cada tipo de adsorbente, actualmente no se ha encontrado un solo adsorbente efectivo para la remoción de diferentes tipos de contaminantes (Alghamdi et al., 2019).

Otro de los métodos físicos es la coagulación o floculación, esta se utiliza para alcanzar la máxima remoción de DQO, fosforo total (FT), y SST. Ha sido ampliamente usada por su alta capacidad, bajo costo y eficiente remoción de colorantes. En este proceso se adicionan floculantes al agua residual para convertir los sólidos disueltos y suspendidos en agregados de mayor tamaño que pueden removerse mediante sedimentación. Algunas limitaciones de este método son su baja eficiencia para remover colorantes altamente solubles y de bajo peso molecular, además de generar lodos (Bal y Thakur, 2022).

La separación de colorantes y materia orgánica usando filtración es otro de los métodos físicos, usado debido a que es económico, efectivo y eficiente para tratar aguas residuales de distintas industrias. Sin embargo, el desarrollo de una membrana con la suficiente estabilidad térmica continúa siendo uno de los mayores retos (Rashid et al., 2021).

2.4.2. Métodos químicos

Los métodos químicos de remoción de colorantes más prometedores son los procesos avanzados de oxidación (PAO) (Bal y Thakur, 2022). Estos se basan en el uso del radical hidroxilo, un poderoso agente oxidante, que permite la transformación de los contaminantes en CO_2 , agua, e iones inorgánicos o bien en un compuesto menos complejo. Ya que los PAO pueden resultar costosos para lograr alta eficiencia de remoción de contaminantes, estos tratamientos pueden ser aplicados para mejorar la degradabilidad de las aguas residuales, permitiendo el uso de procesos biológicos. La fotocatalisis heterogénea es una excelente alternativa, ya que no emplea CO_3 o H_2O_2 que son bactericidas, y puede realizarse en condiciones ambiente. El dióxido de titanio (TiO_2) es el más empleado como material fotocatalítico ya que es insoluble en la mayoría de las condiciones de

operación, es estable y no tóxico. (Silva, Gonçalves, y Raddi de Araujo, 2019). Sin embargo, estos métodos son comercialmente poco atractivos, ya que requieren equipo específico y alto consumo de energía eléctrica. Otra característica poco deseable es la generación de contaminación secundaria (Katheresan et al., 2018).

2.4.3. Métodos biológicos

El tratamiento por métodos biológicos es un enfoque amigable con el ambiente, asequible, que puede ser utilizado efectivamente en el tratamiento aguas residuales industriales. Debido a su diversidad genética y versatilidad, esta es una de las alternativas más efectivas para la degradación y mineralización de contaminantes. Este proceso puede llevarse a cabo bajo condiciones aerobias, anaerobias o anaerobias facultativas usando diferentes tipos de microorganismos (Kishor et al., 2021). Diferentes grupos taxonómicos como bacterias, hongos y algas han sido ampliamente usados para degradar colorantes. El tratamiento con bacterias tiene un alto potencial para la degradación de contaminantes, son sencillas de cultivar y crecen más rápido que otros microorganismos. Se ha estudiado que estas en condiciones aeróbicas son capaces de decolorizar colorantes azo. Sin embargo, existen otras bacterias que lo hacen en condiciones anaerobias. El uso de consorcios microbianos permite ventajas significativas sobre el uso de cultivos puros. Diferentes cepas pueden atacar al contaminante en diferentes puntos, incluso los productos metabólicos de una cepa pueden ser usados como sustrato de otra. Además de usar consorcios bacterianos, se pueden emplear cultivos de hongos, estos son capaces de remover colorantes mediante bioadsorción y biodegradación. Existen muchos tipos de hongos ligninolíticos los cuales solubilizan el sustrato produciendo enzimas extracelulares altamente oxidativas como lacasa, manganeso peroxidasa, o lignina peroxidasa.

Otro enfoque es la construcción de humedales, en donde las plantas proveen un hábitat y nutrientes a microorganismos rizosféricos y endofíticos mientras, estos

ayudan a la planta hospedadora al ganar más biomasa al reducir los contaminantes, promoviendo el crecimiento de ella, y acelerando el rendimiento del tratamiento. Los humedales son generalmente de dos tipos horizontales o verticales, y pueden funcionar en condiciones aerobias y anaerobias. En la primera condición la carga orgánica se remueve adecuadamente, pero el color no se reduce significativamente; mientras que en la segunda condición, el color se remueve eficientemente, pero los compuestos orgánicos no. La desventaja de este método es que involucra grandes extensiones de tierra, facilita la crianza de mosquitos, requiere alto monitoreo, necesita periodos largos para establecer la vegetación y condiciones de tratamiento óptimo (Kishor et al., 2021).

Los microorganismos usados para tratar estas aguas tienen en común el uso de enzimas para la degradación y decoloración de los colorantes azo bajo determinadas condiciones (Sreedharan y Bhaskara Rao, 2019).

2.5. Métodos enzimáticos

El uso de enzimas para la degradación de colorantes ha captado la atención en los últimos años ya que ha demostrado resultados prometedores (Amari et al., 2021). En el caso de la degradación de colorantes azo, dos familias enzimáticas han mostrado gran potencial, las azoreductasas y las lacasas. Estas últimas presentan gran potencial para decolorizar una amplia variedad de colorantes industriales (Singh et al., 2015).

Las lacasas son las proteínas más comunes de la familia de oxidasas azules que contienen cobre. Se caracterizan por su baja especificidad de sustrato, no requieren cofactores, y tienen un alto potencial redox, en especial las fúngicas comparadas con las provenientes de plantas y bacterias. Debido a estas características son usadas en la degradación de varios contaminantes en agua, incluyendo los colorantes textiles (Lark et al., 2019). Estas enzimas decoloran los colorantes azo mediante un mecanismo de radicales libres altamente inespecíficos

formando compuestos fenólicos, y previniendo la formación de aminas aromáticas tóxicas (Singh et al., 2015).

Sin embargo, la aplicación industrial de las enzimas se ve obstaculizada por su pérdida de actividad catalítica. Esta es causada principalmente por su desnaturalización, debido a condiciones de operación poco favorables de pH y temperatura, las cuales provocan la alteración conformacional de la enzima. La cual al perder su estructura se inactiva y no puede llevar a cabo la oxidación de los contaminantes (Jun et al., 2019). Por otra parte, el uso de la enzima libre puede generar contaminación secundaria, no permite su reuso una vez finalizado el proceso, lo cual aumenta el costo del tratamiento. En años recientes, se ha reportado el uso de enzimas inmovilizadas a un soporte sólido para aumentar así su estabilidad y rendimiento, dándole la ventaja de poder reutilizarse, y volviéndolas atractivas para su uso en la industria (Ladole et al., 2020).

2.5.1. Inmovilización enzimática

La inmovilización enzimática puede clasificarse de acuerdo con la interacción entre la enzima y el soporte, como métodos físicos y químicos. Los métodos físicos se basan principalmente en interacciones de Van der Waals, fuerzas electrostáticas, y puentes de hidrógeno entre la enzima y el soporte (Cen et al., 2019). La proteína puede ser adsorbida a la superficie del material o bien puede ser atrapada dentro de él (Imam et al., 2021). Sin embargo, debido a que la unión enzima-soporte se da por interacciones débiles estas pueden ser afectadas por cambios en la fuerza iónica del medio, cambios de pH, temperatura, flujo del reactor, agitación y colisión de partículas, ocasionando la filtración de la enzima fuera del soporte (Filho et al., 2019).

En los métodos de inmovilización químicos la unión se da mediante enlaces covalentes entre las cadenas de aminoácidos de la enzima y los grupos funcionales del soporte. A causa de que es un enlace fuerte, la inmovilización química provee alta estabilidad y fuerte unión de esta al soporte, obteniendo una

estructura rígida. Esta rigidez puede mantener la estructura enzimática inalterada contra agentes desnaturalizantes, solventes orgánicos, condiciones extremas de pH y temperatura, entre otros. No obstante, el enlace puede alterar el sitio activo de la proteína, provocando su inactivación. Una manera de disminuir este efecto es el uso de agentes de entrecruzamiento. Uno de los más utilizados es el glutaraldehído. Este agente tiene grupos aldehído que pueden interactuar con el soporte y simultáneamente con los grupos amino de la enzima facilitando el enlace covalente y formando una amida la cual mantiene la rigidez de la interacción (Filho et al., 2019). De acuerdo a lo anterior, la actividad biocatalítica de la lacasa puede mejorarse mediante su inmovilización usando un material adecuado (Amari et al., 2021).

2.5.2. Tipos de soportes enzimáticos

El soporte tiene la función principal de proteger a la enzima de ser inactivada o degradada, y facilita la separación y el reuso de la misma. Estos están clasificados en materiales orgánicos, inorgánicos e híbridos. Los soportes de materiales orgánicos a su vez se dividen en polímeros naturales y sintéticos. Entre los naturales se encuentran la lignina, quitina, alginato, quitosano, entre otros (Zahirinejad et al., 2021). El quitosano es un derivado del desperdicio del caparazón de crustáceos o de hongos, y es uno de los polímeros naturales más estudiados como soporte debido a su bajo costo, disponibilidad a gran escala, biodegradabilidad, nula toxicidad, y propiedades bioadhesivas (Federsel et al., 2021). Este biopolímero se usa regularmente para nanomateriales. Particularmente ha sido usado para remover colorantes en el tratamiento de agua (Sarkar et al., 2020). La desventaja principal de estos materiales orgánicos naturales se debe a su baja resistencia contra el crecimiento de microorganismos y variaciones de temperatura (Zahirinejad et al., 2021). Los polímeros sintéticos tienen la ventaja de que los monómeros que lo conforman pueden ser seleccionados de acuerdo con los requerimientos de la enzima y el método de inmovilización a emplear. Sin embargo, la síntesis del polímero con las

características deseadas y grupos funcionales es generalmente un proceso que consume mucho tiempo y es costoso, en comparación con los polímeros naturales (Zdarta et al., 2018).

El uso de soportes fabricados con materiales inorgánicos presenta notables ventajas en comparación con los materiales orgánicos, destacando su alta resistencia química, mecánica y térmica, así como su capacidad para ser reutilizados de manera eficiente. Además, estos soportes exhiben resistencia al crecimiento de microorganismos, lo que los convierte en un sustrato poco propicio para bacterias u hongos (Ashkan et al., 2021).

Estos materiales incluyen sílicas y óxidos metálicos. Los cuales presentan una gran área superficial, esta característica les permite una mayor carga enzimática y menor resistencia a la transferencia de masa al sustrato. Las estructuras de estos materiales tienen grupos hidroxilo en la superficie que favorece su funcionalización y, consecuentemente, la unión por enlace covalente de la lacasa a la matriz es posible. Entre los óxidos metálicos han sido ampliamente usados para la inmovilización de lacasa el óxido de aluminio, óxido de hierro metálico y el dióxido de titanio (TD) (Daronch et al., 2020).

El dióxido de titanio, en particular, ha ganado relevancia debido a sus excepcionales propiedades, como su bajo costo, alta estabilidad, no toxicidad y naturaleza inerte. Además este material presenta actividad fotocatalítica, lo que le permite por sí mismo degradar contaminantes orgánicos e inorgánicos. La radiación con luz (ultravioleta) crea pares electrón-hueco. Entonces, los electrones en la banda de conducción generan superóxidos, mientras que los huecos en la banda de valencia generan radicales hidroxilo, los cuales llevan a descomponer compuestos (Messemeche et al., 2020). El TD se puede encontrar en tres fases: broquita, rutilo y anatasa. Esta última ha mostrado mejor actividad fotocatalítica debido a sus propiedades fisicoquímicas como lo son mayor área superficial

comparada con rutilo, menor tamaño de banda prohibida (3.2 eV) y mayor movilidad del portador de carga (Ahmad, Alakhras, Al-Bataineh, y Telfah, 2023).

Derivado de las características y propiedades únicas de los materiales orgánicos e inorgánicos, se han realizado varios estudios con la finalidad de combinar dichos materiales para maximizar sus beneficios. Estos son una combinación de los anteriores, y se les conoce como híbridos (Zdarta et al., 2018). Ya que hay materiales orgánicos e inorgánicos, existen tres tipos de híbridos: inorgánicos-inorgánicos, orgánicos-orgánicos, e inorgánicos-orgánicos. La combinación de materiales inorgánicos, como el óxido de zinc, óxido de titanio u óxido de hierro magnético, con un material orgánico, como un polímero natural, alginato, lignina o quitosano, permiten la obtención de un material con alta estabilidad, resistencia mecánica y que preserva alta afinidad a las moléculas biológicas. Su alta estabilidad e inercia química se atribuyen al componente inorgánico mientras que su alta habilidad para unirse a las enzimas viene del polímero orgánico (Zahirinejad et al., 2021).

Uno de los materiales inorgánicos que esta ganando popularidad para elaborar materiales compuestos es la magnetita (Fe_3O_4). Los materiales híbridos, al incorporar magnetita, no solo contribuye a la resistencia y estabilidad del soporte, sino que también facilita la manipulación del mismo mediante la aplicación de campos magnéticos externos. Esto es particularmente beneficioso en aplicaciones donde se busca una fácil recuperación y separación del soporte de la mezcla. Debido a que por si sola es muy inestable es importante funcionalizarla con otros materiales modificando su superficie con materiales orgánicos o inorgánicos (Liu et al., 2020).

En el Cuadro 2 se muestran algunos trabajos empleando lacasa inmovilizada y el efecto en su actividad para la degradación de contaminantes, en donde de acuerdo con los diferentes autores citados en el cuadro, la inmovilización de la

enzima al soporte le confirió mayor estabilidad, permitió su reuso, y facilitó su remoción del sistema.

Cuadro 2. Uso de lacasa inmovilizada para la degradación de contaminantes en agua

Soporte	Fuente de lacasa	Substrato	Degradación	Condiciones de proceso	Referencia
Nanotubos de carbono (CNTS)	<i>Trametes versicolor</i>	Rojo Congo	CNTS-lacasa 96 % CNTS 80 %	180 min, pH 7, 25 °C, lacasa 0.03 g L ⁻¹ , CNTS 0.04 g L ⁻¹	Zhang, Yang, Luo, Shi, y Meng, (2020)
MOF magnético amino funcionalizado	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	2, 4-diclorofenol	Fe ₃ O ₄ -NH ₂ @MIL-101(Cr)-lacasa 87 % Fe ₃ O ₄ -NH ₂ @MIL-101(Cr) 67 %	Lacasa 1 g L ⁻¹ , 12 horas, 2, 4-diclorofenol 10 mg L ⁻¹ , 25 °C	Wu et al., (2019)
Nanofibras de poliamida 6 y quitosano PA6/CHIT	<i>Trametes versicolor</i>	1) Bisfenol A y 2) 17 α-etinilestradio I	1) 92 % 2) 100 % PA6/CHIT 1) 1.7 % 2) 0.6 %	PA6/CHIT-lacasa 1 mg, 3 ml contaminante, 37 °C, 6 horas	Maryšková et al., (2016)

En este contexto, un soporte ideal debería ser un material que mantenga su estabilidad física frente a deformaciones mecánicas, sea inerte con respecto a la proteína, biológicamente compatible, resistente contra invasores microbianos, no tóxico, comercialmente disponible y de bajo costo (Zahirinejad et al., 2021). Los soportes híbridos se presentan como una opción que puede satisfacer estos criterios, ya que al combinar las propiedades de varios materiales, pueden diseñarse con la intención de lograr una fácil separación del sistema, exhibir alta resistencia mecánica y mejorar la eficiencia en la remoción de contaminantes (Daronch et al., 2020).

3. HIPÓTESIS

La degradación de rojo Congo por la lacasa inmovilizada al soporte híbrido se verá estadísticamente favorecida al compararse con la enzima libre, esto debido a las propiedades que el soporte le conferirá a la enzima. La parte fotocatalítica proveerá con electrones a la enzima facilitando las reacciones de la misma, y los huecos generados en el TiO_2 contribuirán a la degradación del contaminante. La parte magnética permitirá la fácil recuperación del sistema enzima-soporte. La estabilidad que aporta la inmovilización permitirá el reuso del sistema

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar la degradación de rojo Congo en agua por una lacasa inmovilizada a un soporte híbrido fotocatalítico magnético.

4.2. Objetivos particulares

- Determinar el efecto del material híbrido fotocatalítico magnético en la remoción del rojo Congo en agua.
- Determinar el efecto de las condiciones de entrecruzamiento entre el soporte híbrido fotocatalítico magnético en la actividad enzimática.
- Caracterizar las propiedades físicas, químicas y bioquímicas de la enzima inmovilizada en el soporte híbrido fotocatalítico magnético.

5. METODOLOGÍA

5.1. Sitio de estudio

Planta piloto de biotecnología, Parque Biotecnológico, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro.

5.2. Objetivo específico 1. Determinar el efecto del material híbrido fotocatalítico magnético en la remoción del rojo Congo en agua.

5.2.1. Síntesis del soporte

El dióxido de titanio (TD) se obtuvo por la técnica de sonicación de acuerdo con Calvo-Ramos et al.(2020), se usaron 50 mL de agua destilada, con una relación de 1 mol de isopropóxido de titanio (IV) por cada 36 moles de etanol, y 0.5 mol de ácido nítrico (HNO_3). El agua se mezcló con el HNO_3 . El etanol se vertió con el isopropóxido en atmósfera inerte, para después añadir el agua con HNO_3 . Después la mezcla se colocó en baño ultrasónico a 45 kHz con una potencia del 90 % por 4 horas. Para posteriormente ser secado y someterse a tratamiento térmico a 450 °C durante 3 h. Bajo estas condiciones se buscó obtener el TD en fase anatasa. Las partículas de magnetita (Fe_3O_4) se prepararon por medio de coprecipitación *in situ* de una mezcla en relación molar 2:1 ($\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+}$) de cloruro férrico (FeCl_3) y cloruro ferroso (FeCl_2) de acuerdo con lo descrito por Díaz-Hernández et al. (2018), y se precipitaron las partículas usando agua destilada y etanol en una relación 1:1 v/v. Para la síntesis del soporte primero se incorporó el quitosano, se usó una solución al 3 % v/v de ácido acético y se calentó hasta 70 °C para disolverlo. Una vez disuelto se añadió la Fe_3O_4 y el TD. Seguido de incorporar estos reactivos, la solución inmediatamente se colocó en baño ultrasónico por 10 min a 70 % de amplitud para dispersar las partículas. Después de eso, la suspensión obtenida se precipitó adicionando una solución de NaOH (20 % p/v): etanol (96 % v/v) en una proporción en volumen de 4:1. Posteriormente la mezcla se mantuvo bajo agitación a 60 rpm durante 18 h. Para recuperar el

precipitado se llevó a centrifugación durante 5 min a 7, 000 rpm, y se lavó con una mezcla de tampón de fosfatos 50 mM pH 7.0 y etanol (96 % v/v) en una proporción en volumen de 1:1 para su neutralización. Después de neutralizar los sólidos, estos se secaron en un horno a 80 °C durante 5 h, para después ser triturados en un mortero hasta obtener un polvo fino. Se evaluaron tres relaciones de material TD:Fe₃O₄ que permita la mayor degradación de colorante, las relaciones por evaluar fueron 1:1, 2:1 y 1:2. El rendimiento de los sólidos (% p/p) obtenidos se determinó multiplicando por 100 la relación en peso de sólidos finales con los iniciales.

5.2.2. Evaluación del efecto de la radiación UV sobre el soporte en la degradación de rojo Congo

La decolorización del colorante azo rojo Congo en presencia de luz UV se usó para investigar la actividad fotocatalítica de los soportes TD@Fe₃O₄@Quitosano, usando una lámpara UV y radiación solar (Calvo-Ramos et al., 2020). El experimento se llevo a cabo con concentraciones conocidas del colorante. Primero se colocaron 25 ml del colorante en un vaso de precipitado, y se les añadió 0.375 g, 0.056 g y 0.0281 g de soporte de relación 1:1, 1:2 y 2:1 respectivamente, con la intención de mantener la misma cantidad de TD (0.0125 g) en cada evaluación. El experimento con luz solar se mantuvo durante 90 min, mientras que con lámpara UV fueron 20 min. En todas las evaluaciones se mantuvo agitación constante. Se tomaron muestras a diferentes intervalos de tiempo y el cambio en la concentración del colorante se determinó por espectrofotometría a una longitud de onda de 497 nm. Con los datos obtenidos se calculó el tiempo de degradación media (Rossetti, Conte, y Ramis, 2021), de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Tiempo de degradación media} = \frac{\ln 2}{K} \quad (1)$$

Donde K corresponde a la pendiente que se obtiene al graficar el logaritmo natural de la concentración inicial entre la concentración en el tiempo, contra el tiempo.

5.3. Objetivo específico 2. Determinar el efecto de las condiciones de entrecruzamiento entre el soporte híbrido fotocatalítico magnético en la actividad enzimática.

5.3.1. Inmovilización de la enzima en el soporte

La inmovilización de la enzima al soporte se obtuvo mediante el proceso descrito por Díaz-Hernández et al. (2018). Para ello, se mezcló 300 mg de TD@Fe₃O₄@Quitosano y 900 µL de lacasa a una concentración de 40 mg mL⁻¹, en una solución de 600 µL de amortiguador citrato-fosfato para mantener valores de pH de 4 a 6. Después se adiciono glutaraldehído al 0.01 % p/v en tampón de fosfato 50 mM a pH 4.5 para reticular. La mezcla de reacción se agito con un vórtex cada 10 minutos durante una hora a temperatura ambiente (20 ± 3 °C). Para separar los sólidos de la mezcla de reacción se centrifugó, la pastilla obtenida se lavó tres veces con etanol al 35%, al finalizar los lavados se secó en un desecador. Los sólidos secos se molieron en un mortero y se guardaron para su uso posterior. Se recuperó el sobrenadante para medir actividad enzimática y el contenido de proteína usando el ensayo de Bradford (1976) con albúmina de suero bovino como estándar. El rendimiento de inmovilización, la eficiencia de inmovilización y la recuperación de la actividad se calcularon siguiendo el método de Sheldon y Van Pelt (2013), de acuerdo con las ecuaciones:

$$\text{Rendimiento (\%)} = 100 \times \frac{\text{Actividad inmovilizada}}{\text{Actividad inicial}} \quad (2)$$

$$\text{Eficiencia (\%)} = \frac{\text{Actividad observada}}{\text{Actividad inmovilizada}} \quad (3)$$

$$\text{Recuperación de la actividad (\%)} = \frac{\text{Actividad observada}}{\text{Actividad inicial}} \quad (4)$$

Donde la actividad inmovilizada se determinó midiendo la actividad residual en el sobrenadante después de la inmovilización y restando esta actividad a la actividad inicial de la enzima sin inmovilizar. Se determino la carga de enzima (% en peso)

restando la concentración de proteína que permanece en la solución después de la inmovilización enzimática.

5.3.2. Medición de la actividad enzimática

La actividad enzimática de lacasa se determinó con 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) (ABTS) de acuerdo con la metodología de Méndez-Hernández et al. (2012), se midió la actividad de la enzima mediante espectroscopia a 415 nm por la generación de radicales ABTS. Una unidad de actividad lacasa (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para formar un μmol de radicales de ABTS.

5.4. Objetivo específico 3. Caracterizar las propiedades físicas, químicas y bioquímicas de la enzima inmovilizada en el soporte híbrido fotocatalítico magnético.

5.4.1. Efecto del pH y temperatura sobre la actividad lacasa

Para evaluar el efecto del pH sobre la actividad de la lacasa, para la enzima libre se adicionaron 150 μL de lacasa a una concentración de 0.4 mg L^{-1} en 150 μL de un amortiguador para valores de pH de 3 a 9 con ABTS 0.5 mM a temperatura ambiente. Posteriormente se midió la actividad por espectrofotometría a 415 nm, la absorbancia se registro cada 10 s durante 2 min. Mientras que para la enzima inmovilizada se adicionaron 16.9 mg de enzima inmovilizada en 25 ml de amortiguador para valores de pH de 3 a 9 con ABTS 0.5 mM a temperatura ambiente, posteriormente se midió la actividad por espectrofotometría a 415 nm tomando mediciones cada 2 min durante 20 min (Amaro-Reyes et al., 2019; Méndez-Hernández et al., 2018).

Para evaluar la relación de la temperatura en la actividad enzimática de la lacasa inmovilizada y libre se incubo cada una en un rango de 30 a 90 °C (en intervalos de 10 °C) a un pH, que se estableció de acuerdo con los resultados obtenidos en la prueba anterior, y fue aquel donde se observo la mayor actividad de lacasa. El

ensayo se realizó con 16.9 mg de TD@Fe₃O₄@Qitosano@Lacasa y en la otra adicionando 150 µL de enzima libre a una concentración de 0.4 mg mL⁻¹, a ambas se les agregó solución amortiguadora con ABTS 0.5mM, y se procedió a medir la actividad por el método descrito anteriormente (Amaro-Reyes et al., 2019; Méndez-Hernández et al., 2018).

5.4.2. Evaluación de la degradación de rojo Congo

La capacidad de degradación de rojo Congo se evaluo con TD@Fe₃O₄@Qitosano, TD@Fe₃O₄@Qitosano@enzima-inactiva y TD@Fe₃O₄@Qitosano@Lacasa de acuerdo con Wu et al. (2019) usando una solución de rojo Congo de concentración conocida a la temperatura y pH que se estableció previamente como la óptima para la enzima inmovilizada. Las evaluaciones se llevaron a cabo, manteniendo agitación constante, en un lapso de 2 h tomando muestra a diferentes intervalos de tiempo, y el cambio en la concentración del colorante se determinó por espectrofotometría a una longitud de onda de 497 nm. Con los datos obtenidos se calculo el tiempo de degradación media como se explico previamente en la sección 5.2.2.

5.4.3. Evaluación de la reutilización del sistema

Uno de los principales propósitos de la inmovilización enzimática es obtener la ventaja de reusarla. Para medir esta propiedad se evaluo la actividad catalítica del sistema TD@Fe₃O₄@Qitosano@Lacasa en vario ciclos. Después de completar cada reacción se recupero el sistema mediante un imán, se lavo con una solución amortiguadora y se reutilizo para llevar a cabo las siguientes reacciones con sustrato fresco (Ladole et al., 2020).

5.4.4. Caracterización de la enzima inmovilizada al soporte fotocatalítico

Las caracterización física, química, y bioquímica se realizó con los parámetros de temperatura y pH óptimos en donde se observó la mayor actividad para la lacasa inmovilizada y libre, y se llevo a cabo de acuerdo con la metodología de Díaz-Hernández et al. (2018).

Se caracterizó el TD para comprobar que se obtuvo en fase anatasa mediante espectroforometría de Raman usando el micro Espectrometro Raman modelo DRX II de Thermo Scientific, empleando un laser a una longitud de onda de 532 nm.

Para confirmar la unión exitosa del sistema TD@Fe₃O₄@Quitosano con la enzima se empleo espectrometría de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR). Cada muestra se escaneo 20 veces en un intervalo de 4000 a 600 cm⁻¹. Se obtuvo la isoterma de adsorción-desorción de N₂ por el analizador de fisorción Autosorb iQ Station 1 a 77. 35 K. El análisis BET y BJH se usaron para determinar el área superficial, la distribución del tamaño de poro y el volumen de poro.

5.5. Análisis estadístico

Cada una de las muestras se hicieron por triplicado y son reportadas como la media de los ensayos ± desviación estándar. Se realizo una comparación de medias mediante la prueba de Tukey para determinar diferencias significativas considerando un p<0.05 utilizando el programa Minitab 13.

5.6. Consideraciones éticas

El presente trabajo se realizo bajo buenas prácticas de laboratorio y en cumplimiento con los lineamientos establecidas por el comité de seguridad e higiene de la facultad para el adecuado manejo y disposición de los residuos generados durante la investigación.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Síntesis del soporte

Para obtener el soporte donde inmovilizar la enzima, con la intención de conferirle estabilidad y capacidad de reuso, se sintetizó el dióxido de titanio (TD) siguiendo la metodología propuesta por Calvo-Ramos et. al. (2020) para obtener el TD en fase anatasa. En la Figura 1 se encuentra el espectro de Raman del TD sintetizado en donde se puede observar la línea azul del TD sin tratamiento térmico y la línea morada que corresponde al material con tratamiento térmico.

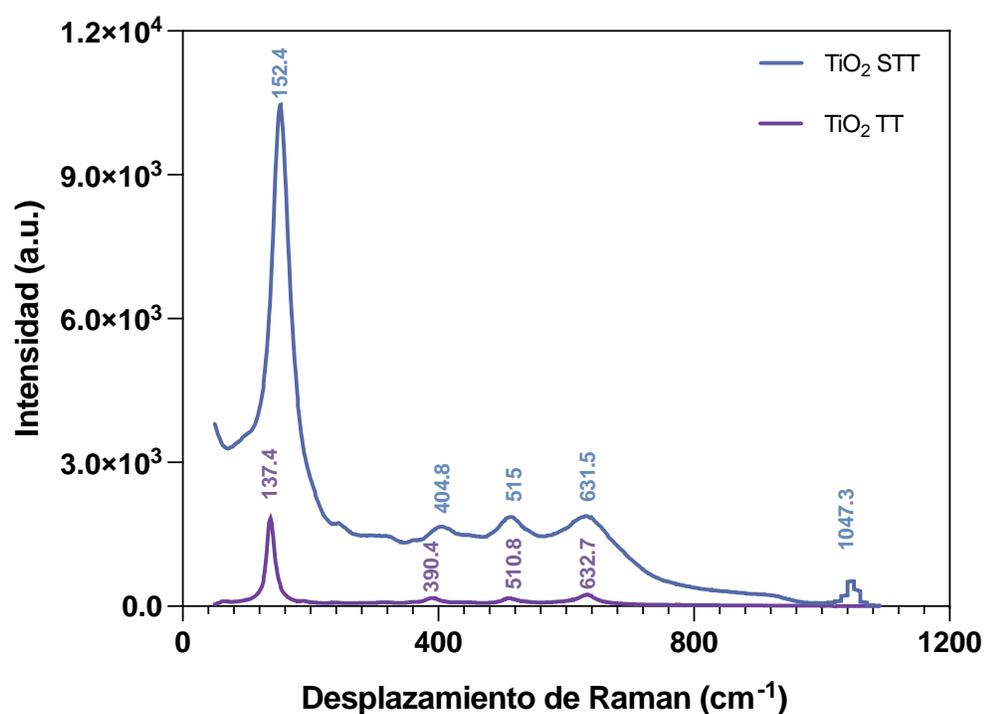


Figura 1. Espectro Raman del polvo de dióxido de titanio (TiO₂), línea azul corresponde al material sin tratamiento térmico y la línea morada al material con tratamiento térmico.

Estas señales se compararon con las señales vibracionales que se obtienen con la anatasa pura, las cuales se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Posiciones de los picos (cm^{-1}) de los modos vibracionales de la anatasa pura (Mahdjoub, et al., 2010)

A_{1g}	B_{1g}	C	E_g
515 (m)	399 (s) 795 (w)	320 (vs)	144 (vs) 197 (w) 639 (m)

vs, muy fuerte; s, fuerte; m, medio; w, débil.

Al comparar las señales obtenidas en la Figura 1 con las posiciones de los picos (cm^{-1}) de los modos vibracionales de la anatasa pura (Cuadro 3) se puede observar que para el TD sintetizado sin tratamiento térmico (línea azul) se tienen dos señales cercanas a las correspondientes a la anatasa pura, la señal 514 con la 515, y la 631 con la 639. Mientras que el espectro de Raman del TD sintetizado con tratamiento térmico (línea morada), donde el material se llevo a $450\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una mufla durante 1.5 h, comparte tres señales similares a las reportadas en la tabla 3, la señal 390.4 con la 399, la 510.8 con 515, y la 632.7 con la 639. Con esta información se puede inferir que con la síntesis empleada se obtuvo el TD en fase anatasa y que el aplicar tratamiento térmico al material las señales se vuelven más cercanas a las de la anatasa pura. Esto concuerda con los resultados de Fernandes Machado y Santana (2005) y Kim et al. (2021), donde encontraron que la fase cristalina anatasa en el TD se conserva en mayor proporción en el material al aplicarle un tratamiento térmico entre los $400\text{--}500\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La magnetita (Fe_3O_4) se obtuvo por coprecipitación *in situ* de una mezcla de cloruro férrico y cloruro ferroso. La Fe_3O_4 utilizada para el soporte fue sintetizada en trabajos previos de este laboratorio.

Para este trabajo se sintetizaron soportes con las siguientes relaciones de material inorgánico, TD: Fe_3O_4 1:1, 1:2 y 2:1. Con estas proporciones se pretendió observar la interacción de los materiales en condiciones de igualdad y cuando se favorecía a uno sobre otro, en la degradación del colorante. La relación de material

inorgánico-orgánico, TD@Fe₃O₄: Quitosano, fue de 2:1 para todos los soportes, en trabajos previos de este laboratorio se estableció esta relación como la óptima para conservar el carácter magnético del soporte (Gracida et al., 2019).

Para la síntesis del soporte se siguió la metodología propuesta por Díaz-Hernández et. al. (2018), la cual se modificó para hacer la incorporación del TD al soporte. A diferencia de la síntesis de Díaz-Hernández et. al. (2018), en donde, se sintetiza la Fe₃O₄ y al mismo tiempo se incorpora el quitosano, en este trabajo los materiales se mezclaron hasta el momento de la síntesis del soporte. El rendimiento de sólidos teórico en la reacción de síntesis del soporte se obtuvo sumando los sólidos iniciales. Al finalizar la síntesis se pesaron los sólidos obtenidos y se calculó el porcentaje con respecto al rendimiento teórico. En promedio se obtuvo un rendimiento real de sólidos del 73.6 %, que al compararlo con el rendimiento obtenido por Díaz-Hernández et al. (2018), que fue del 57.4 %, con la síntesis empleada en este trabajo se obtuvo un incremento del 16.2 % en el rendimiento de sólidos. Este incremento puede deberse al cambio antes mencionado a la metodología, ya que se minimiza la pérdida de reactivo que se queda como residuo adherido al material de vidrio.

6.2. Evaluación del efecto de la radiación UV sobre los soportes en la degradación de rojo Congo

La actividad fotocatalítica de los soportes sintetizados se evaluó usando luz solar y una lámpara UV de 254 nm contra concentraciones de rojo Congo de 400 y 600 mg L⁻¹. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 2 y 3 como un cambio relativo en la concentración (C_i/C_0) en función del tiempo.

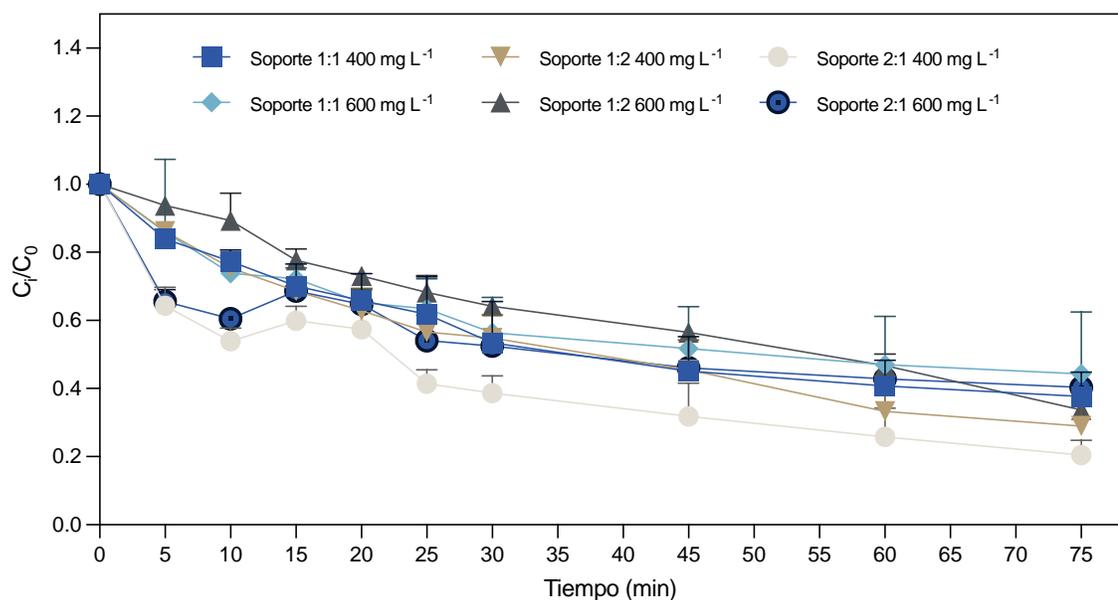


Figura 2. Evaluación del efecto de la luz solar sobre los soportes de relación 1:1, 1:2 y 2:1 en la degradación de rojo Congo a concentraciones de 400 mg L⁻¹ y 600 mg L⁻¹. Los datos representan la media para las replicas (n=3).

Como se observa en la Figura 2, donde se usó luz solar como fuente de luz UV, en los primero 30 min del experimento la degradación del colorante se da de forma exponencial hasta llegar a un equilibrio que se alcanzó a los 75 min. El mayor cambio en la concentración del colorante se tuvo con la concentración de 400 mg L⁻¹, donde a los 75 minutos de la evaluación el soporte de relación 2:1 degradó cerca del 80 % del colorante, el soporte 1:2 tuvo el 70 %, mientras que el soporte 1:1 logro una degradación del 62 %. Para la concentración de 600 mg L⁻¹ se obtuvo una degradación de más del 60 % con los soportes 1:2 y 2:1, y con el soporte 1:1 se obtuvo el 55 %.

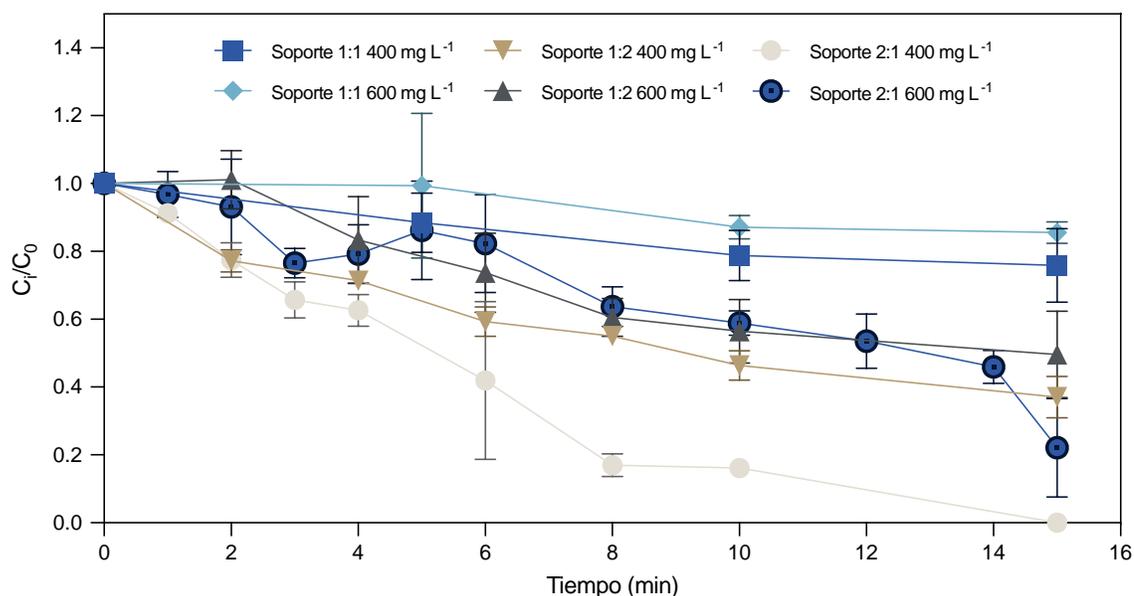


Figura 3. Evaluación del efecto de la luz UV sobre los soportes de relación 1:1, 1:2 y 2:1 en la degradación de rojo Congo a concentraciones de 400 mg L⁻¹ y 600 mg L⁻¹, usando una lámpara UV de 254 nm. Los datos representan la media para las replicas (n=3).

En la Figura 3, que corresponde al uso de una lámpara UV de 254 nm, se observa, al igual que con la luz solar, que la degradación se da de manera exponencial. Sin embargo, con la lámpara UV esto ocurre en los primeros 8 min, posterior a este tiempo continúan disminuyendo, pero con menor rapidez. Similar a la evaluación con luz solar, en la concentración de 400 mg L⁻¹ se observó el mayor cambio en la concentración del rojo Congo, donde a los 15 minutos con el soporte de relación 2:1 se degradó el 100%, con el soporte de relación 1:2 se obtuvo un 62.9 %, mientras que con el soporte 1:1 se logró un 24.2 % de degradación en 15 minutos. Para la concentración de 600 mg L⁻¹ se obtuvo en 15 minutos una degradación del 77.9 % con el soporte 2:1, del 50.4 % con el soporte 1:2, y de 14.5 % con el soporte 1:1.

Las curvas de degradación (Figura 2 y 3) presentan un decaimiento exponencial que encaja razonablemente bien con una cinética de pseudo primer orden (Qutub et al., 2022). Esta degradación puede atribuirse al TD en los soportes, ya que este

les da la cualidad de que al ser irradiados con luz ocurra la fotoexcitación del material, lo que conduce a la generación de pares electron-hueco en la superficie del mismo, provocando de esta manera la fotodegradación del contaminante, en este caso el colorante rojo Congo (Magdalane, et al., 2021; Badvi y Javanbakht, 2021).

Con los resultados obtenidos se calculó el tiempo de degradación media con la intención de conocer cuál combinación de soporte degrada el colorante en el menor tiempo, en la Figura 4 se presentan los resultados.

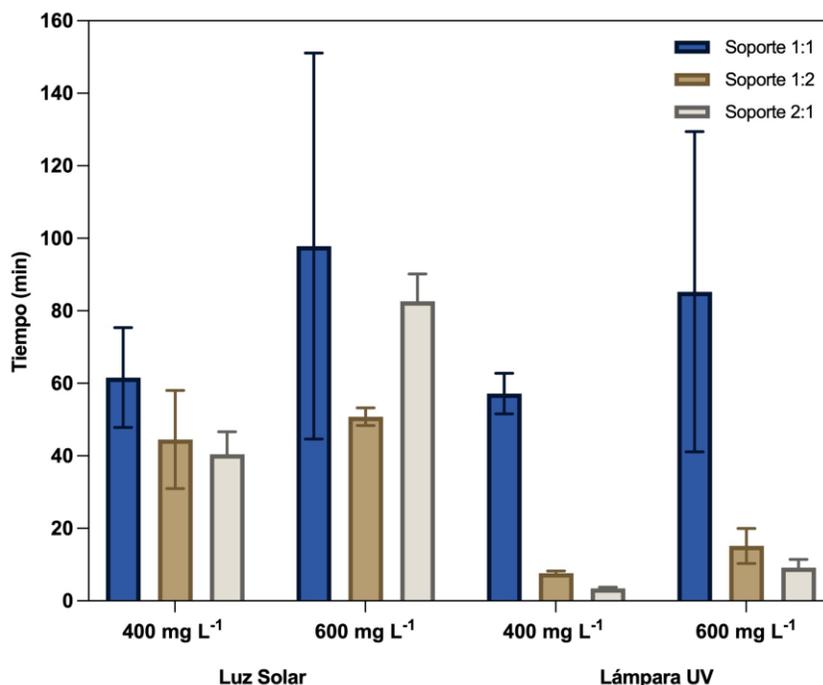


Figura 4. Tiempo de degradación media del rojo Congo obtenido con cada tipo de soporte (relación 1:1, 1:2 y 2:1) al evaluar en concentraciones de rojo Congo de 400 mg L⁻¹ y 600 mg L⁻¹ usando usando luz solar y lámpara UV de 254 nm

El tiempo de degradación media se refiere al tiempo que le lleva al soporte degradar la mitad de la concentración del colorante en la solución. Como se observa en la Figura 4 el soporte 2:1 es el que lo consigue en menor tiempo. Al compararlo en la evaluación con luz solar para la concentración de 400 mg L⁻¹ fue

1.5 y 1.1 veces más rápido que los soportes 1:1 y 1:2, respectivamente; para la concentración de 600 mg L^{-1} fue 1.2 veces más rápido que el soporte 1:1. Mientras que en la evaluación con lámpara UV para la concentración de 400 mg L^{-1} fue 16.8 y 2.2 veces más rápido que los soportes de relación 1:1 y 1:2, respectivamente. Para la concentración de 600 mg L^{-1} le tomó 5.5 y 1.2 veces menos tiempo comparado con los soportes de relación 1:1 y 1:2 respectivamente.

La velocidad de remoción de rojo Congo en presencia de los tres tipos de soporte demuestra que la degradación del colorante se da con mayor rapidez cuando se incrementa la cantidad de TD en el soporte. El soporte de relación 2:1, en comparación con los otros, requirió menor inversión de tiempo y demostró ser más eficiente en la degradación del colorante, lo cual puede atribuirse a que al tener mayor proporción de TD, genera más actividad fotocatalítica y por lo mismo mayor fotodegradación del contaminante. El soporte 2:1 se seleccionó para continuar con la inmovilización de la enzima.

6.3. Inmovilización de la enzima al soporte

La actividad enzimática se puede ver afectada por las condiciones de inmovilización, como el pH (Zhang et al., 2020). Es bien sabido que la actividad de la lacasa es dependiente de este parámetro, dado que el pH de la solución determina el nivel de interacción molecular entre la enzima y la superficie del soporte (Chao et al., 2017). Por lo cual establecer el pH al cual ocurre la máxima inmovilización y se conserve la actividad es un punto crítico para evaluar la interacción del soporte con la enzima (Yavaşer y Karagözler, 2021). En este trabajo se evaluó el efecto del entrecruzamiento a valores de pH de 4, 5 y 6 usando una solución tampón de citrato-fosfato. Se midió la actividad de la enzima inmovilizada y libre por espectroscopia usando ABTS como sustrato, realizando toma de muestra cada 2 min durante 20 min para la enzima inmovilizada y cada 10 s durante 2 min para la enzima libre. El rendimiento de inmovilización, la

eficiencia de inmovilización y la recuperación de la actividad se calcularon siguiendo el método de Sheldon y Van Pelt (2013) y se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Actividad, rendimiento, eficiencia y recuperación de actividad de la lacasa inmovilizada a diferentes valores de pH.

	pH 4	pH 5	pH 6
Actividad inmovilizada (U mg⁻¹)	0.02 ± 0.01 ^A	0.05 ± 0.01 ^B	0.04 ± 0.00 ^{AB}
Rendimiento de inmovilización %	75.66 ± 43.6 ^A	173.94 ± 28.1 ^B	152.19 ± 9.01 ^{AB}
Eficiencia de inmovilización %	17.40 ± 14.43 ^A	8.50 ± 1.35 ^A	10.48 ± 1.32 ^A
Recuperación de la Actividad %	13.16 ± 0.90 ^A	14.96 ± 4.52 ^A	15.96 ± 1.26 ^A

Los superíndices indican el análisis estadístico, los resultados que no comparten letra tienen una diferencia estadísticamente significativa. Los resultados representan la media ± la desviación estándar (n=3).

Los parámetros calculados tiene la intención de indicar qué tan exitosa fue la inmovilización de la enzima al soporte; en el Cuadro 4 se observa que son muy similares entre las 3 condiciones evaluadas. Sin embargo, al aplicar el ANOVA, se encontró diferencia estadísticamente significativa para la actividad y el rendimiento de inmovilización. En particular, se percibe que al inmovilizar la enzima al soporte a un pH de 5 se logra un aumento de la actividad y el rendimiento de inmovilización en comparación con los otros tratamientos.

Esta mejora en los valores observados se puede atribuir a varios factores. En primer lugar, el pH 5 puede estar más cerca del pH óptimo de la enzima, lo que favorece su conformación activa y, por ende, su actividad catalítica (Kashefi, Borghei, & Mahmoodi, 2019). Además, a este pH, es posible que se favorezcan interacciones electrostáticas entre la enzima y el soporte, facilitando la

inmovilización. Estas interacciones son cruciales, ya que una inmovilización efectiva no solo retiene la enzima, sino que también mantiene su actividad (Janhui et. al, 2024). Como resultado se decidió utilizar el pH 5 como condición estándar para la inmovilización de la enzima.

6.4.Efecto del pH y temperatura sobre la actividad de la lacasa inmovilizada

Generalmente, la enzima inmovilizada muestra mayor rendimiento en actividad enzimática comparada con la enzima libre. Por lo cual, primero se evaluó el efecto del pH (3 a 9) en la actividad de la lacasa inmovilizada, y se comparo con la actividad de la enzima libre. Posteriormente, con el pH óptimo obtenido previamente, se evaluó la estabilidad a la temperatura (30 a 90 °C) de la enzima inmovilizada, y de igual forma se comparo con la enzima libre. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.

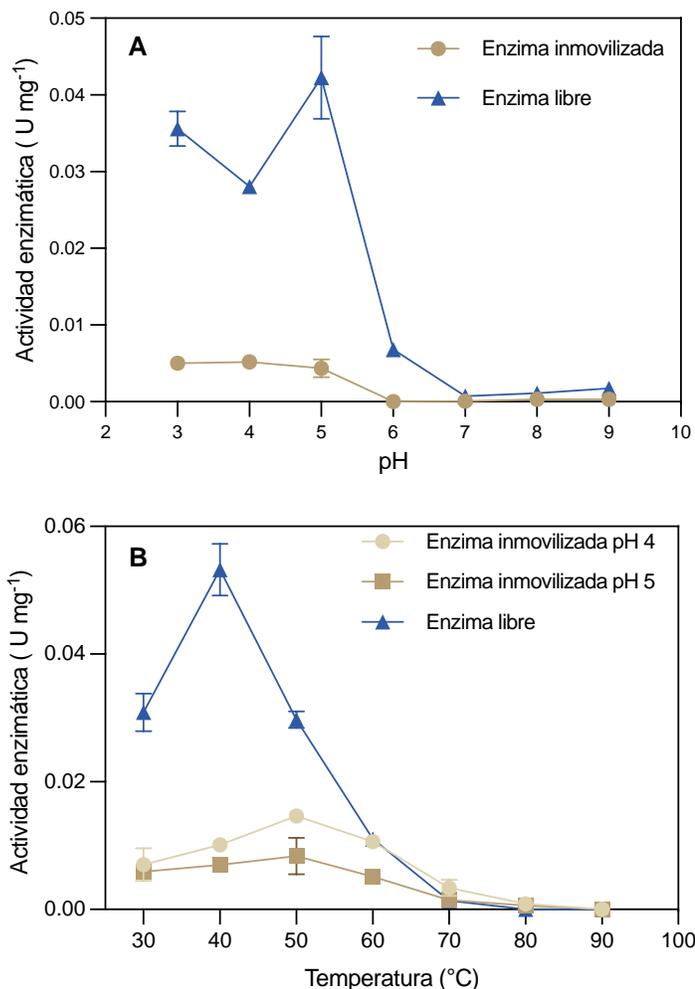


Figura 5. Efecto del pH (A) y temperatura (B) en la actividad de la enzima libre e inmovilizada con ABTS 0.5 mM.

Como se observa en la Figura 5A, la enzima inmovilizada mantiene su actividad en un rango de pH de 3 a 5. Aunque la enzima libre también presenta actividad, esta disminuye drásticamente a medida que el pH aumenta. En la evaluación de la estabilidad térmica (Figura 5B), se determina que la temperatura óptima para la enzima libre es de 40 °C, mientras que para la enzima inmovilizada es de 50 °C, un incremento de 10 °C en la estabilidad de la enzima. La actividad de la enzima inmovilizada se mantiene estable desde los 30 a 60 °C para la evaluación a pH 5, y la evaluación a pH 4 mantiene la actividad hasta los 70 °C. En contraste, la actividad de la enzima libre se reduce rápidamente a medida que aumenta la

temperatura. Esto indica que la enzima inmovilizada tiene mayor tolerancia a altas temperaturas, lo que puede atribuirse a que la inmovilización aumenta la estabilidad de la estructura de la lacasa, evitando que hayan cambios conformacionales debido al incremento de la temperatura (Wu et al., 2019). Lo cual es consistente con otros trabajos de investigación, como el de Chao et al. (2017), que mostraron que al inmovilizar una lacasa en nanopartículas de titanio, el desempeño de la enzima inmovilizada superó al de la enzima libre en un amplio rango de pH (3.0 – 6.0) y mejoró su resistencia a la desnaturalización por efecto de la temperatura.

6.5. Evaluación de la degradación de rojo Congo

Para probar el potencial de la lacasa inmovilizada en el tratamiento de agua se usó el colorante azo rojo Congo a una concentración de 800 mg L⁻¹, las evaluaciones se llevaron a cabo a un pH de 4 y a una temperatura de 50 °C, condiciones que se establecieron como las óptimas para la actividad de la enzima inmovilizada. Los resultados obtenidos se observan en la Figura 6.

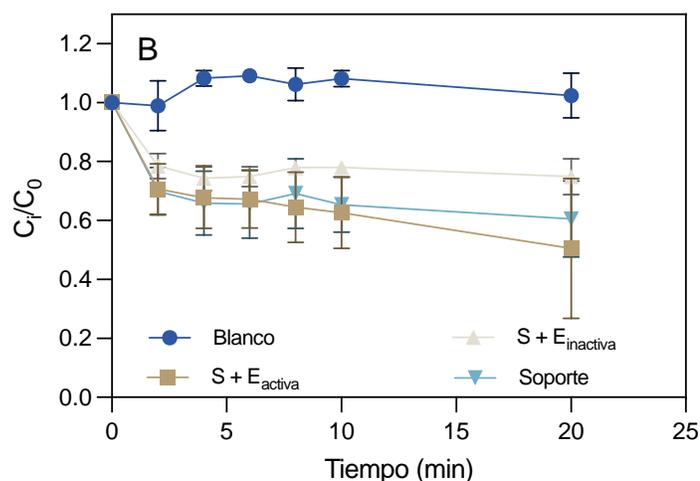
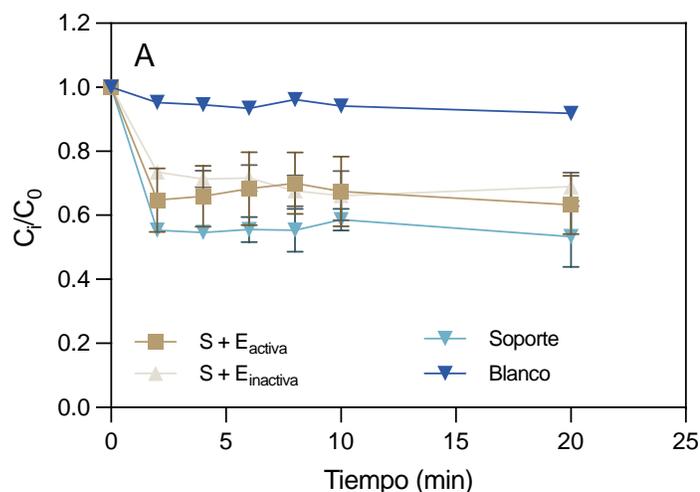


Figura 6. Evaluación del efecto de la luz solar (A) y lámpara UV de 254 nm (B) sobre la enzima inmovilizada ($S + E_{activa}$), el soporte con la enzima inactiva ($S + E_{inactiva}$) y el soporte en la degradación de rojo Congo (800 mg L^{-1}) a pH 5 y a una temperatura de $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Los datos representan la media para las replicas ($n=3$).

La evaluación, al igual que con el soporte solo, se llevo a cabo con radiación solar y con una lámpara UV de 254 nm. Se utilizó una concentración de 800 mg L^{-1} , y se comparo con el soporte solo y el soporte con la enzima inactiva. En la Figura 6A, que corresponde a la evaluación con luz solar, la enzima inmovilizada degrado el 37 % del colorante, el soporte con enzima inactiva degrado el 31 %, mientras que el soporte solo logro el 46%, todas los experimentos duraron 20 minutos.

Para la evaluación con lámpara UV (Figura 6B) la enzima inmovilizada degrado 49 %, el soporte con enzima inactiva 25.2 % y el soporte solo 40 %, en 20 minutos de reacción.

Como se puede apreciar en los resultados obtenidos, el soporte por sí solo es muy eficiente en la remoción de rojo Congo. Ya que al incorporar la enzima a este, en el caso de la luz solar no se obtiene una mayor degradación, y en el caso de la luz UV la diferencia entre el soporte sin enzima y la enzima inmovilizada es de 9%.

6.6. Evaluación de la reutilización del sistema

La reutilización de la enzima inmovilizada es un criterio importante en estudios de inmovilización enzimática, ya que es una característica que hace superior a la enzima inmovilizada sobre la libre. Para investigar la reutilización de la enzima inmovilizada se realizaron tres ciclos consecutivos. Cada ciclo tuvo una duración de 10 minutos bajo condiciones idénticas: pH 4, temperatura de 50 °C y una concentración de colorante de 800 mg L⁻¹.

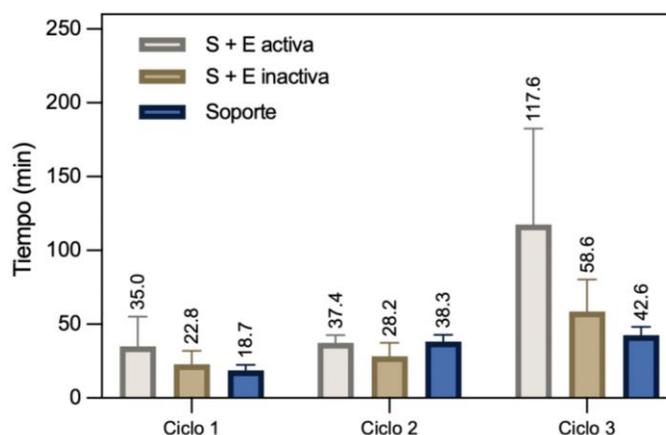


Figura 7. Tiempo de degradación media de la enzima inmovilizada, el soporte con enzima inactiva y el soporte contra rojo Congo (800 mg L⁻¹) con luz solar

En la Figura 7 se presenta el tiempo de degradación media de cada ciclo realizado con luz solar, donde se observa que a la enzima inmovilizada en el primer ciclo le toma 35 minutos lograr la degradación de la mitad de la concentración del

contaminante, para el segundo ciclo el tiempo aumenta 1.06 veces, mientras que para el tercer ciclo le toma 3.36 veces más tiempo. En comparación al soporte con enzima inactiva y al soporte solo, el primer ciclo les toma 22.8 y 18.7 minutos respectivamente, para el segundo ciclo el tiempo aumenta 1.2 y 2.04, y para el tercer ciclo les toma 2.5 y 2.2 veces más tiempo.

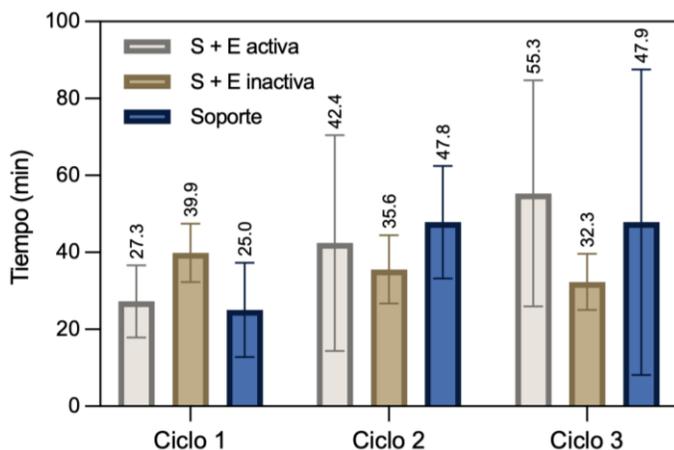


Figura 8. Tiempo de degradación media de la enzima inmovilizada, el soporte con enzima inactiva y el soporte contra rojo Congo (800 mg L^{-1}) con lámpara UV de 254 nm

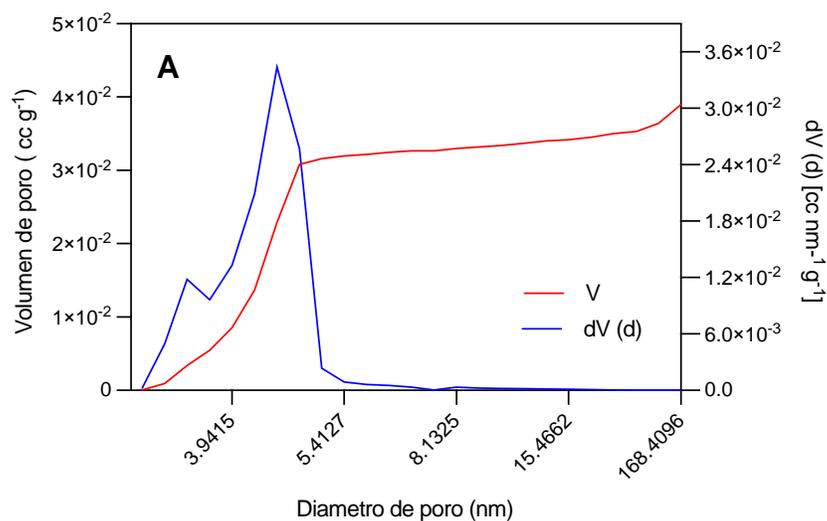
En la Figura 8 se muestra la evaluación de ciclos consecutivos utilizando una lampara UV. Para la enzima inmovilizada en el primer ciclo consigue degradar la mitad de la concentración de colorante en 27.3 minutos, para el segundo ciclo le toma 1.5 veces más tiempo, ya para el tercer ciclo se duplica el tiempo. Mientras que para el soporte con la enzima inactiva y el soporte solo el primer ciclo les lleva 39.9 y 25 minutos respectivamente, para el segundo ciclo les toma 0.9 y 1.9 veces más tiempo a cada uno. En el tercer ciclo les lleva 0.8 para el soporte con la enzima inactiva, y el tiempo se mantiene para el soporte solo.

La enzima inmovilizada enfrenta una reducción en su eficiencia con el uso, sin embargo, todavía proporciona un rendimiento significativo en ciclos iniciales que puede ser mejorado con ajustes en la metodología de inmovilización y operación. Los resultados sugieren que, la enzima inmovilizada al emplearse con luz UV, llega a ser más eficiente comparada con el soporte sin enzima y con

enzima inactiva durante el primer ciclo. A pesar de su baja capacidad para ser reciclada, podría ser beneficiosa su aplicación en procesos donde la actividad enzimática sea un componente crítico a corto plazo.

6.7. Caracterización de la enzima inmovilizada al soporte fotocatalítico

Para determinar el diámetro de poro y el área superficial del sistema TD@Fe₃O₄@Quitosano@Lacasa se utilizó el método BET y BJH/DH por un análisis de adsorción-desorción de nitrógeno. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 8.



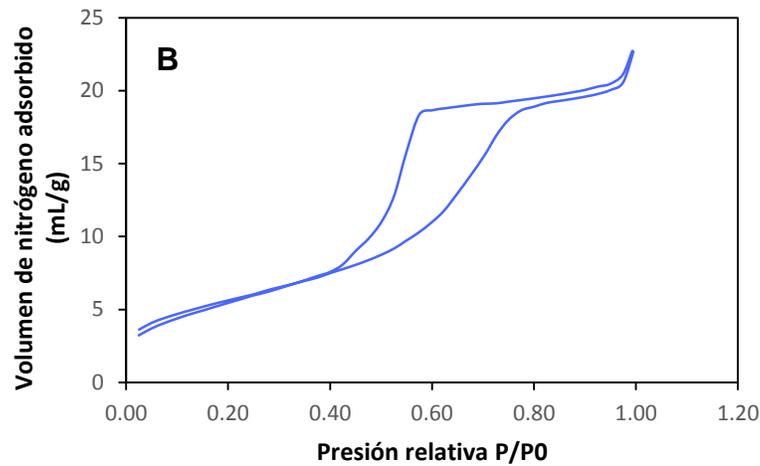


Figura 9. (A) Distribución del volumen de poro y volumen de poro del material. (B) Isotherma de adsorción del soporte con la enzima inmovilizada

El análisis BET, Figura 9A, mostró un área superficial para el sistema TD@Fe₃O₄@Quitosano@Lacasa de 20.51 m² g⁻¹. El tamaño de poro fue analizado por el método BJH, y el promedio para la muestra fue de aproximadamente 4.43 nm. La isoterma del sistema TD@Fe₃O₄@Quitosano@Lacasa, que se puede observar en la Figura 9B, exhibió una forma similar a una tipo IV, la cuál indica una estructura mesoporosa, y se caracteriza, al ser evaluada con un gas, entre otras cosas por la formación de capas o multicapas de adsorbato sobre el material (Li et al., 2018; Patil et al., 2020).

La inmovilización de la enzima al soporte fue evaluada mediante el análisis FTIR. La Figura 9 muestra el espectro de FTIR de cada uno de los componentes del soporte, el soporte TD@Fe₃O₄@Quitosano y el sistema TD@Fe₃O₄@Quitosano@Lacasa.

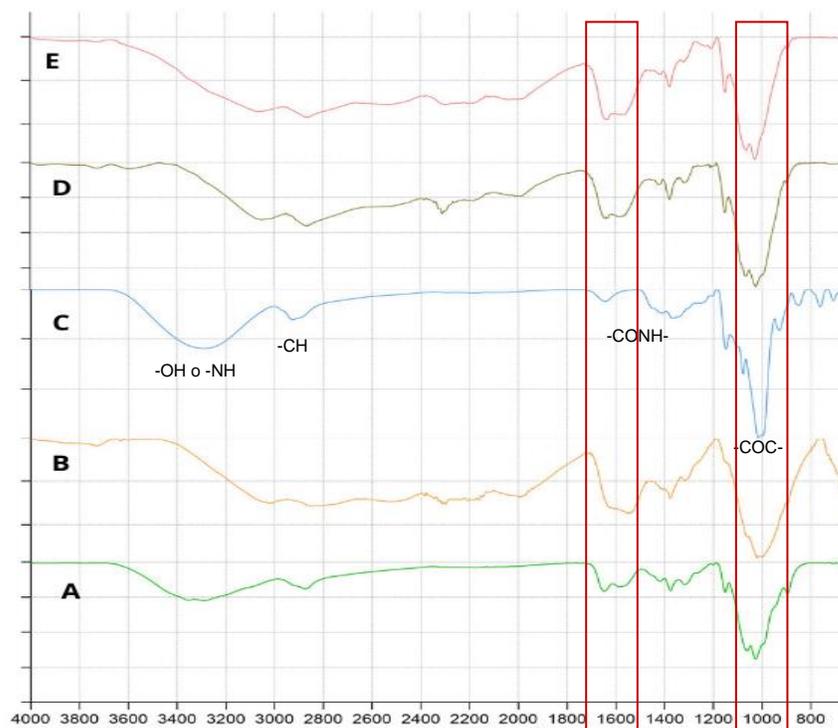


Figura 10. Espectro de FTIR de (A) quitosano, (B) Fe_3O_4 , (C) lacasa, (D) $\text{TD@Fe}_3\text{O}_4\text{@Quitosano}$ y (E) $\text{TD@Fe}_3\text{O}_4\text{@Quitosano@Lacasa}$

El espectro de FTIR de la lacasa antes y después de la inmovilización muestra cambios en los picos de los grupos funcionales. Se observan bandas características de la lacasa, Figura 9C, a los 3300 cm^{-1} (estiramiento de OH, y/o vibración y estiramiento de NH), 2800 cm^{-1} (estiramiento de CH), 1630 cm^{-1} corresponde al grupo carbonilo, se atribuye a la estructura secundaria de una amida y 1100 cm^{-1} (Fortes, Daniel-da-Silva, Xavier, y Tavares, 2017). El cambio estructural en los espectros FT-IR confirmó la reticulación exitosa de la lacasa al $\text{TD@Fe}_3\text{O}_4\text{@Quitosano}$ mediante la formación de enlaces amida entre los grupos carboxilo y amino como se había reportado previamente (Gracida et al 2019).

7. CONCLUSIONES

La eficiente degradación del colorante rojo Congo fue potenciada por la actividad fotocatalítica del sistema TD@Fe₃O₄@Quitosano, lo cual se evidenció al alcanzar los mejores resultados al usar la lámpara de luz UV de 254 nm.

La inmovilización de la lacasa mediante entrecruzamiento en este soporte permitió maximizar su actividad enzimática, al tiempo que incrementó su estabilidad frente a variaciones de pH y temperatura. Esto resalta la efectividad del método de inmovilización al proporcionar un entorno favorable para la conservación de la actividad enzimática, lo que a su vez optimiza la eliminación de contaminantes.

La caracterización del sistema evidenció su estructura mesoporosa, adecuada para facilitar interacciones entre la enzima y los contaminantes, además permitió la adsorción de los contaminantes en el soporte fotocatalítico, lo que refuerza su potencial como una estrategia innovadora en el tratamiento de aguas residuales contaminadas por colorantes azo, como lo es el rojo Congo.

El uso de soportes con actividad fotocatalítica para la inmovilización de enzimas podría ser una tecnología factible de usar en plantas de tratamiento de aguas residuales industriales, especialmente en industrias textiles y de tintes, donde los colorantes azo son comúnmente empleados. La investigación podría continuar explorando la incorporación de otros tipos de enzimas y fotocatalizadores para mejorar aún más la eficiencia del sistema y su aplicabilidad a una mayor variedad de contaminantes y procesos, enfocándose también en la optimización del proceso para su escalabilidad, evaluando la viabilidad económica y técnica de implementar este sistema o uno similar.

8. REFERENCIAS

Ahmad, A. A., Alakhras, L. A., Al-Bataineh, Q. M., y Telfah, A. (2023). Impact of metal doping on the physical characteristics of anatase titanium dioxide (tio₂) films. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 34(20). <https://doi.org/10.1007/s10854-023-10948-z>

Alghamdi, A. A., Al-Odayni, A., Saeed, W. S., Almutairi, M. S., Alharthi, F. A., Aouak, T., y Al-Kahtani, A. (2019). Adsorption of azo dye methyl orange from aqueous solutions using alkali-activated polypyrrole-based graphene oxide. *Molecules*, 24(20), 3685. doi:10.3390/molecules24203685

Amari, A., Alzahrani, F. M., Alsaiari, N. S., Katubi, K. M., Rebah, F. B., y Tahoon, M. A. (2021). Magnetic Metal Organic Framework immobilized laccase for wastewater decolorization. *Processes*, 9(5), 774. doi:10.3390/pr9050774

Amaro-Reyes, A., Díaz-Hernández, A., Gracida, J., García-Almendárez, B. E., Escamilla-García, M., Arredondo-Ochoa, T., y Regalado, C. (2019). Enhanced performance of immobilized xylanase/filter paper-ASE on a magnetic chitosan support. *Catalysts*, 9(11), 966. doi:10.3390/catal9110966

Ardila-Leal, L. D., Poutou-Piñales, R. A., Pedroza-Rodríguez, A. M., y Quevedo-Hidalgo, B. E. (2021). A brief history of colour, the environmental impact of synthetic dyes and removal by using laccases. *Molecules*, 26(13), 3813. doi:10.3390/molecules26133813

Badvi, K., y Javanbakht, V. (2021). Enhanced photocatalytic degradation of dye contaminants with TIO₂ immobilized on ZSM-5 zeolite modified with nickel nanoparticles. *Journal of Cleaner Production*, 280, 124518. doi:10.1016/j.jclepro.2020.124518

Bal, G., y Thakur, A. (2022). Distinct approaches of removal of dyes from wastewater: A Review. *Materials Today: Proceedings*, 50, 1575-1579. doi:10.1016/j.matpr.2021.09.119

Bukola M, A., Yung-Tse, H., Howard H, P., y Christopher R Huhnke, H. (2022). Comparison of dye wastewater treatment methods: A review. *GSC Advanced Research and Reviews*, 10(2), 126-137. doi:10.30574/gscarr.2022.10.2.0054

Calvo-Ramos, D. K., Vega-González, M., Esparza-Muñoz, R. A., Santos-Cruz, J., De Moure-Flores, F. J., y Mayén-Hernández, S. A. (2020). Obtaining and characterization of tio2-go composites for photocatalytic applications. *International Journal of Photoenergy*, 2020, 1-9. doi:10.1155/2020/3489218

Cen, Y., Liu, Y., Xue, Y., y Zheng, Y. (2019). Immobilization of enzymes in/on membranes and their applications. *Advanced Synthesis y Catalysis*, 361(24), 5500-5515. doi:10.1002/adsc.201900439

Chao, C., Guan, H., Zhang, J., Liu, Y., Zhao, Y., y Zhang, B. (2017). Immobilization of Laccase onto porous polyvinyl alcohol/halloysite hybrid beads for dye removal. *Water Science and Technology*, 77(3), 809–818. doi:10.2166/wst.2017.594

Comisión Nacional del Agua (2018). Estadísticas del Agua en México. Consultado de http://sina.conagua.gob.mx/publicaciones/EAM_2018.pdf

Crini, G., y Lichtfouse, E. (2018). Wastewater treatment: An overview. *Environmental Chemistry for a Sustainable World*, 1-21. doi:10.1007/978-3-319-92111-2_1

Daronch, N. A., Kelbert, M., Pereira, C. S., De Araújo, P. H., y De Oliveira, D. (2020). Elucidating the choice for a precise matrix for Laccase immobilization: A Review. *Chemical Engineering Journal*, 397, 125506. doi:10.1016/j.cej.2020.125506

Díaz-Hernández, A., Gracida, J., García-Almendárez, B. E., Regalado, C., Núñez, R., y Amaro-Reyes, A. (2018). Characterization of magnetic nanoparticles coated with chitosan: A potential approach for enzyme immobilization. *Journal of Nanomaterials*, 2018, 1-11. doi:10.1155/2018/9468574

Federsel, H., Moody, T. S., y Taylor, S. J. (2021). Recent trends in enzyme immobilization—concepts for expanding the Biocatalysis Toolbox. *Molecules*, 26(9), 2822. doi:10.3390/molecules26092822

Fernandes Machado, N. R. C., y Santana, V. S. (2005). Influence of thermal treatment on the structure and photocatalytic activity of tio2 P25. *Catalysis Today*, 107–108, 595–601. doi:10.1016/j.cattod.2005.07.022

Filho, D. G., Silva, A. G., y Guidini, C. Z. (2019). Lipases: Sources, immobilization methods, and Industrial Applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(18), 7399-7423. doi:10.1007/s00253-019-10027-6

Fortes, C. C. S., Daniel-da-Silva, A. L., Xavier, A. M. R. B., y Tavares, A. P. M. (2017). Optimization of enzyme immobilization on functionalized magnetic nanoparticles for laccase biocatalytic reactions. *Genie Des Procedes [Chemical Engineering and Processing]*, 117, 1–8. doi:10.1016/j.cep.2017.03.009

Gómez-Galvarriato, A. (1999). *La Industria Textil en México* (1st ed.). México, D.F, México: Instituto Mora.

Gracida, J., Arredondo-Ochoa, T., García-Almendárez, B. E., Escamilla-García, M., Shirai, K., Regalado, C., y Amaro-Reyes, A. (2019). Improved thermal and reusability properties of xylanase by genipin cross-linking to magnetic chitosan particles. *Applied biochemistry and biotechnology*, 188, 395-409.

lark, D., Buzzo, A. J., Garcia, J. A., Côrrea, V. G., Helm, C. V., Corrêa, R. C., Peralta, R. M., De Peralta, R., Bracht, A., y Peralta, R. (2019). Enzymatic degradation and detoxification of azo dye Congo red by a new laccase from

Oudemansiella Canarii. *Bioresource Technology*, 289, 121655. doi:10.1016/j.biortech.2019.121655

Imam, H. T., Marr, P. C., y Marr, A. C. (2021). Enzyme entrapment, biocatalyst immobilization without covalent attachment. *Green Chemistry*, 23(14), 4980-5005. doi:10.1039/d1gc01852c

Jun, L. Y., Yon, L. S., Mubarak, N., Bing, C. H., Pan, S., Danquah, M. K., Abdullah, E.C., y Khalid, M. (2019). An overview of immobilized enzyme technologies for dye and phenolic removal from wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(2), 102961. doi:10.1016/j.jece.2019.102961

Kashefi, S., Borghei, S. M., y Mahmoodi, N. M. (2019). Covalently immobilized laccase onto graphene oxide nanosheets: Preparation, characterization, and biodegradation of azo dyes in colored wastewater. *Journal of Molecular Liquids*, 276, 153–162. doi:10.1016/j.molliq.2018.11.156

Katheresan, V., Kansedo, J., y Lau, S. Y. (2018). Efficiency of various recent wastewater dye removal methods: A Review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(4), 4676-4697. doi:10.1016/j.jece.2018.06.060

Kim, M. G., Kang, J. M., Lee, J. E., Kim, K. S., Kim, K. H., Cho, M., y Lee, S. G. (2021). Effects of calcination temperature on the phase composition, photocatalytic degradation, and virucidal activities of tio₂ nanoparticles. *ACS Omega*, 6(16), 10668–10678. doi:10.1021/acsomega.1c00043

Kishor, R., Purchase, D., Saratale, G. D., Saratale, R. G., Ferreira, L. F., Bilal, M., Chandra, R., y Bharagava, R. N. (2021). Ecotoxicological and health concerns of persistent coloring pollutants of textile industry wastewater and treatment approaches for environmental safety. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(2), 105012. doi:10.1016/j.jece.2020.105012

Ladole, M. R., Pokale, P. B., Patil, S. S., Belokar, P. G., y Pandit, A. B. (2020). Laccase immobilized peroxidase mimicking magnetic metal organic frameworks for industrial dye degradation. *Bioresource Technology*, 317, 124035. doi:10.1016/j.biortech.2020.124035

Li, Y., Jing, T., Xu, G., Tian, J., Dong, M., Shao, Q., ... Guo, Z. (2018). 3-D magnetic graphene oxide-magnetite poly(vinyl alcohol) nanocomposite substrates for immobilizing enzyme. *Polymer*, 149, 13–22. doi:10.1016/j.polymer.2018.06.046

Liu, S., Yu, B., Wang, S., Shen, Y., y Cong, H. (2020). Preparation, surface functionalization and application of fe₃o₄ magnetic nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 281, 102165. doi:10.1016/j.cis.2020.102165

Magdalane, C. M., Priyadharsini, G. M., Kaviyarasu, K., Jothi, A. I., y Simiyon, G. G. (2021). Synthesis and characterization of tio₂ doped cobalt ferrite nanoparticles via microwave method: Investigation of photocatalytic performance of Congo red degradation dye. *Surfaces and Interfaces*, 25, 101296. doi:10.1016/j.surfin.2021.101296

Maryšková, M., Ardao, I., García-González, C. A., Martinová, L., Rotková, J., y Ševců, A. (2016). Polyamide 6/Chitosan nanofibers as support for the immobilization of *trametes versicolor* laccase for the elimination of endocrine disrupting chemicals. *Enzyme and Microbial Technology*, 89, 31-38. doi:10.1016/j.enzmictec.2016.03.001

Méndez-Hernández, J. E., Loera, O., Méndez-Hernández, E. M., Herrera, E., Arce-Cervantes, O., y Soto-Cruz, N. Ó. (2018). Fungal pretreatment of Corn Stover by *Fomes* sp.. EUM1: Simultaneous production of readily hydrolysable biomass and useful biocatalysts. *Waste and Biomass Valorization*, 10(9), 2637-2650. doi:10.1007/s12649-018-0290-1

Méndez-Hernández, J. E., Ramírez-Vives, F., Solís-Oba, M., Solís-Oba, A., Sobrino-Figueroa, A. S., y Loera, O. (2012). Detoxification and mineralization of Acid Blue 74: Study of an alternative secondary treatment to improve the enzymatic decolourization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(5), 805-814. doi:10.1007/s11274-012-1235-7

Messemeche, R., Saidi, H., Attaf, A., Benkhetta, Y., Chala, S., Azizi, R., y Nouadji, R. (2020). Elaboration and characterization of nano-crystalline layers of transparent titanium dioxide (anatase-tio₂) deposited by a sol-gel (spin coating) process. *Surfaces and Interfaces*, 19, 100482. doi:10.1016/j.surfin.2020.100482

Patil, M. P., More, M. K., Chhajed, S. S., Bhambere, D. S., y Kshirsagar, S. J. (2020). Synthesis and characterization of mesoporous silica nanoparticles loaded with repaglinide for dissolution enhancement. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 82(4). doi:10.36468/pharmaceutical-sciences.694

Purkait, M., Maiti, A., DasGupta, S., y De, S. (2007). Removal of congo red using activated carbon and its regeneration. *Journal of Hazardous Materials*, 145(1-2), 287-295. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.11.021

Qutub, N., Singh, P., Sabir, S., Sagadevan, S., y Oh, W.-C. (2022). Enhanced photocatalytic degradation of acid blue dye using Cds/Tio₂ nanocomposite. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09479-0>

Rashid, R., Shafiq, I., Akhter, P., Iqbal, M. J., y Hussain, M. (2021). A state-of-the-art review on Wastewater Treatment Techniques: The effectiveness of adsorption method. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(8), 9050-9066. doi:10.1007/s11356-021-12395-x

Rodríguez Monroy, Carlos, y Fernández Chalé, Lizbeth. (2006). Manufactura textil en México: Un enfoque sistémico. *Revista Venezolana de Gerencia*, 11(35), 335-

351. Consultado de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttextpid=S1315-99842006000300002yIng=esytIng=es.

Rossetti, I., Conte, F., y Ramis, G. (2021). Kinetic modelling of biodegradability data of commercial polymers obtained under aerobic composting conditions. *Eng*, 2(1), 54–68. doi:10.3390/eng2010005

Sarkar, S., Banerjee, A., Halder, U., Biswas, R., y Bandopadhyay, R. (2017). Degradation of synthetic azo dyes of textile industry: A sustainable approach using microbial enzymes. *Water Conservation Science and Engineering*, 2(4), 121-131. doi:10.1007/s41101-017-0031-5

Sarkar, S., Ponce, N. T., Banerjee, A., Bandopadhyay, R., Rajendran, S., y Lichtfouse, E. (2020). Green polymeric nanomaterials for the photocatalytic degradation of Dyes: A Review. *Environmental Chemistry Letters*, 18(5), 1569-1580. doi:10.1007/s10311-020-01021-w

Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Informe de la Situación del Medio Ambiente en México (2022) . Consultado de <https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/informe15/tema/cap6.html>.

Selvaraj, V., Swarna Karthika, T., Mansiya, C., y Alagar, M. (2021). An over review on recently developed techniques, mechanisms and intermediate involved in the advanced azo dye degradation for industrial applications. *Journal of Molecular Structure*, 1224, 129195. doi:10.1016/j.molstruc.2020.129195

Sheldon, R. A., y van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what, and how. *Chem. Soc. Rev.*, 42(15), 6223–6235. doi:10.1039/c3cs60075k

Silva, L. S., Gonçalves, M. M., y Raddi de Araujo, L. R. (2019). Combined photocatalytic and biological process for textile wastewater treatments. *Water Environment Research*, 91(11), 1490-1497. doi:10.1002/wer.1143

Singh, R. L., Singh, P. K., y Singh, R. P. (2015). Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes – a review. *International Biodeterioration y Biodegradation*, 104, 21-31. doi:10.1016/j.ibiod.2015.04.027

Sreedharan, V., y Bhaskara Rao, K. V. (2019). Biodegradation of textile azo dyes. *Nanoscience and Biotechnology for Environmental Applications*, 22, 115-139. doi:10.1007/978-3-319-97922-9_5

Srivastava, A., Rani, R., Patle, D., y Kumar, S. (2021). Emerging bioremediation technologies for the treatment of textile wastewater containing synthetic dyes: a comprehensive review. *Journal Of Chemical Technology & Biotechnology*, 97(1), 26-41. doi:10.1002/jctb.6891

Sun, L., Mo, Y., y Zhang, L. (2022). A mini review on bio-electrochemical systems for the treatment of azo dye wastewater: State-of-the-art and future prospects. *Chemosphere*, 294, 133801. doi:10.1016/j.chemosphere.2022.133801

Sushvanth Reddy, A., Kalla, S., y Murthy, Z. (2021). Textile wastewater treatment via membrane distillation. *Environmental Engineering Research*, 27(5), 210228-0. doi:10.4491/eer.2021.228

Weldegebrerial, G. K. (2020). Synthesis method, antibacterial and photocatalytic activity of ZnO nanoparticles for azo dyes in wastewater treatment: A Review. *Inorganic Chemistry Communications*, 120, 108140. doi:10.1016/j.inoche.2020.108140

Wu, E., Li, Y., Huang, Q., Yang, Z., Wei, A., y Hu, Q. (2019). Laccase immobilization on amino-functionalized magnetic metal organic framework for phenolic compound removal. *Chemosphere*, 233, 327-335. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.05.150

Wu, G., Liu, X., Zhou, P., Wang, L., Hegazy, M., Huang, X., y Huang, Y. (2019). A facile approach for the reduction of 4- nitrophenol and degradation of Congo red

using gold nanoparticles or laccase decorated hybrid inorganic nanoparticles/polymer-biomacromolecules vesicles. *Materials Science and Engineering: C*, 94, 524-533. doi:10.1016/j.msec.2018.09.061

Yavaşer, R., y Karagözler, A. A. (2021). Laccase immobilized polyacrylamide-alginate cryogel: A candidate for treatment of effluents. *Process Biochemistry*, 101, 137–146. doi:10.1016/j.procbio.2020.11.021

Zahirinejad, S., Hemmati, R., Homaei, A., Dinari, A., Hosseinkhani, S., Mohammadi, S., y Vianello, F. (2021). Nano-organic supports for enzyme immobilization: Scopes and perspectives. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 204, 111774. doi:10.1016/j.colsurfb.2021.111774

Zdarta, J., Meyer, A., Jesionowski, T., y Pinelo, M. (2018). A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility. *Catalysts*, 8(2), 92. doi:10.3390/catal8020092

Zhang, W., Yang, Q., Luo, Q., Shi, L., y Meng, S. (2020). Laccase-carbon nanotube nanocomposites for enhancing dyes removal. *Journal of Cleaner Production*, 242, 118425. doi:10.1016/j.jclepro.2019.118425