



# MÁSTER UNIVERSITARIO EN INGENIERÍA INDUSTRIAL

## TRABAJO FIN DE MÁSTER EVALUACIÓN Y DEGRADACIÓN DE LOS MICROPLÁSTICOS

Autor: Gabriel Guillermo Marroig Corripio

Director: Noemí Delgado Mellado

Co-Director: Javier Calzada Funes

Madrid, 2025



Declaro, bajo mi responsabilidad, que el Proyecto presentado con el título

**Evaluación y degradación de los microplásticos**

en la ETS de Ingeniería - ICAI de la Universidad Pontificia Comillas en el

curso académico 2024/25 es de mi autoría, original e inédito y

no ha sido presentado con anterioridad a otros efectos.

El Proyecto no es plagio de otro, ni total ni parcialmente y la información que ha sido

tomada de otros documentos está debidamente referenciada.



Fdo.: Gabriel Guillermo Marroig Corripio

Fecha: 29/ 08/ 2025

Autorizada la entrega del proyecto

EL DIRECTOR DEL PROYECTO

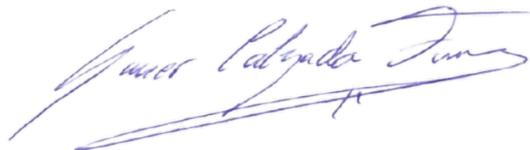


Fdo.: Noemí Delgado Mellado

Fecha: 1. 9. 2025

Fdo.: Javier Calzada Funes

Fecha: 1. 9. 2025







# MÁSTER UNIVERSITARIO EN INGENIERÍA INDUSTRIAL

## TRABAJO FIN DE MÁSTER EVALUACIÓN Y DEGRADACIÓN DE LOS MICROPLÁSTICOS

Autor: Gabriel Guillermo Marroig Corripio

Director: Noemí Delgado Mellado

Co-Director: Javier Calzada Funes

Madrid, 2025

# Agradecimientos

En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis tutores, Noemí Delgado Mellado y Javier Calzada Funes, por su dedicación constante, sus valiosos consejos y por la paciencia que han tenido conmigo a lo largo del proyecto. Sin ellos, este trabajo no se hubiera podido terminar con éxito.

De igual manera quiero agradecer a los profesores de máster y a mis compañeros de universidad por todo el apoyo que me han ofrecido en los años de duración de mi doble máster, permitiéndome crecer tanto profesionalmente, como personalmente.

A mi familia, muchas gracias por vuestro apoyo incondicional y por haber sido un pilar fundamental en mi vida.

Y por supuesto, quiero agradecer a mis 4 lectores, que no necesitan ser nombrados, ustedes ya sabéis quiénes sois.



# EVALUACIÓN Y DEGRADACIÓN DE LOS MICROPLÁSTICOS

**Autor:** Marroig Corripio, Gabriel Guillermo.

Director: Delgado Mellado, Noemí.

Co-Director: Calzada Funes, Javier.

Entidad Colaboradora: ICAI – Universidad Pontificia Comillas

## RESUMEN DEL PROYECTO

Este proyecto estudia el uso de enzimas hidrolíticas como método para la degradación de microplásticos (MP), específicamente de tereftalato de polietileno (PET), comúnmente presente en envases y materiales de embalaje. Se detallan los procedimientos experimentales para preparar las muestras y realizar las pruebas de degradación, así como el análisis del efecto de distintas enzimas sobre los MP.

La actividad enzimática se caracteriza mediante técnicas espectrofotométricas y se estudia su cinética según el modelo de Michaelis-Menten, empleando diferentes soluciones tampón. Además, se analiza la morfología del PET antes y después del tratamiento enzimático.

Los resultados indican que, bajo condiciones ambientales adecuadas, las enzimas contribuyen a la degradación de los MP, principalmente mediante la reducción de su tamaño. Asimismo, se observa que la actividad enzimática está influenciada por la fuerza iónica del medio, la cual puede llegar a inhibir la acción de la enzima.

**Palabras clave:** Microplásticos; biodegradación; enzimas; contaminación plástica; degradación de PET; cinética enzimática; Michaelis-Menten

### 1. Introducción

La mayoría de los plásticos se fabrican a partir de productos derivados del petróleo, el gas natural y el carbón. Entre estos plásticos se incluyen el tereftalato de polietileno (PET), el polietileno de alta densidad (HDPE), el polietileno de baja densidad (LDPE), el polipropileno (PP) y el cloruro de polivinilo (PVC). Estos materiales presentan principalmente las siguientes propiedades: ligereza, resistencia al calor, alta maleabilidad, buena tenacidad y alta resistencia a la tracción. Estas propiedades les han permitido utilizarse en una amplia variedad de aplicaciones, como dispositivos telefónicos, radios, tuberías de plomería, ropa sintética, artículos personales y elementos de infraestructura, entre otros, que ha provocado el aumento de la demanda de estos materiales a 400 millones de toneladas en 2018 [1],[2]. Se estima que anualmente se vierten al mar alrededor de 8 millones de toneladas de plástico, lo que afecta a la vida marina y, a través de las cadenas tróficas, también a la

vida terrestre [3]. Esta acumulación favorece la aparición de nuevos tipos de microcontaminantes denominados microplásticos (MP), que, con un tamaño inferior a 5 mm, tienen diversos efectos nocivos sobre los organismos debido a los efectos de bioacumulación y biomagnificación.

Existen diversos tratamientos para reducir los residuos plásticos: 1) Físicos: vertederos o incineración; 2) Químicos: hidrólisis, alcoholólisis o glicólisis; y 3) Mecánicos: trituración, molienda, compactación o prensado, separación, extrusión y delaminación, entre otros. Los dos primeros tienen como inconveniente que liberan contaminantes secundarios (generados en el medio ambiente debido a reacciones entre contaminantes primarios y elementos atmosféricos) y subproductos peligrosos (como dioxinas, metales tóxicos y furanos generados en procesos industriales). Respecto al tercero, el mecánico, actualmente es muy ineficiente porque los residuos plásticos llegan mezclados con impurezas y, con cada ciclo de reciclaje, el polímero pierde propiedades mecánicas como la viscosidad [2]. Recientemente ha surgido un nuevo método de tratamiento, el tratamiento biológico, con buenas perspectivas y un bajo impacto ambiental. El método biológico se centra en el aislamiento y estudio de enzimas hidrolíticas que rompen los enlaces presentes en la estructura de los plásticos, provenientes de bacterias y hongos. Este nuevo método de biodegradación enzimática de los plásticos ofrece una nueva alternativa con un potencial de degradación el cual aún se encuentra en etapas tempranas de desarrollo, aunque las perspectivas futuras de este método son bastante alentadoras

## **2. Definición del Proyecto**

El proyecto tiene como finalidad estudiar la eficacia del método de degradación enzimático de los plásticos, enfocándose particularmente los de tipo tereftalato de polietileno (PET) que es el que más se utiliza en la actualidad con casi 70 millones de toneladas anuales [2] y se espera que las toneladas de PET que se producen aumenten [3]. El trabajo analiza la eficacia en la degradación y reducción de la contaminación de estos MP mediante el uso de enzimas, un método ecológico que no generan contaminación residual ni contaminantes secundarios. En este trabajo se mostrarán y aplicarán las técnicas necesarias para realizar la caracterización de las enzimas hidrolíticas con un seguimiento de la degradación enzimática del PET, así como una perspectiva económica a escala de laboratorio del coste que puede tener este método bioquímico para la degradación de estos microcontaminantes.

## **3. Definición de la metodología**

Para la realización de este proyecto se han establecido 3 fases principales. La 1ª fase es de investigación mientras que la 2ª y la 3ª son fases experimentales:

- Fase de investigación y selección de enzimas: se hará un estudio bibliográfico para comprender el funcionamiento y qué tipos de enzimas pueden servir para el objetivo

de este proyecto. En esta fase se hará uso principalmente de artículos y publicaciones científicas y bases de datos como Uniprot.org [5] o Expasy.org [6] para estudiar las características de dichas enzimas, centrándose sobre todo en las enzimas comerciales disponibles. De esta manera, combinando la información disponible en bibliografía y las correspondientes bases de datos, se estudiarán las características de diferentes enzimas candidatas, así como sus condiciones de operación óptimas en cuanto a pH y temperatura.

- Fase de determinación de actividad enzimática: con las enzimas seleccionadas, se procederá a estimar sus parámetros cinéticos, haciendo uso del modelo Michaelis-Menten y de la Ley de Lambert-Beer. Para ello se utilizará un sustrato de referencia, el paranitrofenol butirato, con el que se prepararán disoluciones patrón. Mediante espectrofotometría, se realizará el seguimiento de la reacción enzimática, a través de la disminución de la concentración de dicho sustrato. Para ello, se medirá la absorbancia de muestras tomadas a diferentes tiempos de ensayo, considerando las respectivas temperaturas óptimas de las enzimas seleccionadas. Para mantener y controlar la temperatura que se desea para los ensayos, se hará uso de una incubadora orbital, para facilitar el contacto entre sustrato y enzima. En estos ensayos se han usado las disoluciones *buffer* disolución salina tamponada (PBS) y tris(hidroximetil)-aminometano con ácido clorhídrico (Tris-HCl) para fijar el mismo pH en todos los experimentos, para su posterior comparación.
- Fase de desarrollo de ensayos de MP: finalizada la obtención de los parámetros de la actividad enzimática, se elegirá cuál es el medio adecuado para realizar los ensayos con el PET, así como las temperaturas óptimas de las enzimas. Se prepararán y analizarán reservorios sintéticos de agua y de medio Tris-HCl que contendrán PET (al comprobarse analíticamente tras la fase 2 que este medio es el más idóneo para los ensayos), para conocer su concentración de partículas, fijando tanto un valor alto como uno bajo de concentración de MP. Se realizarán ensayos previamente diseñados, considerando controles negativos apropiados. Al igual que en la fase 2, se utilizará en los ensayos la Incubadora Orbital SKI 4. Para el análisis de las muestras se utilizarán el Microscopio DSX1000 y el Microscopio FTIR para analizar las medidas y la composición de las partículas encontradas.

#### 4. Resultados

Tras haber realizado los ensayos para determinar la actividad enzimática de las enzimas se han obtenido los siguientes valores velocidad máxima ( $v_{\max}$ ) y constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ):

Tablas 1: Parámetros de la cinética enzimática de los ensayos con una cantidad simple de enzima.

Temperatura	Simple concentración de enzima							
	Tris-HCl buffer				PBS buffer			
	Lipasa B		Cutinasa 2P		Lipasa B		Cutinasa 2P	
	v máx. (mM/min)	Km (mM)	v máx. (mM/min)	Km (mM)	v máx. (mM/min)	Km (mM)	v máx. (mM/min)	Km (mM)
55 °C	0,012	0,092	$4,916 \cdot 10^{-3}$	0,225	$5,000 \cdot 10^{-3}$	0,055	$9,020 \cdot 10^{-4}$	0,0125
37 °C	0,003	0,212	$6,420 \cdot 10^{-4}$	$1,475 \cdot 10^{-3}$	-	-	$3,621 \cdot 10^{-4}$	0,0124

Tablas 2: Parámetros de la cinética enzimática de los ensayos con una cantidad doble de enzima.

Temperatura	Doble concentración de enzima							
	Tris-HCl buffer				PBS buffer			
	Lipasa B		Cutinasa 2P		Lipasa B		Cutinasa 2P	
	v máx. (mM/min)	Km (mM)	v máx. (mM/min)	Km (mM)	v máx. (mM/min)	Km (mM)	v máx. (mM/min)	Km (mM)
55 °C	0,406	1,315	$6,375 \cdot 10^{-3}$	0,235	$3,700 \cdot 10^{-3}$	0,688	$4,730 \cdot 10^{-4}$	0,115
37 °C	0,001	0,092	$1,518 \cdot 10^{-3}$	0,0469	-	-	$5,163 \cdot 10^{-4}$	0,0533

En las tablas 1 y 2 se observa que las velocidades máximas de ambas enzimas son superiores en los ensayos con el medio buffer Tris-HCl en comparación con las obtenidas empleando la disolución PBS. En consecuencia, para la obtención de la mejor actividad enzimática de las enzimas en los ensayos para la degradación del PET, se opta por solo la utilización del buffer Tris-HCl.

Los resultados obtenidos en los ensayos de degradación del PET se recopilan en las siguientes tablas:

Tablas 3: Resumen resultados concentraciones PET en los ensayos de Lipasa B

Temperatura de ensayo	Concentración de PET definida	Medio Tris+ PET SIN enzima (MP/mL)	Ensayos Lipasa (MP/mL)	Variación de la concentración en ensayos Lipasa B (MP/mL)
37°C	Baja Concentración PET	11,97	14,41	2,43
	Alta concentración PET	13,33	23,40	10,07
55°C	Baja Concentración PET	12,76	13,14	0,37
	Alta concentración PET	18,30	20,40	2,091

Tablas 4: Resumen resultados concentraciones PET en los ensayos de Cutinasa 2P

Temperatura de ensayo	Concentración de PET definida	Medio Tris+ PET SIN enzima (MP/mL)	Ensayos Cutinasa (MP/mL)	Variación de la concentración en ensayos Cutinasa 2P (MP/mL)
37 °C	Baja Concentración PET	11,97	12,42	0,44
	Alta concentración PET	13,33	24,64	11,30
55 °C	Baja Concentración PET	12,76	8,33	-4,43
	Alta concentración PET	18,30	19,600	1,291

Los resultados muestran un aumento de la concentración de los microplásticos de los ensayos donde se han aplicado las dos enzimas, excepto en el caso de la cutinasa a la temperatura de 55 °C. Este caso particular es debido a que la enzima no está actuando en su temperatura óptima (37 °C) pudiendo haberse visto reducida su actividad enzimática.

Para analizar si el aumento de la concentración del plástico se debe a la degradación de partículas PET de mayor tamaño en un tamaño menor, se analiza la morfología del PET para cada uno de los ensayos realizados. En las gráficas a continuación se muestra como ejemplo el tamaño de las partículas para los ensayos a 55 °C encontrados en la disolución buffer Tris-PET sin la adición de la enzima (Figura 1) y con la adición de esta (Figura 2).

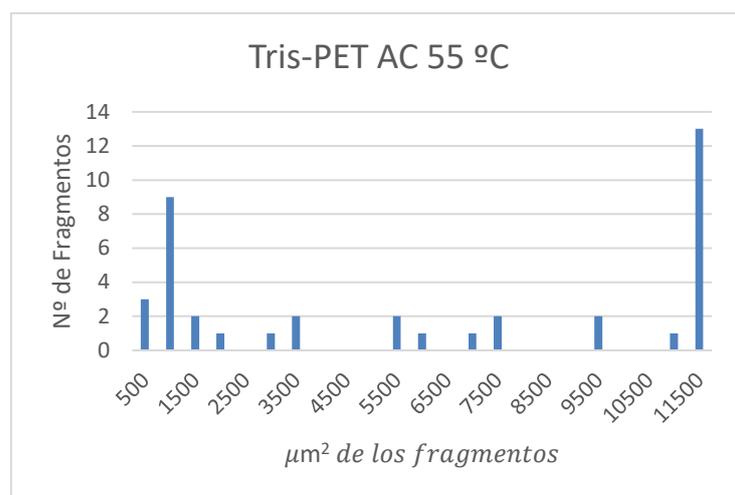


Figura 1: Tamaño de las partículas PET encontradas en la disolución buffer Tris-HCl + PET a 55 °C para una alta concentración (AC) de MP.

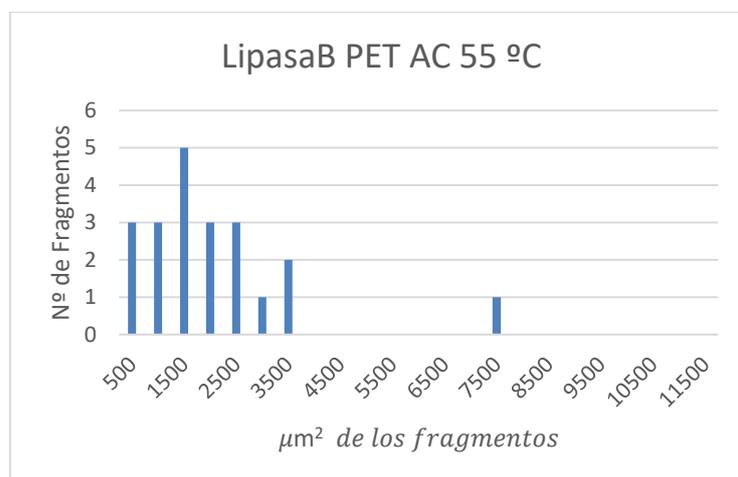


Figura 2: Tamaño de las partículas PET encontradas en el ensayo de la lipasa B + PET a 55 °C para una alta concentración (AC) de MP.

## 5. Conclusiones

Las conclusiones principales obtenidas tras el análisis y la comparación de las muestras realizadas en el laboratorio son las siguientes:

Tras realizar pruebas de actividad enzimática en soluciones Tris-HCl y PBS, las velocidades máximas de las reacciones enzimáticas en la solución tampón PBS fueron inferiores a las obtenidas en la solución tampón Tris-HCl (en algunas pruebas, ni siquiera se detectó ningún efecto catalítico). Esto se debe principalmente a la composición de ambas soluciones, y en particular, a las sales del medio PBS, que pueden afectar la actividad enzimática. Se

confirmó que el medio Tris-HCl es adecuado para el correcto funcionamiento de las enzimas. Los cationes sodio y potasio podrían actuar como cofactores de las enzimas, afectando la velocidad de reacción.

En los ensayos de degradación de PET, las concentraciones de MP en las pruebas aumentaron en comparación con los blancos de control negativo. Esto significa que, en las condiciones de temperatura adecuadas, las enzimas hidrolíticas presentan una alta actividad enzimática, degradando y rompiendo los enlaces primarios del PET. Esta conclusión también se ve respaldada por la reducción del tamaño de partícula que se muestra en los gráficos de las tablas de frecuencia de las pruebas. Por lo tanto, se observa un desplazamiento a la izquierda en la distribución de tamaño dentro de los histogramas correspondientes, donde se observa un movimiento del tamaño del PET hacia la izquierda de los gráficos, mostrando una reducción en el tamaño promedio de las partículas más pequeñas de PET. Este aumento, que inicialmente podría ser perjudicial debido al aumento de la concentración de MP y la disminución del tamaño, y podría afectar el torrente sanguíneo, facilita el acceso de otros seres vivos a los enlaces secundarios y la degradación completa del PET.

## 6. Referencias

- [1] GBIBI Inyectados SL. *La historia del Plástico*. Disponible: <https://gbinyectados.com/la-historia-del-plastico/>
- [2] N. F. S. Khairul Anuar *et al*, "An Overview into Polyethylene Terephthalate (PET) Hydrolases and Efforts in Tailoring Enzymes for Improved Plastic Degradation," *IJMS*, vol. 23, (20), 2022. DOI: 10.3390/ijms232012644.
- [3] V. Tournier *et al*, "An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles," *Nature*, vol. 580, (7802), 2020. Disponible: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32269349/>. DOI: 10.1038/s41586-020-2149-4.
- [4] David and Garcia Lamigueiro. DKV Instituto de Vida Saludable. Ecodes.&nbsp; "Contaminación por plásticos. Uno de los mayores desafíos ambientales del siglo XXI," Noviembre, 2019. Disponible: <https://ecodes.org/hacemos/cultura-para-la-sostenibilidad/salud-y-medioambiente/observatorio-de-salud-y-medio-ambiente/contaminacion-por-plasticos-uno-de-los-mayores-desafios-ambientales-del-siglo-xxi>.
- [5] Uniprot.org, "Uniprot," Disponible: <https://www.uniprot.org/>.
- [6] Expasy.org, "Expasy," Disponible: <https://www.expasy.org/>.

# EVALUATION AND DEGRADATION OF MICROPLASTICS

**Author: Marroig Corripio, Gabriel Guillermo.**

Supervisor: Delgado Mellado, Noemí.

Co-Supervisor: Calzada Funes, Javier.

Collaborating Entity: ICAI – Universidad Pontificia Comillas

## ABSTRACT

This project studies the use of hydrolytic enzymes as a method for the degradation of microplastics (MP), specifically polyethylene terephthalate (PET), commonly found in packaging materials. The project details the experimental procedures for preparing samples and performing degradation tests, as well as the analysis of the effect of different enzymes on MP.

Enzymatic activity is characterized using spectrophotometric techniques, and its kinetics are studied according to the Michaelis-Menten model, using different buffer solutions. In addition, the morphology of the PET is analysed before and after enzymatic treatment.

The results indicate that, under appropriate environmental conditions, enzymes contribute to MP degradation, primarily by reducing their size. Furthermore, it is observed that enzymatic activity is influenced by the ionic strength of the medium, which can inhibit the action of the enzyme.

**Keywords:** Microplastics; biodegradation; enzymes; plastic pollution; PET degradation; enzyme kinetics; Michaelis-Menten

## 1. Introduction

Most plastics are manufactured from petroleum, natural gas, and coal products. These plastics include polyethylene terephthalate (PET), high-density polyethylene (HDPE), low-density polyethylene (LDPE), polypropylene (PP), and polyvinyl chloride (PVC). These materials mainly exhibit the following properties: light weight, heat resistance, high malleability, good toughness, and high tensile strength. These properties have allowed them to be used in a wide variety of applications, such as telephone devices, radios, plumbing pipes, synthetic clothing, personal items, and infrastructure elements, among others, which has led to an increase in demand for these materials to 400 million tons in 2018 [1], [2]. It is estimated that around 8 million tons of plastic are dumped into the sea annually, affecting marine life and, through food chains, also terrestrial life [3]. This accumulation favors the emergence of new types of micropollutants called microplastics (MP), which, with a size less than 5 mm, have various harmful effects on organisms due to the effects of bioaccumulation and biomagnification.

There are several treatments to reduce plastic waste: 1) Physical: landfills or incineration; 2) Chemical: hydrolysis, alcoholysis or glycolysis; and 3) Mechanical: crushing, grinding, compaction or pressing, separation, extrusion and delamination, among others. The first two have the disadvantage that they release secondary pollutants (generated in the environment due to reactions between primary pollutants and atmospheric elements) and hazardous byproducts (such as dioxins, toxic metals and furans generated in industrial processes). Regarding the third, the mechanical one, it is currently very inefficient because plastic waste arrives mixed with impurities and, with each recycling cycle, the polymer loses mechanical properties such as viscosity [2]. A new treatment method, biological treatment, has recently emerged, offering promising prospects and a low environmental impact. The biological method focuses on the isolation and study of hydrolytic enzymes that break the bonds present in the structure of plastics, derived from bacteria and fungi. This new method of enzymatic biodegradation of plastics offers a new alternative with a degradation potential that is still in its early stages of development, although the prospects for this method are quite encouraging.

## **2. Project definition**

The project aims to study the effectiveness of the enzymatic degradation method of plastics, focusing particularly on polyethylene terephthalate (PET) type, which is the most used today with almost 70 million tons per year [2] and the tons of PET produced are expected to increase [3]. The work analyzes the effectiveness in the degradation and reduction of pollution of these MP using enzymes, an ecological method that does not generate residual pollution or secondary pollutants. In this work, the necessary techniques to characterize hydrolytic enzymes with a monitoring of the enzymatic degradation of PET will be shown and applied, as well as an economic perspective at laboratory scale of the cost that this biochemical method can have for the degradation of these micropollutants.

## **3. Definition of methodology**

This project has been divided into three main phases. The first phase is research, while the second and third are experimental phases:

- Enzyme research and selection phase: a bibliographic study will be carried out to understand the functioning and what types of enzymes can serve the objective of this project. In this phase, mainly scientific articles and publications and databases such as Uniprot.org [5] or Expasy.org [6] will be used to study the characteristics of these enzymes, focusing mainly on available commercial enzymes. In this way, combining the information available in bibliography and the corresponding databases, the characteristics of different candidate enzymes will be studied, as well as their optimal operating conditions in terms of pH and temperature.
- Enzyme activity determination phase: with the selected enzymes, their kinetic parameters will be estimated using the Michaelis-Menten model and the Lambert-

Beer law. For this purpose, a reference substrate, paranitrophenol butyrate, will be used to prepare standard solutions. The enzymatic reaction will be monitored spectrophotometrically through the decrease in the concentration of said substrate. To this end, the absorbance of samples taken at different assay times will be measured, considering the respective optimal temperatures of the selected enzymes. To maintain and control the desired temperature for the assays, an orbital incubator will be used to facilitate contact between the substrate and enzyme. These assays used buffered saline (PBS) and Tris(hydroxymethyl)-aminomethane with hydrochloric acid (Tris-HCl) buffer solutions to establish the same pH in all experiments for later comparison.

- MP assay development phase: Once the enzyme activity parameters have been obtained, the appropriate medium for performing the PET assays will be selected, as well as the optimal enzyme temperatures. Synthetic reservoirs of water and Tris-HCl medium containing PET (since it was analytically verified after Phase 2 that this medium is the most suitable for the assays) will be prepared and analysed to determine their particle concentration, setting both high and low MP concentration values. Pre-designed assays will be performed, considering appropriate negative controls. As in Phase 2, the SKI 4 Orbital Incubator will be used for the assays. The DSX1000 Microscope and the FTIR Microscope will be used to analyse the samples to determine the measurements and composition of the particles found.

#### 4. Results

After having carried out the tests to determine the enzymatic activity of the enzymes, the following maximum velocity ( $v_{max}$ ) and Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ) values were obtained:

*Table 1: Parameters of enzyme kinetics of single-amount enzyme assays*

Temperature	Single-amount enzyme assays							
	Tris-HCl buffer				PBS buffer			
	Lipase B		Cutinase 2P		Lipase B		Cutinase 2P	
	$v_{max}$ (mM/min)	$K_m$ (mM)	$v_{max}$ (mM/min)	$K_m$ (mM)	$v_{max}$ (mM/min)	$K_m$ (mM)	$v_{max}$ (mM/min)	$K_m$ (mM)
55 °C	0,012	0,092	$4,916 \cdot 10^{-3}$	0,225	$5,000 \cdot 10^{-3}$	0,055	$9,020 \cdot 10^{-4}$	0,0125
37 °C	0,003	0,212	$6,420 \cdot 10^{-4}$	$1,475 \cdot 10^{-3}$	-	-	$3,621 \cdot 10^{-4}$	0,0124

Table 2: Parameters of enzyme kinetics of double-amount enzyme assays

Temperature	Double-amount enzyme assays							
	Tris-HCl buffer				PBS buffer			
	Lipase B		Cutinase 2P		Lipase B		Cutinase 2P	
	v max. (mM/min)	Km (mM)	v max. (mM/min)	Km (mM)	v max. (mM/min)	Km (mM)	v max. (mM/min)	Km (mM)
55 °C	0,406	1,315	6,375*10 <sup>-3</sup>	0,235	3,700*10 <sup>-3</sup>	0,688	4,730*10 <sup>-4</sup>	0,115
37 °C	0,001	0,092	1,518*10 <sup>-3</sup>	0,0469	-	-	5,163*10 <sup>-4</sup>	0,0533

Tables 1 and 2 show that the maximum velocities of both enzymes are higher in the assays using the Tris-HCl buffer medium compared to those obtained using the PBS solution. Consequently, to obtain the best enzymatic activity of the enzymes in the PET degradation assays, the Tris-HCl buffer alone was chosen.

The results obtained in the PET degradation tests are compiled in the following tables:

Table 3: Summary of PET concentration results in lipase B assays

Temperature	Defined PET concentration	Concentration Tris+PET WITHOUT enzyme (MP/mL)	Concentration cutinase test (MP/mL)	Concentration variation lipase B test (MP/mL)
37°C	Low concentration PET	11,97	14,41	2,43
	High concentration PET	13,33	23,40	10,07
55°C	Low concentration PET	12,76	13,14	0,37
	High concentration PET	18,30	20,40	2,091

Table 4: Summary of PET concentration results in cutinase 2P assays

Temperature	Defined PET concentration	Concentration Tris+PET WITHOUT enzyme (MP/mL)	Concentration cutinase test (MP/mL)	Concentration variation lipase B test (MP/mL)
37 °C	Low concentration PET	11,97	12,42	0,44
	High concentration PET	13,33	24,64	11,30
55 °C	Low concentration PET	12,76	8,33	-4,43
	High concentration PET	18,30	19,600	1,291

The results show an increase in the concentration of microplastics in the tests where both enzymes were applied, except in the case of cutinase at a temperature of 55°C. This case is due to the enzyme not acting at its optimal temperature (37°C), which may have reduced its enzymatic activity.

To analyze whether the increase in plastic concentration is due to the degradation of larger PET particles into smaller ones, the morphology of the PET is analyzed for each of the tests performed. The graphs below show, as an example, the particle sizes for the tests at 55°C found in the Tris-PET buffer solution without the addition of the enzyme (Figure 1) and with it (Figure 2).

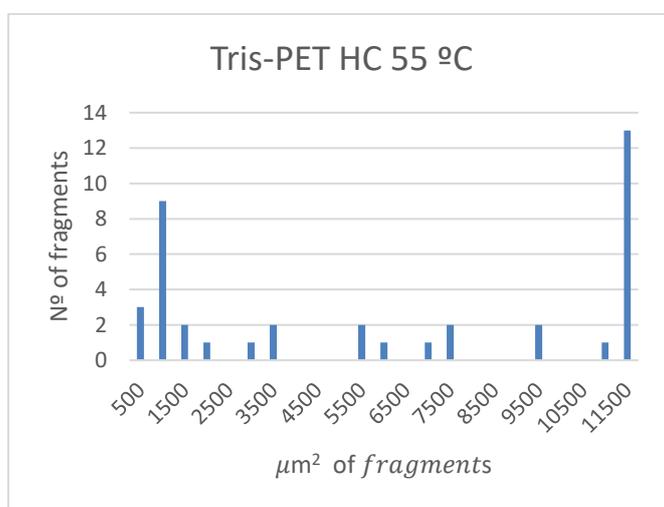


Figure 1: Size of PET particles found in the Tris-HCl + PET buffer solution at 55 °C for a high concentration (HC) of MP.

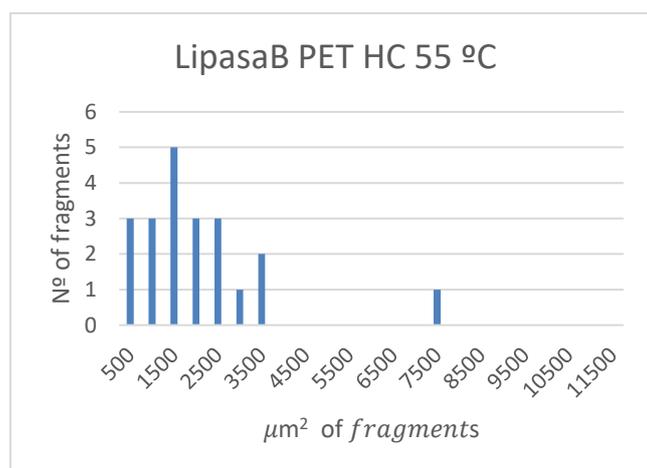


Figure 2: Size of PET particle found in the lipase B + PET assay at 55 °C for a high concentration (HC) of MP.

## 5. Conclusions

The main conclusions obtained after the analysis and comparison of the samples taken in the laboratory are the following:

After performing enzyme activity tests in Tris-HCl and PBS solutions, the maximum rates of enzymatic reactions in PBS buffer were lower than those obtained in Tris-HCl buffer (in some tests, no catalytic effect was even detected). This is mainly due to the composition of both solutions, and to the salts in the PBS medium, which can affect enzyme activity. It was confirmed that the Tris-HCl medium is suitable for the proper functioning of the enzymes. Sodium and potassium cations could act as cofactors for enzymes, affecting the reaction rate.

In PET degradation assays, MP concentrations in the samples increased compared to the negative control blanks. This means that, under the appropriate temperature conditions, hydrolytic enzymes exhibit high enzymatic activity, degrading and breaking the primary bonds of PET. This conclusion is also supported by the reduction in particle size shown in the graphs of the frequency tables of the tests. Therefore, a left shift in the size distribution is observed within the corresponding histograms, where a movement of PET size to the left of the graphs is observed, showing a reduction in the average size of the smallest PET particles. This increase, which could initially be harmful due to the increased MP concentration and decreased size and could affect the bloodstream, facilitates access by other living organisms to the secondary bonds and the complete degradation of PET.

## 6. References

- [1] GBIBI Inyectados SL. *La historia del Plástico*. Available: <https://gbinyectados.com/la-historia-del-plastico/>
- [2] N. F. S. Khairul Anuar *et al*, "An Overview into Polyethylene Terephthalate (PET) Hydrolases and Efforts in Tailoring Enzymes for Improved Plastic Degradation," *IJMS*, vol. 23, (20), 2022. DOI: 10.3390/ijms232012644.
- [3] V. Tournier *et al*, "An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles," *Nature*, vol. 580, (7802), 2020. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32269349/>. DOI: 10.1038/s41586-020-2149-4.
- [4] David and Garcia Lamigueiro. DKV Instituto de Vida Saludable. Ecodes.&nbsp;nbsp;, "Contaminación por plásticos. Uno de los mayores desafíos ambientales del siglo XXI," Noviembre, 2019. Available: <https://ecodes.org/hacemos/cultura-para-la-sostenibilidad/salud-y-medioambiente/observatorio-de-salud-y-medio-ambiente/contaminacion-por-plasticos-uno-de-los-mayores-desafios-ambientales-del-siglo-xxi>.
- [5] Uniprot.org, "Uniprot," Available: <https://www.uniprot.org/>.
- [6] Expasy.org, "Expasy," Available: <https://www.expasy.org/>.

## Índice de la memoria

<b>Capítulo 1. Introducción .....</b>	<b>14</b>
<b>Capítulo 2. Descripción de materiales y métodos.....</b>	<b>18</b>
2.1 Principales equipos y herramientas utilizados.....	18
2.1.1 Microscopio Olympus DSX1000 .....	18
2.1.2 Espectrofotómetro de infrarrojo Jasco.....	19
2.1.3 Espectrofotómetro Spectroquant Prove 100   300   600 .....	21
2.1.4 Balanza analítica XS205 DU.....	22
2.1.5 Agua ultrapura .....	23
2.1.6 Campana de extracción.....	24
2.1.7 Estufa.....	24
2.1.8 Incubadora orbital SKI4.....	25
2.1.9 Mortero de laboratorio y placas Petri .....	25
2.2 Métodos utilizados .....	26
2.2.1 Técnica de filtración a vacío .....	26
2.2.2 Técnicas espectrofotométricas .....	27
2.2.3 Estrategias de submuestreo en Microespectroscopía.....	32
<b>Capítulo 3. Estado de la cuestión.....</b>	<b>35</b>
3.1 Definición y tipos de microplásticos .....	35
3.2 Definición y eliminación/tratamiento del PET .....	37
3.2.1 Tratamientos convencionales de residuos PET.....	38
3.2.2 Tratamientos biológicos .....	43
3.3 Enzimas, actividad enzimática y nomenclatura.....	48
3.3.1 Enzimas .....	48
3.3.2 Actividad enzimática .....	49
3.3.3 Nomenclatura enzimática.....	51
3.4 Cinética de las reacciones enzimáticas.....	54
3.4.1 Modelo Michaelis-Menten.....	54
3.4.2 Factores externos que influyen en la actividad catalítica de las enzimas.....	56
<b>Capítulo 4. Definición del trabajo.....</b>	<b>59</b>

4.1	Justificación.....	59
4.2	Objetivos del proyecto.....	60
4.3	Objetivos de Desarrollo Sostenible .....	61
4.3.1	ODS 3- Salud y bienestar .....	61
4.3.2	ODS 6-Agua limpia y saneamiento .....	62
4.3.3	ODS 9-Industria, innovación e infraestructuras .....	62
4.3.4	ODS 13-Acción por el clima.....	62
4.3.5	ODS 14-Vida submarina .....	63
4.3.6	ODS 15-Vida de ecosistemas terrestres .....	63
<b>Capítulo 5. Sistema/modelo desarrollado .....</b>		<b>64</b>
5.1	Resumen de la metodología del proyecto.....	64
5.2	Selección de enzimas y del sustrato modelo .....	66
5.2.1	Selección de enzimas .....	66
5.2.2	Selección de sustrato de referencia.....	68
5.3	Diseño de los ensayos de actividad enzimática .....	70
5.3.1	OBTENCIÓN DEL ESPECTRO DEL pNP-BUTIRATO .....	70
5.3.2	Desarrollo de ensayos de actividad enzimática .....	72
5.3.3	Preparación de disoluciones buffer y compuestos .....	72
5.3.4	Diseño de los ensayos.....	76
5.3.5	Diseño de los patrones .....	81
5.3.6	Análisis de las medidas (ejemplo lipasa B duplicando la cantidad de enzima en medio Tris-HCl).....	82
5.4	Ensayos de degradación del PET .....	88
5.4.1	Preparación de muestras sintéticas.....	88
5.4.2	Análisis de muestras sintéticas.....	90
5.4.3	Desarrollo de los ensayos experimentales con PET.....	94
5.4.4	Preparación y análisis de las medidas .....	98
<b>Capítulo 6. Planificación y estimación económica .....</b>		<b>101</b>
6.1	Presupuesto de los dispositivos empleados .....	101
6.2	Presupuesto de herramientas de laboratorio, compuestos y enzimas .....	102
<b>Capítulo 7. Recopilación y discusión de resultados .....</b>		<b>103</b>
7.1	Preparación patrones de referencia.....	103

7.2	Actividad enzimática lipasa Calc B.....	105
7.2.1	<i>Patrones de referencia de los ensayos</i> .....	106
7.2.2	<i>Ensayos disolución Tris-HCl</i> .....	107
7.2.3	<i>Ensayos disolución PBS</i> .....	111
7.3	Actividad enzimática cutinasa 2P.....	115
7.3.1	<i>Patrones de referencia de los ensayos</i> .....	116
7.3.2	<i>Ensayos disolución Tris-HCl</i> .....	117
7.3.3	<i>Ensayos disolución PBS</i> .....	122
	Resumen y análisis de los resultados de la actividad enzimática.....	126
7.4	Resultados de las muestras con PET .....	127
	<b>Capítulo 8. Conclusiones y trabajos futuros.....</b>	<b>138</b>
8.1	Conclusiones .....	138
8.2	Trabajos futuros.....	140
	<b>Capítulo 9. Bibliografía.....</b>	<b>141</b>
	<b>ANEXO I Disolución Tris con Enzima Lipasa B.....</b>	<b>146</b>
	<b>ANEXO II Disolución PBS con Enzima Lipasa B .....</b>	<b>148</b>
	<b>ANEXO III Disolución Tris con Enzima Cutinasa 2P.....</b>	<b>150</b>
	<b>ANEXO IV Disolución PBS con Enzima Cutinasa 2P.....</b>	<b>152</b>

## *Índice de figuras*

Figura 1: Tamaño de las partículas PET encontradas en la disolución buffer Tris-HCl + PET a 55 °C para una alta concentración (AC) de MP.....	13
Figura 2: Tamaño de las partículas PET encontradas en el ensayo de la lipasa B + PET a 55 °C para una alta concentración (AC) de MP.....	13
Figura 3: Presencia de plásticos en la vida marina.....	15
Figura 4: Esquema de la degradación del PET mediante uso de hidrolasas.....	17
Figura 5: Microscopio OLYMPUS DSX1000 .....	19
Figura 6: Espectrofotómetro de Infrarrojo JASCO (FTIR + microscopio).....	20
Figura 7: Depósito de nitrógeno líquido y guantes de protección.....	21
Figura 8: Espectrofotómetro Spectroquant Prove .....	22
Figura 9: Balanza XS205 DU.....	23
Figura 10: Purificador de agua Direct-Q 5UV .....	24
Figura 11: Campana de extracción .....	24
Figura 12: Estufa de laboratorio .....	25
Figura 13: Incubadora orbital SKI 4.....	25
Figura 14: Mortero de laboratorio y placas Petri.....	26
Figura 15: Espectro de absorción de una molécula .....	29
Figura 16: Intensidad de longitud de onda a través de una muestra.....	29
Figura 17: Relación lineal absorbancia-concentración.....	32
Figura 18: Curva de calibración absorbancia-concentración .....	32
Figura 19: Distribución de las áreas de medición en un filtro circular, siguiendo diferentes disposiciones: (A) Extendiéndose sobre un cuarto del filtro. (B) Formando una cruz. (C) Siguiendo una espiral. (D) Colocación aleatoria.....	33
Figura 20: Estructura química del PET .....	37
Figura 21: Síntesis comercial del BHET .....	38
Figura 22: Condensación del BHET para formar PET.....	38
Figura 23: Tipos de tratamientos para residuos PET.....	39
Figura 24: Reacción de despolimerización del PET con hidrólisis.....	40

Figura 25: Reacción de metanólisis del PET.....	41
Figura 26: Despolimerización del PET con etilenglicol.....	41
Figura 27: Estructura química del PET y sus productos de degradación.....	45
Figura 28: Gráfica de energía libre para reacciones con o sin enzima.....	50
Figura 29: Modelo de Fischer llave-cerradura donde se representa la enzima (E), el sustrato (S) y los productos de la reacción formados (P1 y P2).....	51
Figura 30: Modelo de Koshland del ajuste inducido donde se representa la enzima (E), el sustrato (S) y los productos de la reacción formados (P1 y P2).....	51
Figura 31: Gráfica velocidad de reacción-concentración de sustrato.....	55
Figura 32: Ejemplo del efecto del pH en la velocidad de reacción.....	57
Figura 33: Ejemplo del efecto de la temperatura en la velocidad de reacción.....	58
Figura 34: Objetivos de Desarrollo Sostenible.....	61
Figura 35: Actividad enzimática de la Calc B dependiendo de la temperatura (A) y el pH (B).....	67
Figura 36: Actividad enzimática de la cutinasa 2P dependiendo del pH y del medio.....	68
Figura 37: Actividad enzimática de la cutinasa 2P dependiendo de la temperatura.....	68
Figura 38: Hidrólisis del compuesto pNP ester para formar pNP.....	69
Figura 39: Absorbancia-longitud de onda para una concentración-0.4 de pNPB en medio PBS.....	71
Figura 40: Absorbancia-longitud de onda para una concentración-0.4 de pNPB en medio Tris-HCl.....	71
Figura 41: Evolución del pH respecto a los HCl añadidos a la Solución de Tris.....	75
Figura 42: Comparación de colores del medio Tris-HCl(arriba) y PBS (abajo) únicamente con concentración-0.4 de pNP-B (medio), ante la adición de HCl (izquierda) y NaOH (derecha).....	77
Figura 43: Gráfica absorbancia-tiempo de la lipasa B a doble cantidad de enzima en medio Tris-HCl.....	83
Figura 44: Curva patrón del Tris-HCl con pNPB.....	84
Figura 45: Gráfica concentración-tiempo del ensayo lipasa B en medio Tris-HCl.....	85

Figura 46: Velocidad de reacción frente a la concentración del ensayo lipasa B en medio Tris-HCl.....	86
Figura 47: Inversa de la velocidad de reacción frente a la inversa de concentración del ensayo lipasa B en medio Tris-HCl.....	86
Figura 48: Botella de plástico usada para la obtención del PET .....	88
Figura 49: Botellas de la muestra de H <sub>2</sub> O + PET y Tris-HCl + PET .....	90
Figura 50: Patrón de referencia para los filtros .....	91
Figura 51: Fibra de PET procedente de los reservorios sintéticos. ....	93
Figura 52: Fragmento de PET procedente de los reservorios sintéticos.....	93
Figura 53: Concentración de MP en los reservorios sintéticos .....	94
Figura 54: Partículas encontradas con el microscopio Olympus DSX1000.....	98
Figura 55: Partícula PET encontrada en el ensayo .....	100
Figura 56: Comparación de espectros de la partícula hallada en el análisis.....	100
Figura 57: Patrón de referencia 24/48/96h del medio Tris-HCl.....	104
Figura 58: Patrón de referencia 24/48/312h del medio PBS .....	104
Figura 59: Patrón de referencia para la acción enzimática lipasa B medio Tris-HCl .....	106
Figura 60: Patrón de referencia para la acción enzimática lipasa B medio PBS.....	106
Figura 61: Gráficas absorbancia/tiempo de los ensayos de Lipasa B a 55 °C en medio Tris-HCl .....	107
Figura 62: Gráficas concentración/tiempo de los ensayos de lipasa B a 55 °C en medio Tris-HCl .....	107
Figura 63: Gráfica inversa de velocidad/inversa de concentración del ensayo 1 de lipasa B a 55 °C en medio Tris-HCl.....	108
Figura 64: Gráfica inversa de velocidad/inversa de concentración del ensayo 2 de lipasa B a 55 °C en medio .....	109
Figura 65: Gráficas absorbancia/tiempo de los ensayos de lipasa B a 37 °C en medio Tris-HCl .....	109
Figura 66: Gráficas concentración/tiempo de los ensayos de lipasa B a 37° C en medio Tris-HCl .....	110

Figura 67: Gráfica inversa de velocidad/inversa de concentración del ensayo 3 de lipasa B a 37 °C en medio Tris-HCl .....	110
Figura 68: Gráfica inversa de velocidad/inversa de concentración del ensayo 4 de lipasa B a 37 °C en medio Tris-HCl .....	111
Figura 69: Gráficas absorbancia/tiempo de los ensayos de lipasa B a 55° C en medio PBS .....	112
Figura 70: Gráficas concentración/tiempo de los ensayos de lipasa B a 55° C en medio PBS .....	112
Figura 71: Gráfica inversa de velocidad/inversa de concentración del ensayo 1 de lipasa B a 55 °C en medio PBS .....	113
Figura 72: Gráfica inversa de velocidad/inversa de concentración del ensayo 2 de lipasa B a 55 °C en medio PBS .....	113
Figura 73: Gráficas absorbancia/tiempo de los ensayos de lipasa B a 37 °C en medio PBS .....	114
Figura 74: Gráficas concentración/tiempo de los ensayos de lipasa B a 37 °C en medio PBS .....	114
Figura 75: Patrón de referencia para la acción enzimática cutinasa 2P medio Tris-HCl ..	116
Figura 76: Patrón de referencia para la acción enzimática cutinasa 2P medio PBS .....	116
Figura 77: Gráficas absorbancia/tiempo de los ensayos de cutinasa 2P a 55 °C en medio Tris-HCl .....	117
Figura 78: Gráficas concentración/tiempo de los ensayos de cutinasa 2P a 55 °C en medio Tris-HCl.....	117
Figura 79: Gráfica inversa de velocidad/inversa de concentración del Ensayo 1 de cutinasa 2P a 55° C en medio Tris-HCl .....	118
Figura 80: Gráfica inversa de velocidad/inversa de concentración del ensayo 2 de cutinasa 2P a 55 °C en medio Tris-HCl .....	119
Figura 81: Gráficas absorbancia/tiempo de los ensayos de cutinasa 2P a 37 °C en medio Tris-HCl .....	119
Figura 82: Gráficas concentración/tiempo de los ensayos de cutinasa 2P a 37 °C en medio Tris-HCl.....	120

Figura 83: Gráfica inversa de velocidad/inversa de concentración del ensayo 3 de cutinasa 2P a 37 °C en medio Tris-HCl .....	120
Figura 84: Gráfica inversa de velocidad/inversa de concentración del ensayo 3 de cutinasa 2P a 37° C en medio Tris-HCl .....	121
Figura 85: Gráficas Absorbancia/Tiempo de los Ensayos de cutinasa 2P a 55 °C en Medio PBS .....	122
Figura 86: Gráficas absorbancia/tiempo de los ensayos de cutinasa 2P a 55 °C en medio PBS .....	122
Figura 87: Gráfica inversa de velocidad/inversa de concentración del ensayo 1 de cutinasa 2P a 55° C en medio PBS .....	123
Figura 88: Gráfica inversa de velocidad/inversa de concentración del ensayo 2 de cutinasa 2P a 55 °C en medio .....	123
Figura 89: Gráficas absorbancia/tiempo de los ensayos de cutinasa 2P a 37 °C en medio PBS .....	124
Figura 90: Gráficas absorbancia/tiempo de los ensayos de cutinasa 2P a 37° C en medio PBS .....	124
Figura 91: Gráfica inversa de velocidad/inversa de concentración del ensayo 3 de cutinasa 2P a 37° C en medio PBS .....	125
Figura 92: Gráfica inversa de velocidad/inversa de concentración del ensayo 4 de cutinasa 2P a 37° C en medio PBS .....	125
Figura 93: En verde el espectro de la partícula PET analizada en el FTIR y en azul el espectro del PET procedente de la biblioteca de la base de datos con el que se hace la comparación. ....	128
Figura 94: En verde el espectro de una partícula de celulosa analizada en el FTIR, en azul y en rojo los espectros de la celulosa y PET procedentes de la biblioteca del software con los que se hace la comparación. ....	129
Figura 95: Fibra de celulosa en FTIR.....	129
Figura 96: Concentración MP en ensayos de controles negativos H <sub>2</sub> O .....	131
Figura 97: Concentración MP en ensayos de controles negativos Tris-HCl.....	131
Figura 98: Concentraciones MP en los ensayos Lipasa B + PET .....	132

---

Figura 99: Concentraciones MP en los ensayos Cutinasa 2P + PET .....	132
Figura 100: Tamaño de los fragmentos MP encontrados en los medios Tris-HCl a 55 °C	134
Figura 101: Tamaño de los fragmentos MP encontrados en los ensayos de la lipasa B a 55 °C .....	134
Figura 102: Tamaño de los fragmentos MP encontrados en los ensayos de la cutinasa 2P a 55 °C .....	135
Figura 103: Tamaño de los fragmentos MP encontrados en los medios Tris-HCl a 37 °C	136
Figura 104: Tamaño de los fragmentos MP encontrados en los ensayos de la lipasa B a 37 °C .....	136
Figura 105: Tamaño de los fragmentos MP encontrados en los ensayos de la cutinasa 2P a 37 °C .....	137

## *Índice de tablas*

Tabla 1: Comparación color absorbido y observado para cada longitud de onda máxima (nm)	28
Tabla 2: Tamaños de los plásticos y su denominación.....	35
Tabla 3: Microorganismos degradadores de los plásticos .....	43
Tabla 4: Tabla de clasificación de enzimas con ejemplos.....	53
Tabla 5: Volúmenes para la preparación de los patrones .....	81
Tabla 6: Elementos analizados por infrarrojos de la muestra de H <sub>2</sub> O Pura + PET .....	92
Tabla 7: Elementos analizados por infrarrojos de la muestra de TRIS + PET .....	92
Tabla 8: Tramos del espectro retirados, correspondientes al filtro de celulosa.....	99
Tabla 9: Coste de los equipos empleados.....	101
Tabla 10: Coste de herramientas de laboratorio, compuestos y enzimas .....	102
Tabla 11: Parámetros de la cinética enzimática de los ensayos con una cantidad simple de enzima.....	126
Tabla 12: Parámetros de la cinética enzimática de los ensayos con una cantidad doble de enzima.....	126
Tabla 13: Porcentaje de celulosa y PET en los ensayos realizados de alta concentración de PET .....	130
Tabla 14: Porcentaje de celulosa y PET en los ensayos realizados de baja concentración de PET .....	130
Tabla 15: Resumen resultados concentraciones PET en los ensayos de Lipasa B.....	133
Tabla 16: Resumen resultados concentraciones PET en los ensayos de Cutinasa 2P.....	133
Tabla 17: Resultados absorbancia-tiempo ensayo con simple concentración de enzima lipasa B a 55°C en disolución Tris.....	146
Tabla 18: Resultados absorbancia-tiempo ensayo con doble concentración de enzima lipasa B a 55°C en disolución Tris.....	146
Tabla 19: Resultados absorbancia-tiempo ensayo con simple concentración de enzima lipasa B a 37 °C en disolución Tris.....	147

Tabla 20: Resultados absorbancia-tiempo ensayo con doble concentración de enzima lipasa B a 37 °C en disolución Tris .....	147
Tabla 21: Resultados absorbancia-tiempo ensayo con simple concentración de enzima lipasa B a 55°C en disolución PBS .....	148
Tabla 22: Resultados absorbancia-tiempo ensayo con doble concentración de enzima lipasa B a 55°C en disolución PBS .....	148
Tabla 23: Resultados absorbancia-tiempo ensayo con simple concentración de enzima lipasa B a 37 °C en disolución PBS .....	149
Tabla 24: Resultados absorbancia-tiempo ensayo con doble concentración de enzima lipasa B a 37 °C en disolución PBS .....	149
Tabla 25: Resultados absorbancia-tiempo ensayo con simple concentración de enzima cutinasa 2P a 55°C en disolución Tris .....	150
Tabla 26: Resultados absorbancia-tiempo ensayo con doble concentración de enzima cutinasa 2P a 55°C en disolución Tris .....	150
Tabla 27: Resultados absorbancia-tiempo ensayo con simple concentración de enzima cutinasa 2P a 37 °C en disolución Tris .....	151
Tabla 28: Resultados absorbancia-tiempo ensayo con doble concentración de enzima cutinasa 2P a 37 °C en disolución Tris .....	151
Tabla 29: Resultados absorbancia-tiempo ensayo con simple concentración de enzima cutinasa 2P a 55°C en disolución PBS.....	152
Tabla 30: Resultados absorbancia-tiempo ensayo con doble concentración de enzima cutinasa 2P a 55°C en disolución PBS.....	152
Tabla 31: Resultados absorbancia-tiempo ensayo con simple concentración de enzima cutinasa 2P a 37 °C en disolución PBS.....	153
Tabla 32: Resultados absorbancia-tiempo ensayo con doble concentración de enzima cutinasa 2P a 37 °C en disolución PBS.....	153

## *Lista de acrónimos y siglas*

A	Absorbancia
ACUT2	<i>Arxula adenivorans</i>
ARI	Agua residual industrial
ARU	Agua residual urbana
ATP	Adenosín trifosfato
BHET	Tereftalato de bis (2-hidroxietileno)
BREF	Documento de referencia de mejores técnicas disponibles
EDAR	Estación depuradora de agua residual
EG	Etilenglicol
ETAP	Estación de tratamiento de agua potable
HCl	Ácido clorhídrico
HDPE	Polietileno de alta densidad
IR	Radiación infrarroja
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
LDPE	Polietileno de baja densidad
MHET	Ácido mono (2-hidroxietil) tereftalato
MP	Microplásticos
NaOH	Hidróxido de sodio
ODS	Objetivos de Desarrollo Sostenible
PBS	Disolución salina tamponada

*LISTA DE ACRÓNIMOS Y SIGLAS*

---

PET	Tereftalato de polietileno
PHE	Enzimas hidrolíticas del PET
pNP	Paranitrofenol
pNPB	Paranitrofenol butirato
PP	Polipropileno
PVC	Cloruro de polivinilo
rpm	Revoluciones por minuto
RSU	Residuos sólidos urbanos
T	Transmitancia
TPA	Ácido tereftálico
Tris-HCl	Tris (hidroximetil)-aminometano con ácido clorhídrico
UV	Ultravioleta

## **Capítulo 1. INTRODUCCIÓN**

La invención del plástico suele situarse en 1860, cuando John Wesley Hyatt presentó, en un concurso de invenciones, su creación celuloide formada por la disolución de celulosa en alcanfor y etanol. Este plástico semisintético daría comienzo al desarrollo y evolución del plástico actual, cuyo origen puede datarse en el año 1907 cuando el químico americano Leo Baekeland inventó, a partir de fenol y formaldehído, la primera sustancia plástica completamente sintética llamada baquelita. Este elemento tenía la capacidad de poder moldearse en calor y una vez en frío daba lugar a una sustancia termoestable, resistente y aislante [1][2]

En la actualidad, la mayoría de los plásticos están formados por productos derivados del petróleo, gas natural y carbón. Entre ellos se encuentran el polietileno (PE), el tereftalato de polietileno (PET), el polietileno de alta densidad (HDPE), el polietileno de baja densidad (LDPE), el polipropileno (PP) y el cloruro de polivinilo (PVC) caracterizados, principalmente, por las siguientes propiedades: peso ligero, resistencia al calor, alta maleabilidad, buena dureza, elevada resistencia a la tracción. Estas propiedades han permitido su uso en una gran variedad de aplicaciones como teléfonos, radios, tubos de cañerías, ropa sintética, utensilios personales, elementos de infraestructura, entre otros, y son muy importantes en una amplia gama de industrias como la textil, automotriz o manufacturera [1][3]. Esta gran variedad de aplicaciones ha provocado que la demanda aumente de 2 millones de toneladas en el año 1950 hasta aproximadamente 400 millones de toneladas en el año 2018 con un gran impacto ambiental, particularmente en el ecosistema marino.

Se estima que anualmente se vierten en el mar en torno a 8 millones de toneladas de plástico afectando la vida marítima, y a través de las cadenas tróficas, también a la vida terrestre [4]. Dicha acumulación ha propiciado, además, la aparición de unos nuevos tipos de microcontaminantes denominados microplásticos (MP), de un tamaño inferior a 5 mm, que presentan diversos efectos nocivos en los organismos, tal y como se expondrá más adelante. El Parlamento Europeo ha informado a través de su página web de la presencia en el mar de

aproximadamente 51.000 millones de este tipo de partículas de MP, tanto primarios (liberados ya en tamaños microscópicos) como secundarios (producidos por la degradación progresiva de los residuos plásticos de mayor tamaño) en los siguientes porcentajes: en torno a un 15-31% son MP de origen primario, provenientes de partículas de la abrasión de neumáticos por la conducción, lavado de ropa sintética y productos de cuidado personal y de limpieza y entre un 69-81% MP secundarios procedentes principalmente de la degradación de bolsas de plástico, botellas y redes de pesca [4]

Esta alta presencia de partículas de MP está haciendo que sean consumidos por parte de los distintos organismos que hay en el medio marino causando un descenso en su proliferación debido, no sólo a un menor acceso a los nutrientes, sustituidos por estos MP en su dieta, sino también a su efecto saciante y la interacción con su sistema reproductivo. Estas partículas una vez dentro del organismo pueden ser retenidas por este (bioacumulación) o pasar a los niveles superiores de la cadena trófica (biomagnificación). Estos efectos nocivos pueden potenciarse debido a la capacidad que tienen los MP de absorber otros contaminantes tales como el zinc o cobre, potenciando los efectos adversos [5].

En la siguiente imagen se ve la presencia de la contaminación en las especies marinas [5]:



*Figura 3: Presencia de plásticos en la vida marina*

La contaminación por plástico es uno de los problemas medioambientales más importantes de la actualidad, debido a la gran variedad de tipos de materiales sintéticos que conforman elementos de uso cotidiano tales como los envases de los alimentos o empaquetado, el incremento de la demanda de estos materiales, así como el aumento de los residuos plásticos que se generan. Hay diversos tratamientos para la reducción de los residuos plásticos. Los principales tratamientos de reciclaje se pueden clasificar en: 1) Físicos: vertederos, o incineración, 2) Químicos: hidrólisis, alcoholisis o glicosisis y 3) Mecánicos: trituración, molido, compactación o prensado, separación, extrusión y deslaminado entre otros. La mayoría de estos tratamientos presentan unos impactos ambientales posteriores debido a la liberación de contaminantes secundarios (generados en el medio ambiente debido a las reacciones entre contaminantes primarios y elementos atmosféricos) y subproductos peligrosos (tales como dioxinas, metales tóxicos y furanos generado en los procesos industriales). El reciclaje mecánico sería una opción válida para la reducción de los residuos plásticos sin que se produzcan subproductos contaminantes, pero es bastante ineficiente en la actualidad debido a que llegan mezclados con impurezas y en cada ciclo de reciclaje el polímero pierde propiedades mecánicas como la viscosidad. [3]

Actualmente ha surgido un nuevo método, el tratamiento biológico, que tiene buenas perspectivas por su bajo impacto ambiental. El método biológico se centra en el aislamiento y estudio de enzimas hidrolíticas procedentes de bacterias y hongos que rompen los enlaces presentes en la estructura de los plásticos. Entre estas enzimas destacan la PETasa (*Hidrolasa de tereftalato de polietileno* EC 3.1.1.101) y la MHETasa (*Hidrolasa de tereftalato de monoetileno* EC 3.1.1.102). En el caso de la PETasa, esta enzima degrada el polímero PET obteniendo tereftalato de bis (2-hidroxietileno) (BHET) y ácido mono (2-hidroxietil) tereftalato (MHET), este último será degradado por la MHETasa obteniendo los monómeros originales, ácido tereftálico (TPA) y etilenglicol (EG), facilitando su recuperación como materias primas y la economía circular, de ahí que tenga este tratamiento buenas perspectivas de futuro. [3]

A continuación, se muestra una imagen del proceso de degradación del PET [3]:

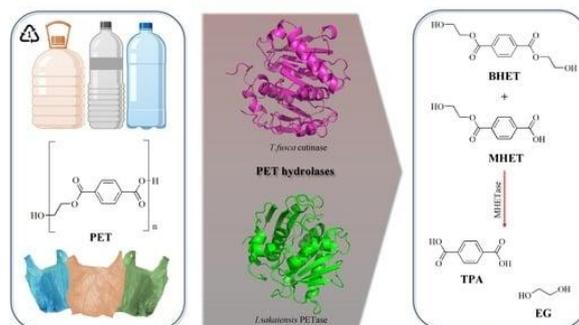


Figura 4: Esquema de la degradación del PET mediante uso de hidrolasas

En este proyecto, se estudia la eficacia de este nuevo método de degradación, así como su potencial en la destrucción de los enlaces de los MP, centrándose en los de tipo PET. El trabajo analiza principalmente la degradación del PET debido a su alta presencia en los plásticos que se están utilizando en la actualidad con casi 70 millones de toneladas anuales [6] y se espera que las toneladas de PET que se producen anualmente aumenten [3]. El proyecto busca con ello analizar la eficacia en la degradación y reducción de la contaminación de estos MP, mediante el uso de enzimas. En este trabajo se mostrarán las técnicas necesarias para realizar la caracterización de las enzimas hidrolíticas con un seguimiento de la degradación enzimática del PET, así como una perspectiva económica a escala de laboratorio del coste que pueden tener este método bioquímico para la degradación de estos microcontaminantes.

## **Capítulo 2. DESCRIPCIÓN DE MATERIALES Y MÉTODOS**

En este capítulo se describen todas las tecnologías y herramientas utilizadas durante la realización de los ensayos, así como las distintas técnicas empleadas para la determinación de los resultados empíricos.

### ***2.1 PRINCIPALES EQUIPOS Y HERRAMIENTAS UTILIZADOS***

#### **2.1.1 MICROSCOPIO OLYMPUS DSX1000**

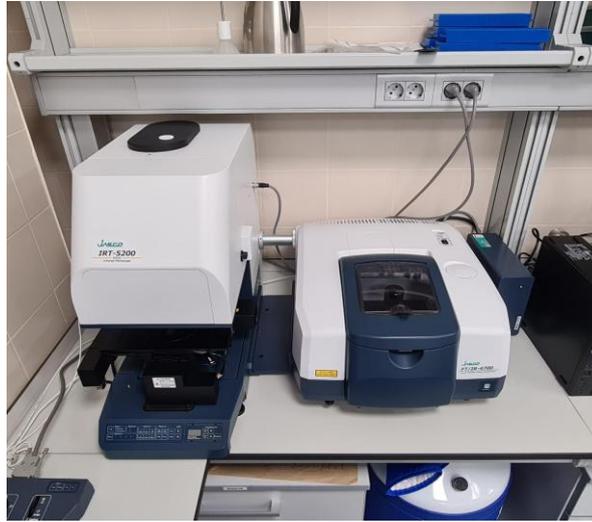
El microscopio Olympus DSX1000 es un microscopio óptico digital que permite realizar inspecciones, análisis de las formas y mediciones de los MP contenidos en las muestras. Consta de lentes de 3, 10, 20 y 40 aumentos, así como un zoom digital que permite una magnificación de 7000 veces en el monitor. Este microscopio será utilizado para analizar la cantidad y morfologías de los MP resultantes en cada uno de los ensayos que se realicen durante este proyecto. En la Figura 5 se presenta una imagen del microscopio.



*Figura 5: Microscopio OLYMPUS DSX1000*

### **2.1.2 ESPECTROFOTÓMETRO DE INFRARROJO JASCO**

El microscopio por espectroscopia de infrarrojos de transformada de Fourier es un dispositivo que permite el análisis de la composición química de los elementos encontrados con el microscopio Olympus. Se hace uso de la radiación infrarroja (IR) que permite identificar cada material en función de su forma de interacción con diferentes longitudes de onda de la región de infrarrojos del espectro electromagnético, permitiendo determinar el tipo de material del que están formados los elementos encontrados con el microscopio óptico. A continuación, se muestra una imagen del equipo en la Figura 6.



*Figura 6: Espectrofotómetro de Infrarrojo JASCO (FTIR + microscopio)*

Es necesario, para el correcto funcionamiento del equipo, el uso de nitrógeno líquido que nos permite estabilizar la medida. El nitrógeno líquido es un gas licuado criogénico con una temperatura de ebullición de  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  y densidad  $0,808\text{ kg/l}$ , ambos referidos a  $1\text{ atm}$ .

Los principales riesgos del uso del nitrógeno líquido son: quemaduras frías, congelación, hipotermia, presurización y explosión, deficiencia de oxígeno y asfixia. El manejo de este líquido criogénico se hará con responsabilidad y seguridad haciendo uso de guantes de seguridad. [7] En la Figura 7 se reproduce una imagen del depósito.



*Figura 7: Depósito de nitrógeno líquido y guantes de protección*

### **2.1.3 ESPECTROFOTÓMETRO SPECTROQUANT PROVE 100 | 300 | 600**

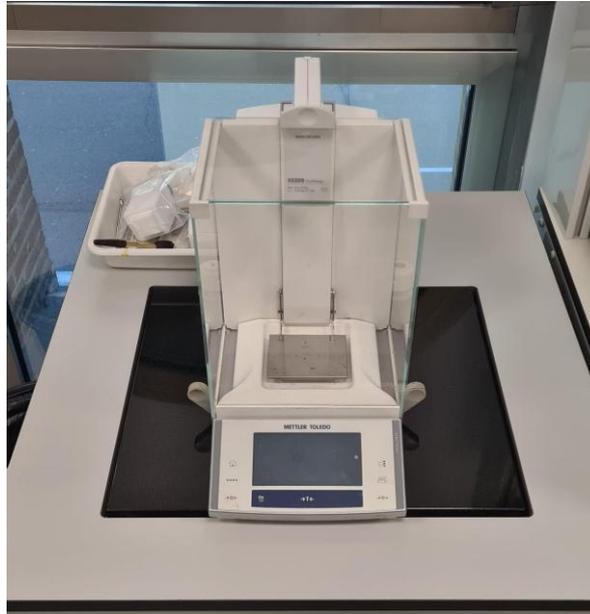
El espectrofotómetro Spectroquant Prove 100 es un instrumento que permite medir la intensidad de luz absorbida después de pasar a través de una disolución de muestra tras ser iluminada mediante el uso de una lámpara de deuterio en el rango de la región visible (longitudes de onda entre 320-1100 nm). En este proyecto se usa para medir la absorbancia total a través del tiempo de un sustrato de referencia, usándose para la determinación de la actividad enzimática la variación de la absorbancia medida a causa de su hidrólisis mediada por las enzimas. Para cada medida es necesario eliminar el efecto de la absorbancia basal, realizando antes de tomar los ensayos un blanco. A continuación, puede verse una imagen del equipo, en la Figura 8.



*Figura 8: Espectrofotómetro Spectroquant Prove*

#### **2.1.4 BALANZA ANALÍTICA XS205 DU**

La balanza analítica XS205 DU es un equipo utilizado en el laboratorio para el pesaje de sustancias. Se utilizará durante el proyecto para el pesaje de la cantidad de enzima requerida para los ensayos, tanto los ensayos de la definición de la actividad catalítica como los de degradación del PET que requieren hacer uso de unidades tanto de mg o de  $\mu\text{g}$ . En la Figura 9 se observa la balanza que se usa en los ensayos.



*Figura 9: Balanza XS205 DU*

### **2.1.5 AGUA ULTRAPURA**

Se hace uso del dispensador de agua purificada tipo I Direct-Q 5UV para obtener el agua pura necesaria para la preparación los tampones de los medios y preparar todas las diluciones empleadas en los ensayos de este proyecto. A continuación, se muestra la purificadora de agua empleada en la Figura 10.



*Figura 10: Purificador de agua Direct-Q 5UV*

### **2.1.6 CAMPANA DE EXTRACCIÓN**

Para la manipulación de elementos tóxicos como el HCl, se hace uso de una campana de extracción, para proteger al usuario de inhalar gases peligrosos. En la Figura 11 se muestra la campana de extracción empleada en este trabajo.



*Figura 11: Campana de extracción*

### **2.1.7 ESTUFA**

Para la eliminación del agua después de la etapa del filtrado, tal como se describe en el apartado 2.2 de técnicas empleadas, es necesario una etapa de secado para los filtros. Se muestra en la Figura 12, la estufa utilizada.



*Figura 12: Estufa de laboratorio*

### **2.1.8 INCUBADORA ORBITAL SKI4**

La incubadora orbital SKI4 es un dispositivo que combina las funciones de agitación y de control de temperatura en un solo equipo. A continuación, se muestra una imagen del equipo en la Figura 13.



*Figura 13: Incubadora orbital SKI 4*

### **2.1.9 MORTERO DE LABORATORIO Y PLACAS PETRI**

Se hará uso para la preparación de las muestras sintéticas de un mortero de laboratorio, que se emplea para triturar y pulverizar el PET y de esta forma obtener MP sobre los que se realiza el ensayo.

Para minimizar la exposición de las muestras a elementos externos, cada vez que las muestras no se estén analizando en los microscopios mencionados previamente, se colocarán en placas Petri que son recipientes de vidrio con una tapa que los cubre, como se ilustra en Figura 14.



*Figura 14: Mortero de laboratorio y placas Petri*

## **2.2 MÉTODOS UTILIZADOS**

### **2.2.1 TÉCNICA DE FILTRACIÓN A VACÍO**

La filtración a vacío es una operación básica, donde una mezcla solido-líquido atraviesa un material poroso que retiene los sólidos de la mezcla original en base a su retención por tamaño a través de un medio poroso. [8]

Se hace uso, en los ensayos de este trabajo, de filtros de nitrato de celulosa con un tamaño de poro de  $0,45 \mu\text{m}$ . Con el objeto de generar una diferencia de presión entre las dos caras del filtro, se dispuso de un matraz kitasato conectado a una línea de vacío. Antes de la realización del efecto filtrado es necesario agitarlo correctamente para facilitar la homogeneización de la muestra que se tome de la disolución madre.

## **2.2.2 TÉCNICAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS**

Este conjunto de técnicas se basa en la capacidad de las moléculas de absorber radiaciones dentro del rango de espectro ultravioleta (UV)-visible en función de la interacción de la energía asociada a los fotones y las transiciones electrónicas que permita la estructura de cada molécula. Esta técnica también permite determinar y caracterizar las biomoléculas, debido a que la eficiencia con la que absorbe las distintas longitudes de onda depende tanto de la estructura atómica como las condiciones del medio (pH, constante dieléctrica, temperatura, fuerza iónica)[9].

### ***2.2.2.1 Regiones ultravioleta y visible***

Como se ha indicado, en espectrofotometría de absorbancia se utilizan la región ultravioleta (195-400 nm) y la visible (400-780 nm)[9]:

- **Región UV:** región de alta energía donde se alcanzan la máxima absorbancia compuestos con dobles enlaces aislados, triples enlaces, enlaces peptídicos, sistemas aromáticos, entre otros. Se emplea como fuente de radiación una lámpara de deuterio. Los espectros de UV pueden verse sometidos a desplazamientos debido a la alteración de la conformación electrónica de las moléculas ante factores como pH, fuerza iónica y la naturaleza del disolvente.
- **Región Visible:** el color que se aprecia en las soluciones se corresponde a las longitudes de onda que en que transmiten, no que absorben. La fuente de radiación visible son lámparas de tungsteno.

A continuación, se muestra una tabla con los colores observados en el rango de espectro de la región visible [10]:

*Tabla 1: Comparación color absorbido y observado para cada longitud de onda máxima (nm)*

<b>Longitud de onda de máxima absorbancia (nm)</b>	<b>Color absorbido</b>	<b>Color observado</b>
380–420	Violeta	Amarillo verdoso
420–440	Azul violáceo	Amarillo
440–470	Azul	Naranja
470–500	Verde azulado	Rojo
500–520	Verde	Púrpura
520–550	Verde amarillento	Violeta
550–580	Amarillo	Azul violáceo
580–620	Naranja	Azul
620–680	Rojo	Verde azulado
680–780	Púrpura	Verde

Los electrones de las moléculas suelen ocupar el nivel de menor energía, pasando únicamente a un estado excitado cuando en condiciones apropiadas adquieren energía. El máximo de absorbancia de una muestra a una determinada longitud de onda de radiación incidente correspondería a una energía igual entre la diferencia entre la energía del estado fundamental y el excitado.[11]

Los espectros de absorción de las moléculas se pueden analizar tanto cuantitativa como cualitativamente. Esto es debido a que la forma del espectro de absorción se utiliza tanto para identificar la presencia de un compuesto como la cantidad presente de una determinada molécula. En la siguiente imagen se muestra un ejemplo de un espectro de absorción de una molécula [11]:

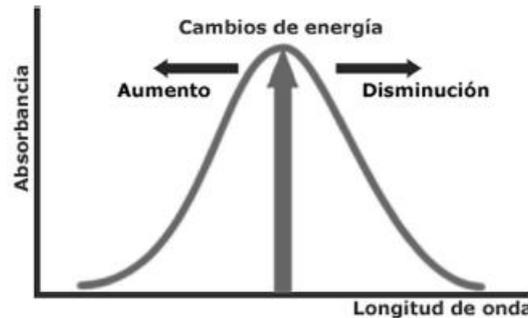


Figura 15: Espectro de absorción de una molécula

### 2.2.2.2 Conceptos de transmitancia y absorbancia. La Ley de Lambert-Beer

Antes de continuar con el desarrollo de este apartado es preciso exponer los conceptos de transmitancia y absorbancia necesarios para la comprensión de la Ley de Lambert-Beer. Para ello se muestra en la siguiente imagen la intensidad de una longitud de onda al atravesar un medio absorbente [9]:

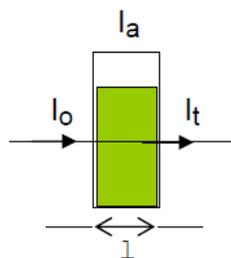


Figura 16: Intensidad de longitud de onda a través de una muestra

- $I_0$  = intensidad incidente. Es la intensidad de una determinada longitud de onda de luz que incide sobre el medio absorbente.
- $I_a$  = intensidad absorbida. Es la cantidad de intensidad de la radiación incidente que se absorbe en el medio.
- $I_t$  = intensidad transmitida. Es la cantidad de intensidad de la radiación incidente que atraviesa la muestra sin ser absorbida.

Se cumple la siguiente ecuación:

$$I_o = I_a + I_t \quad (1)$$

Transmitancia (T): se define como la cantidad de luz transmitida que llega al detector cuando ya ha atravesado la muestra en relación con la cantidad de luz que se incidió sobre ella[9].

$$\%T = \frac{I_t}{I_o} \times 100 \quad (2)$$

Absorbancia (A): el concepto de absorbancia indica la cantidad de luz absorbida por la muestra [9].

$$A = \log \frac{1}{T} = -\log T = -\log \frac{I_t}{I_o} \quad (3)$$

. La relación entre la cantidad de energía absorbida y la cantidad de materia viene establecida por las leyes de Lambert-Beer. La ley de Lambert establece que “la cantidad de luz absorbida por un medio es independiente de la intensidad de la radiación y dependiente del espesor de la muestra y las características de esta”. La Ley de Beer establece que “la cantidad de radiación absorbida es proporcional al número de moléculas que se encuentran en el recorrido de la luz”. [11]

Unificando ambas leyes se determina que la absorbancia de la radiación incidente es proporcional a la trayectoria de la radiación a través de la solución preparada y a la concentración en este medio del componente que produce la absorbancia [12]. La ley de Lambert-Beer se puede expresar mediante la ecuación:

$$A = \log \frac{I_o}{I} = a * b * c \quad (4)$$

- a = absorptividad, es una constante de proporcionalidad que indica como de eficaz es una sustancia para absorber luz. Es una propiedad intensiva de la materia. Sus unidades son:  $l * g^{-1} * cm^{-1}$ . En este proyecto se utiliza la absorptividad molar, definida más adelante.
- b = trayectoria de la radiación a través de la muestra, se utiliza como unidad los cm.

- $c$  = concentración (g/l)

La absorptividad pasa entonces a denominarse absorptividad molar expresándose con  $\epsilon$  ( $l * mol^{-1} * cm^{-1}$ ) cuando la concentración esté en mol/L y  $b$  en cm. La ecuación de la absorbancia se transforma en:

$$A = \epsilon * b * c \quad (5)$$

### **2.2.2.3 Recta de calibrado**

La Ley de Lambert-Beer permite la obtención de las concentraciones de las muestras analizadas a partir de una recta de calibrado. Esta se consigue midiendo las absorbancias de muestras de disoluciones patrón, con concentraciones conocidas del compuesto a analizar. Será necesario calibrar y configurar el espectrofotómetro para seleccionar la longitud de onda de la región del espectro característico del compuesto que se desea determinar, correspondiente a su máximo de absorción [12]. Para que sea válida la Ley de Lambert-Beer en esas concentraciones del sustrato a analizar, la relación absorbancia-concentración debe ser una recta lineal formulándose de la siguiente forma:

$$A = m * C + b \quad (6)$$

- $m$ = pendiente de la recta, correspondería a “ $\epsilon * b$ ” (trayectoria de radiación)
- $b$ = ordenada en el origen (idealmente es 0), en la realidad será distinto de 0 por diversos factores (falta de uniformidad, desviación instrumental...)

En la siguiente imagen se muestra la relación lineal entre las absorbancias y las distintas concentraciones del sustrato [12]:

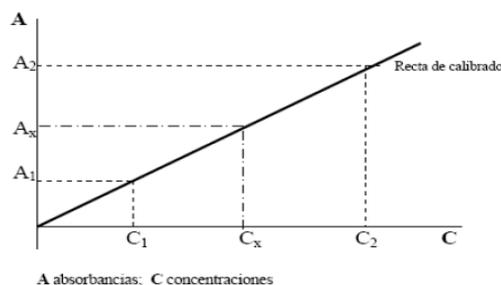


Figura 17: Relación lineal absorbancia-concentración

En la imagen mostrada a continuación se puede observar que el tramo x-y corresponde al intervalo de concentraciones donde los valores de absorbancia varían linealmente con respecto a la concentración, cumpliéndose por tanto la Ley de Lambert-Beer [13]:

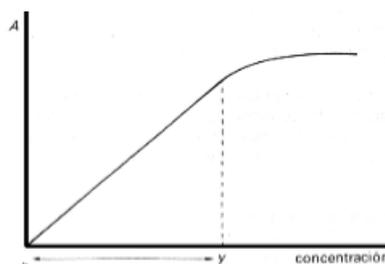


Figura 18: Curva de calibración absorbancia-concentración

### 2.2.3 ESTRATEGIAS DE SUBMUESTREO EN MICROESPECTROSCOPIA

Para el estudio morfológico y la identificación espectrofotométrica de los MP presenten en los filtros, se hace uso del microscopio OLYMPUS DSX 1000 y el espectrofotómetro de Infrarrojo JASCO, respectivamente. Dado que el número de partículas a analizar en las muestras es tan elevado, se hace inviable que se analice el 100% de la totalidad del área del filtro, siendo necesario encontrar otras estrategias que permitan obtener un resultado confiable dentro del margen de error reduciendo la cantidad de partículas a analizar.

En este Proyecto se usarán las estrategias de submuestreo indicadas en el documento científico “Assessment of Subsampling Strategies in Microspectroscopy of Environmental Microplastic Samples” [14], donde se mencionan dos maneras para medir solo una fracción de la muestra y extrapolar los datos:

- i. Submuestreo antes de la filtración: solo una fracción de la muestra total se filtra, requiriendo que esté totalmente homogeneizada para evitar errores.
- ii. Submuestreo durante del análisis: la muestra completa se filtra, pero solo se realizará una medición de una parte del filtro.

En este trabajo se llevará a cabo la segunda forma de muestreo, el cual sirve para cualquier técnica de medición y análisis de MP (FTIR, espectroscopía Raman,...). A continuación, se muestran los 4 tipos de diseños para el análisis de datos que se desarrollan en el documento “Assessment of Subsampling Strategies in Microspectroscopy of Environmental Microplastic Samples” [14].

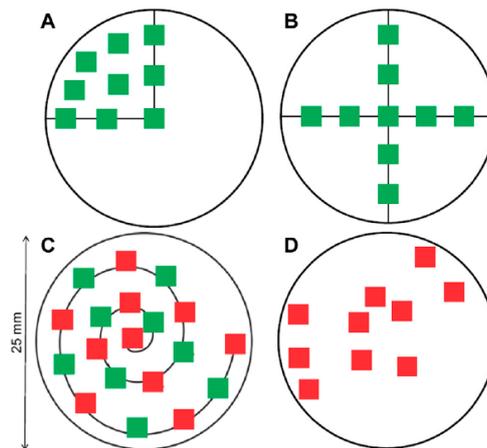


Figura 19: Distribución de las áreas de medición en un filtro circular, siguiendo diferentes disposiciones: (A) Extendiéndose sobre un cuarto del filtro. (B) Formando una cruz. (C) Siguiendo una espiral. (D) Colocación aleatoria.

Las conclusiones a las que se llegan en el documento respecto del uso de cada uno de los 4 tipos de estrategias son las siguientes:

- Ninguna de las estrategias de submuestreo indicadas previamente ha superado a las demás. El error del submuestreo depende del porcentaje de filtro medido en todos los casos analizados.
- El error de medida supera el 50% si solo se mide el 5% del filtro. Para la obtención de un error inferior al 20% se deberá analizar la mitad del filtro para cualquier método

analizado previamente, aunque si se desea obtener recuentos exactos de MP, se recomienda analizar toda la muestra.

- Mejorar la concentración de MP antes del análisis mejora la precisión. Para ello se realizan técnicas de separación o de concentración.

Para facilitar una correcta comparación entre los ensayos realizados en este proyecto, se usará la estrategia de analizar un 25% del filtro. Esto se debe a que las concentraciones definidas en los ensayos son lo suficientemente elevadas para que haya una buena presión a la hora de tomar datos.

## Capítulo 3. ESTADO DE LA CUESTIÓN

### 3.1 DEFINICIÓN Y TIPOS DE MICROPLÁSTICOS

Antes de continuar con el desarrollo y planteamiento de los ensayos, es necesario definir el concepto de MP, los tipos y las distintas clasificaciones que tienen. Un MP es cualquier fragmento de matriz polimérica, con forma regular o irregular y con un tamaño comprendido entre 1  $\mu\text{m}$  a 5 mm. Existen referencias bibliográficas que incluyen a los MP de tamaño 0,1  $\mu\text{m}$  a 1  $\mu\text{m}$  en la clasificación de pequeños MP, pero en este trabajo se ha excluido toda partícula sintética polimérica con un tamaño inferior al 1 $\mu\text{m}$ . En la siguiente tabla se recopilan las distintas categorías de los MP dependiendo del tamaño [15][16]:

Tabla 2: Tamaños de los plásticos y su denominación

Categoría	Diámetro
Nanoplásticos	< 0,1 $\mu\text{m}$
Microplásticos Pequeños	0,1 $\mu\text{m}$ – 1 mm
Microplásticos Grandes	1 – 5,00 mm

Aparte de la clasificación que tienen los plásticos teniendo en cuenta su tamaño, también son clasificados en función de su forma (*pellets*, fibras y fragmentos) y de su origen (primarios y secundarios). Principalmente se usará la que depende del origen, un tipo de clasificación más utilizado y el cual se presenta a continuación:

- Microplásticos primarios: son los MP liberados directamente al medio ambiente. Se estima que un 15-31% de los MP que se encuentran de ambiente marino son primarios. Dentro de esta categoría entrarían [4, 17]:
  - Lavado de textiles sintéticos: se origina en los hogares o en las lavanderías industriales, donde en la etapa del lavado ocurre un desprendimiento de fibras de poliéster, polietileno, acrílico o elastano las cuales llegarán a las aguas residuales.

Se estima que un 34,8% de los MP primarios proceden de estos tratamientos de lavado.

- Erosión de los neumáticos: se debe a la abrasión de los neumáticos durante su uso, los cuales se degradarán y sus partículas serán transportadas por el viento y lluvia hasta su destino final. Representan el 28% de los MP que llegan a los océanos.
- Polvo de ciudad: está conformado por diversas fuentes de origen entre los que estarían: abrasión de objetos (utensilios de cocina sintéticos, suelas de calzado), abrasión de infraestructuras (revestimiento de edificios, césped artificial). Se estima que en torno a un 24% de los MP primarios que llegan al mar son de este tipo.
- Marcas viales: debido a la abrasión realizada por los vehículos, las marcas viales (pintura, cinta de polímeros preformados, termoplástico, etc) van degradándose, desprendiéndose partículas al medioambiente. Esta última categoría solo conforma el 7% de las partículas primarias que llegan a los océanos.
- MP secundarios: son que se originan por la degradación de objetos plásticos de mayor tamaño, la cual es debida a la exposición de elementos externos como la acción del sol o al propio uso del material. El principal punto de partida de estas partículas sería la degradación de bolsas de plástico y redes de pesca. Por su origen es difícil hallar una trazabilidad para este tipo de MP y por ese motivo los estudios se enfocan más en cuantificar los MP primarios. Se estima que entre un 69-81% de los MP que se encuentran de ambiente marino son secundarios[4, 17].

### 3.2 DEFINICIÓN Y ELIMINACIÓN/TRATAMIENTO DEL PET

El PET es un material sintético termoplástico con las propiedades de ser un buen aislante de gases, tener resistencia mecánica, transparencia y brillo. Estas propiedades propiciaron que se realizaran investigaciones para modificar los grados de cristalización del PET para su uso en el moldeo para la fabricación de envases, empaquetados o recipientes [18]. A continuación, se muestra la estructura química del PET [18]:

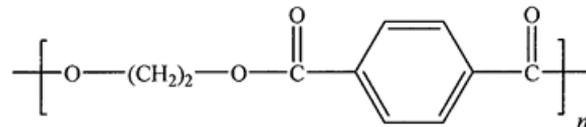


Figura 20: Estructura química del PET

En la actualidad el PET se produce por dos métodos: 1) transesterificación del tereftalato de dimetilo con etilenglicol (EG) y 2) por esterificación directa del ácido tereftálico (TPA) con EG. Lo que se forma en ambos métodos será el tereftalato de bis (2-hidroxi-etileno) (BHET) siendo considerado el monómero del PET. El siguiente paso será la condensación del BHET en presencia de trióxido de antimonio como catalizador. El poliéster fundido será extruido o transformado en fibras y convertido en gránulos para ser conservado hasta su uso final [19]. En las Figuras 21 y 22 se recogen las reacciones químicas de los procesos de obtención del PET [19]:

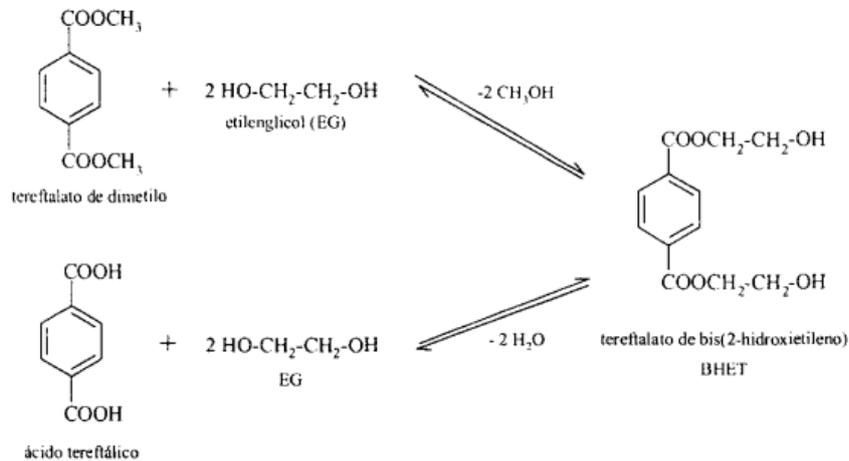


Figura 21: Síntesis comercial del BHET

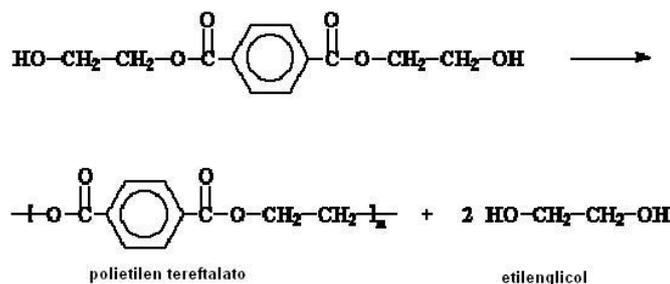


Figura 22: Condensación del BHET para formar PET

### 3.2.1 TRATAMIENTOS CONVENCIONALES DE RESIDUOS PET

En la actualidad la mayoría de los residuos plásticos son eliminados con tratamientos físicos o térmicos, tales como su disposición en vertederos o mediante incineración, o con tratamientos químicos que se basan en la conversión del PET en productos de menor peso molecular. Estos métodos de eliminación de residuos presentan diversas desventajas ambientales por la liberación de contaminantes nocivos, favoreciendo el cambio climático y la creación de subproductos tóxicos que afectan a la salud [3].

Debido a los impactos ambientales previamente mencionados, se está usando el reciclaje mecánico; una alternativa sostenible que no genera MP durante el proceso, pero que resulta muy ineficiente y puede generar productos mal reciclados debido a la aparición de tensiones

mecánicas en los procesos de molienda, extrusión, etc.... Por este motivo se están buscando en la actualidad nuevos métodos de degradación de los plásticos haciendo uso de un método enzimático, aunque todavía está en investigación [3].

A continuación, se muestran los distintos tratamientos para los residuos de plástico [3]:

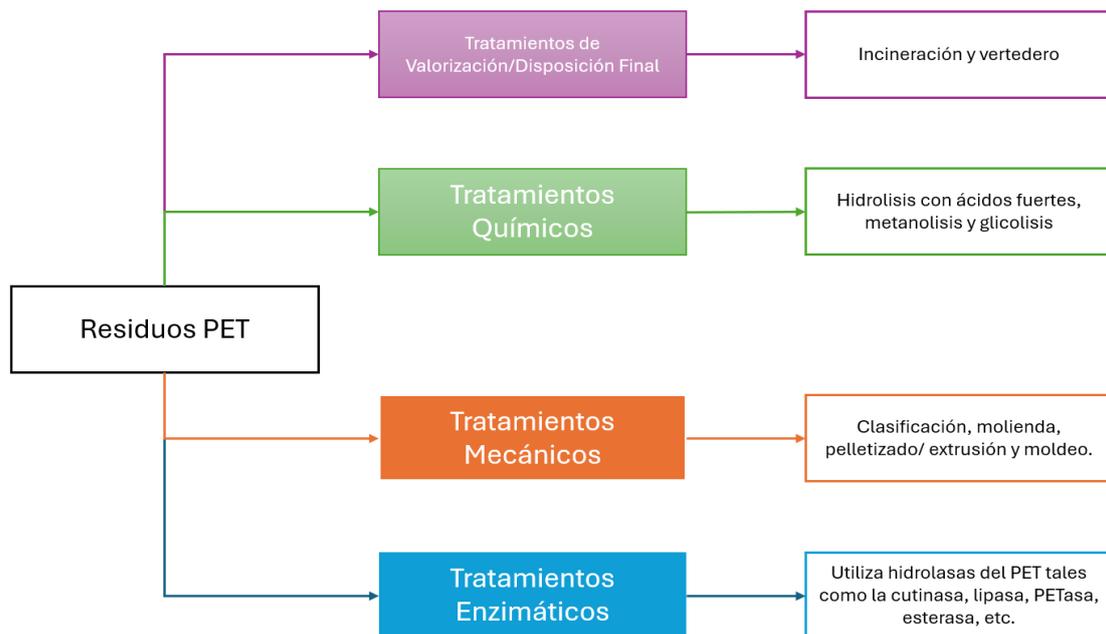


Figura 23: Tipos de tratamientos para residuos PET

En los siguientes subapartados se describen en mayor profundidad los tratamientos químicos y mecánicos mencionados previamente. El empleo de vertederos no ha sido desarrollado en este capítulo debido a que es un método de disposición final de los residuos en general, no ofrece nada innovador desde un punto de vista técnico y es un método ampliamente conocido.

### 3.2.1.1 Tratamiento de recuperación de calor (incineración)

La incineración es un método que permite obtener en forma de calor la energía almacenada en los residuos plásticos mediante el uso de reactores especiales, los incineradores, donde los productos son sometidos a procesos de combustión obteniendo como resultado dióxido de carbono ( $CO_2$ ) y agua ( $H_2O$ ). El calor que se obtiene en forma de vapor de agua servirá para la

generación de electricidad haciendo uso de turbinas. La desventaja de este tratamiento de gestión de residuos plásticos es la generación de gases contaminantes a la atmosfera tales como monóxido de carbono (CO) y dioxinas, pudiéndose llegar a liberar al medio ambiente metales pesados[20].

### 3.2.1.2 Tratamientos químicos

Tal y como se ha indicado previamente, los tratamientos químicos de los residuos se basan en la generación de productos de menor peso molecular. Para realizar este tratamiento se han desarrollado diversos procesos donde el PET se deshace o se despolimeriza para obtener productos intermedios como los poliglicoles, monómeros uniformes o el material inicial con el que fue hecho el PET, los cuales se volverían a utilizar favoreciendo la economía circular. Estos procesos son los siguientes:

- **Hidrólisis:** mediante la reacción de hidrólisis (reacción química del agua con una sustancia), se trata el PET a altas temperaturas en presencia de catalizadores produciéndose TPA y EG. Hay distintos tipos de hidrólisis dependiendo del pH: ácida, neutra y alcalina. Aunque el interés por este método de reciclaje del PET está creciendo, presenta la desventaja de la dificultad de purificar posteriormente el ácido tereftálico. [18, 19]

En la Figura 24 se muestra el esquema de la reacción de hidrólisis del PET [18]:



Figura 24: Reacción de despolimerización del PET con hidrólisis

- **Metanólisis:** el PET es despolimerizado con metanol a altas temperaturas (180-280°C) y a presiones de 2-4 MPa. Se emplean catalizadores de transesterificación como acetato de cinc, acetato de magnesio, etc. Este método presenta los inconvenientes de necesitar catalizadores, altas presiones, creación de oligómeros (moléculas formadas por la unión de pocos monómeros que indican que una reacción es incompleta) y la dificultad de separar productos del EG[19].

A continuación, se muestra el esquema de la reacción de metanólisis del PET [19]:

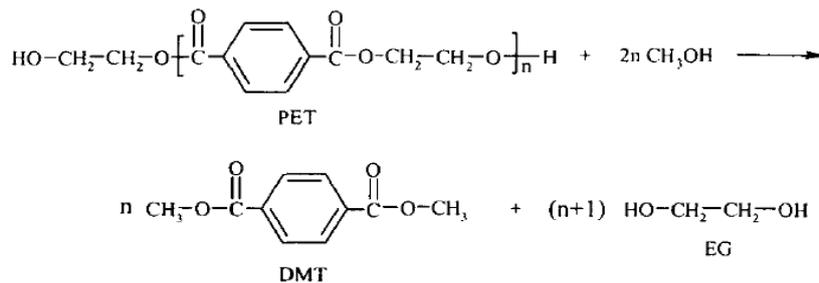


Figura 25: Reacción de metanólisis del PET

- Glicólisis: para la glicólisis del PET, se hace uso de etilenglicol, dietilenglicol, propilenglicol o dipropilenglicol. La reacción glicólisis se realiza durante 8 horas a 200 °C reaccionando el PET en presencia de un catalizador (aminas, alcóxidos o sales de metal de ácido acético) y el glicol, bajo una purga constante de nitrógeno para inhibir la degradación de los polioles que se obtienen. Este tratamiento permite obtener el monómero del PET y puede realizarse en la misma planta de producción para incorporarlo a una cadena de producción. La principal desventaja de este método es la dificultad de separar los oligómeros formados.[18, 19]

En la Figura 26 se muestra el esquema de la reacción [19].

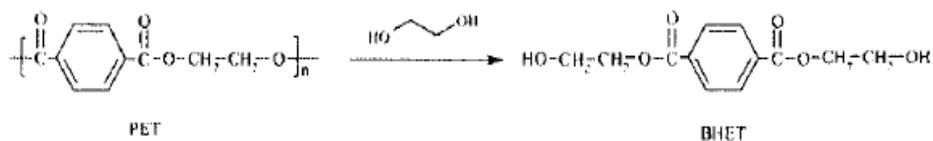


Figura 26: Despolimerización del PET con etilenglicol

### 3.2.1.3 Reciclado mecánico

El reciclado mecánico es un proceso físico donde los residuos plásticos (independientemente de su origen) son recuperados para su posterior reutilización. Se aplican tratamientos de presión y de calor para obtener las formas iniciales u otras distintas. Este proceso de reciclaje se puede repetir varias veces, aunque los plásticos pierden un 5-10% de sus propiedades mecánicas,

siendo necesario utilizar aditivos para recuperarlas[21]. Solo se aplican a termoplásticos (PE, PP, PET, PVC) al ser reciclables por naturaleza, se ablandan con el calor y se endurecen con el frío permitiendo el reciclado mediante procesos de fusión y moldeo. Principalmente hay dos tipos de residuos plásticos que se están tratando con este tipo de reciclaje[21]:

1. Residuos plásticos procedentes de los procesos de fabricación (*scrap*): este tipo de plástico es fácil de reciclar ya que está limpio y es homogéneo en su composición.
2. Residuos plásticos que proceden de los Residuos Sólidos Urbanos (RSU) que pueden presentarse como: residuos plásticos de tipo simple (ya separados y clasificados entre sí los de distintas clases), residuos plásticos mixtos (los diferentes tipos de plásticos están mezclados entre sí) y residuos plásticos mixtos combinados con otros residuos.

Los tipos de procesos pueden cambiar dependiendo de la maquinaria que se esté usando. A continuación, se indican las diversas etapas típicas de una empresa recicladora de plástico [21]:

- Clasificación: se utilizan procesos de separación automática, haciendo uso de bandas transportadoras y dispositivos con sensores térmicos o espectroscopios de infrarrojos. La clasificación se podrá hacer en función de tipo de polímero, su color, su doblado o su transparencia, entre otros.
- Cortado y molido del plástico en pequeños trozos: los materiales plásticos ya clasificados serán sometidos a una reducción de tamaño para facilitar su uso en la etapa de la molienda.
- Molienda: los plásticos cortados se verán sometidos a un proceso de reducción de tamaño en un molino, transformándose en plásticos de 1cm de tamaño.
- Lavado: los residuos que quedan en el plástico molido son retirados (restos orgánicos, tierra, etc.). Se utiliza agua, detergente industrial y sosa cáustica durante esta etapa.
- Secado: los restos de plástico se secan para retirar los restos de humedad. En esta etapa se utilizan un secador rotatorio de aire caliente o el calor del sol.
- Aglomerado: en esta etapa se incrementa la densidad de los residuos plásticos que se están tratando. Se utiliza el calor de fricción de las cuchillas giratorias que hay en la máquina para obtener las temperaturas necesarias para la semiplastificación.

- Pelletizado/extrusión: haciendo uso de un tornillo de extrusión se consigue la fluidización del material plástico gracias al calor obtenido por la fricción del material dentro del tornillo y de las bandas de calor suplementarias a la máquina. En esta etapa también se retiran los contaminantes volátiles y se añaden aditivos para recuperar las propiedades mecánicas.
- Procesos de moldeo: los productos obtenidos en la extrusión se transformarán en productos finales.

### 3.2.2 TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS

A raíz de la creciente generación de residuos plásticos, se han buscado alternativas más eficientes y respetuosas con el medio ambiente que las mencionadas en los apartados anteriores. Se ha descubierto que ciertos microorganismos expresan determinados genes para un tipo de enzimas hidrolíticas capaces de romper los enlaces éster que unen los monómeros del PET. La estrategia más habitual para identificar estos microorganismos es tomando muestras de zonas ricas en desechos plásticos y cultivarlos en zonas con alta presencia del plástico que se desea degradar. El crecimiento de los organismos definirá su capacidad degradativa. En los últimos años las muestras están siendo analizadas dependiendo de su metagenoma (conjunto de genes de los microorganismos de un ecosistema determinado) [22]. A continuación, se muestra una tabla de distintos organismos degradadores de los plásticos [22].:

Tabla 3: Microorganismos degradadores de los plásticos

Microorganismos	Plástico
<i>Ideonella sakaensis</i>	PET

<i>Thermobifida fusca</i>	PET, PHA, PCL, PL
<i>Aspergillus nidulans</i>	PET, PCL, PL, PBS
<i>Pseudomonas sutzeri</i>	PP
<i>Alicyclophilus BQ1</i>	PU
<i>Cochliobolus sp.</i>	PVC
<i>Rhodococcus ruber</i>	PS

Como en este proyecto se han realizado los ensayos en muestras PET, se profundizará en las enzimas capaces de romper los enlaces que conforman este tipo de plástico.

### **3.2.2.1 Descripción de las enzimas hidrolíticas del PET**

Actualmente se han identificado bien 24 diferentes enzimas hidrolíticas del PET (PHE) que pertenecen a lipasas, cutinasas y esterases todas ellas de la clase EC 3.1 que se caracteriza por actuar sobre enlaces éster. Estas enzimas suelen presentar uno o dos puentes de disulfuros (importantes en la integridad y estabilidad de la enzima), mismo dominio catalítico conservado (triada catalítica conformada por una serina, histidina y un residuo cargado negativamente que puede ser un aspartato o glutamato, los cuales funcionan juntos en el sitio activo rompiendo el enlace éster) y un plegamiento típico alfa/beta (estructura tridimensional distintiva de las enzimas) [23].

Cuando se hace reaccionar al PET en presencia de una hidrolasa, los productos que se obtienen son el EG y TPA siendo ambos monómeros que no afectan al medioambiente y adicionalmente se producen también BHET y mono-(2-hidroxietilo) (MHET), que son unos productos de hidrólisis transitorios, que son moléculas intermedias que aparecen durante la ruptura del polímero, pero no son los productos finales, por tanto, con la acción enzimática continua se seguirán hidrolizando [23]. En la imagen siguiente se muestra los productos de degradación del PET [23]:

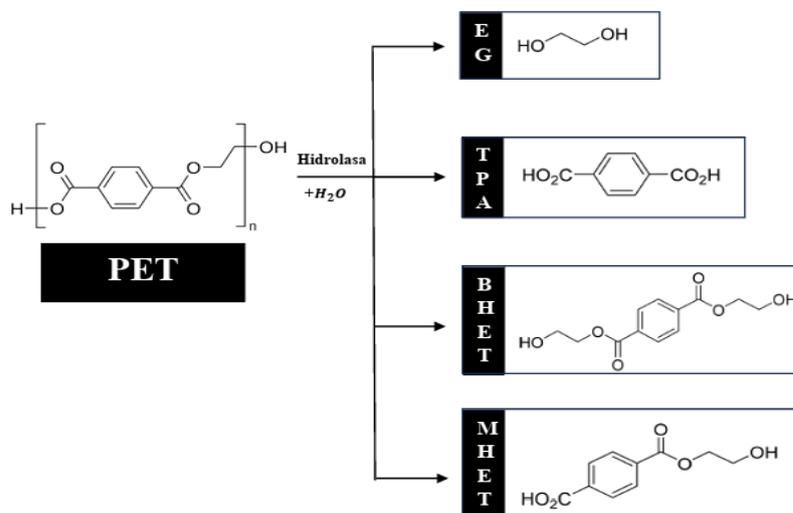


Figura 27: Estructura química del PET y sus productos de degradación

La degradación del PET por las enzimas puede aplicarse en la biorremediación de terrenos contaminados por los plásticos, gracias a la capacidad de las enzimas de hidrolizar PET por su solubilidad en el agua facilitando que los microorganismos presentes en el medio asimilen los monómeros como fuentes de carbono. Este tipo de enzimas presentan las siguientes características comunes: sitio activo estrecho que reconoce macromoléculas aromáticas y afinidad por materiales hidrofóbicos en la región activa [23].

Los principales tipos de enzimas hidrolíticas son:

- **Lipasas:** las enzimas lipasas (EC 3.1.1.3) catalizan la hidrólisis de enlaces éster, aunque su actividad es baja por la presencia de una cadena de polipéptidos (cadenas de aminoácidos unidos entre sí) en el sitio activo manteniéndolo protegido e inactivo. Para la activación de la enzima es necesario la presencia de una interfaz insoluble y una fase acuosa para que haya una activación interfacial. Actualmente están siendo investigadas y la información sobre su potencial para degradar poliésteres es muy poca.
- **Cutinasas:** las enzimas de tipo cutinasa (EC 3.1.1.74) son producidas por microorganismos saprófitos (aquellos que se alimentan de materia orgánica en descomposición). Presentan una triada catalítica Ser-Hisp-Asp y un puente de disulfuro que estabiliza la estructura. Estas enzimas catalizan la ruptura de los enlaces éster de la

cutina para ser usados como fuente de carbono, además de poder hidrolizar una gran variedad de poliésteres sintéticos (en los que se encuentra el PET) puesto que el centro activo de la enzima puede acomodar compuestos de alto peso molecular. Este tipo de enzimas presentan una alta eficiencia en condiciones de reacción suaves para producir TPA a partir de la degradación del PET.

- **Carboxil esterasas:** las enzimas carboxil esterasas (EC 3.1.1.1) son un subtipo de clase de enzima de las esterasas con una triada catalítica Ser-His-Glu. Estas enzimas tienen una amplia especificidad del sustrato por su sitio activo abierto y por su bolsillo de unión distintivo que permite la unión con un amplio rango de sustratos. Estas enzimas se caracterizan por hidrolizar acil gliceroles de cadena corta y solubles en el agua.
- **PETasa y MHETasa:** Las enzimas PETasa (EC 3.1.1.101) y la MHETasa (EC 3.1.1.102) son enzimas producidas por *Ideonella sakaiensis* las cuales trabajan en conjunto para degradar al PET. La PETasa muestra una gran actividad para hidrolizar el sustrato a temperatura ambiente debido al sitio de unión elongado que presenta, el cual se divide en dos subsitios. En el primero, los enlaces éster son rotos en el sitio de escisión y en el segundo se proporciona un espacio para que se den interacciones hidrofóbicas permitiendo que el polímero se adhiera mejor a la enzima; además existe la presencia de dos puentes de disulfuro que otorgan estabilidad térmica a la enzima. La PETasa hidrolizará el PET obteniendo como productos principales MHET y TPA. La segunda etapa de la degradación del PET por estas enzimas consiste en la acción de la MHETasa en la conversión del MHET produciendo los productos TPA Y EG obteniendo de esta forma las materias primas de los plásticos [23][24]

### ***3.2.2.2 Economía Circular***

El uso de las enzimas hidrolíticas entronca con el modelo sostenible de la economía circular para el PET. Se ha demostrado que tener un biorreactor enzimático compuesto por hidrolasas de PET y carboxil esterasas propicia el reciclaje por este método enzimático. Estas enzimas pueden hidrolizar la parte amorfa del PET en sus monómeros TPA y EG, los cuales pueden ser recuperados mediante precipitación y destilación para ser utilizados nuevamente en la síntesis

del PET. La desventaja de estos procesos es el alto nivel de energía que se requiere siendo poco viables. [23]

Actualmente en el ámbito industrial, las empresas Carbios y Novozymes están impulsando el despliegue a gran escala de la tecnología enzimática sobre el PET. Están promoviendo la construcción de una planta de reciclaje en la región de Longlaville, Francia. La apertura de esta planta se espera en el año 2025, cuya capacidad de procesamiento será de 50.000 toneladas de residuos al año, siendo la primera planta en el mundo que integre la tecnología para realizar el reciclado biológico del PET[25].

### 3.3 ENZIMAS, ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y NOMENCLATURA

#### 3.3.1 ENZIMAS

Día a día, en los seres vivos tienen lugar una gran variedad de reacciones bioquímicas (reacciones metabólicas), que necesitan de la presencia de enzimas para desarrollarse a una velocidad adecuada. Las enzimas se podrían definir como un conjunto variado y especializado de proteínas, que catalizarán dichas reacciones mejorando su velocidad su velocidad catalítica. [26].

Las enzimas presentan las siguientes propiedades que las convierten en buenos catalizadores[27]:

- Son eficientes: muchas reacciones enzimáticas ocurren alrededor de  $10^8$  a  $10^{10}$  más rápido que las reacciones sin catalizar.
- Son específicas respecto a la reacción catalítica como al sustrato.
- Catalizan un amplio rango de reacciones: como se verá a continuación, en los tipos de enzimas, estas pueden catalizar reacciones redox, hidrólisis, polimerización, transferencia de grupos...
- La célula regula a la enzima: las enzimas están sujetas a un control genético que controla la cantidad de enzimas que se producen según las necesidades que se presenten. La actividad de la enzima también está regulada por la célula.

Cada enzima tiene una región denominada centro o sitio activo, que es una entidad tridimensional donde se cumple la especificidad y la acción catalizadora de la proteína y donde se situarán las moléculas que serán modificadas (sustrato). Las interacciones entre el sitio activo y el sustrato se deben a enlaces de naturaleza débil por lo tanto a mayor número de enlaces, mayor será la capacidad de discriminar entre dos sustratos similares.

Dentro del centro activo y para facilitar la actividad catalítica se pueden incluir también coenzimas (moléculas orgánicas derivadas de vitaminas tales  $NAD^+$ ,  $NADH^+$  ...) y cofactores (moléculas inorgánicas tales como iones metálicos  $Na^+$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , ...).

### 3.3.2 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Las reacciones, independientemente de si son catalizadas o no, siguen las leyes de la termodinámica, en especial el parámetro de la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) (también denominado entalpía libre), es un potencial termodinámico que da las condiciones de equilibrio y de espontaneidad para una reacción química. Para que ocurra la transformación de una molécula de un sustrato a una molécula de un producto el cambio de energía libre de Gibbs será negativo, por tanto, se dará una reacción espontánea.[26]

En las reacciones químicas, para la necesaria conversión del sustrato en producto es necesaria una situación energética intermedia entre la situación de partida (reactivos) y la final (productos), denominada estado de transición. El estado de transición se define como el estado activado en el que una parte de la población de moléculas de los reactivos poseen la energía suficiente para que haya una probabilidad de que se rompan o se establezcan enlaces para la formación de los productos.[26]

La diferencia entre la energía del estado de transición y el nivel de energía inicial, denominada energía de activación es la energía necesaria para llevar las moléculas de un mol de sustancia en una temperatura dada.[26]

Para que tenga lugar una reacción enzimática se deben cumplir las siguientes condiciones [28]:

1. Que los sustratos colisionen.
2. Que la colisión tenga la orientación indicada.
3. Que los sustratos tengan la energía suficiente para que ocurra la reacción.

El esquema de una reacción enzimática es el siguiente:



- E= enzima
- S= sustrato
- P= producto

A continuación, se muestra una gráfica de la energía de activación necesaria para la transformación de un sustrato a un producto en reacciones con o sin enzima [29]:

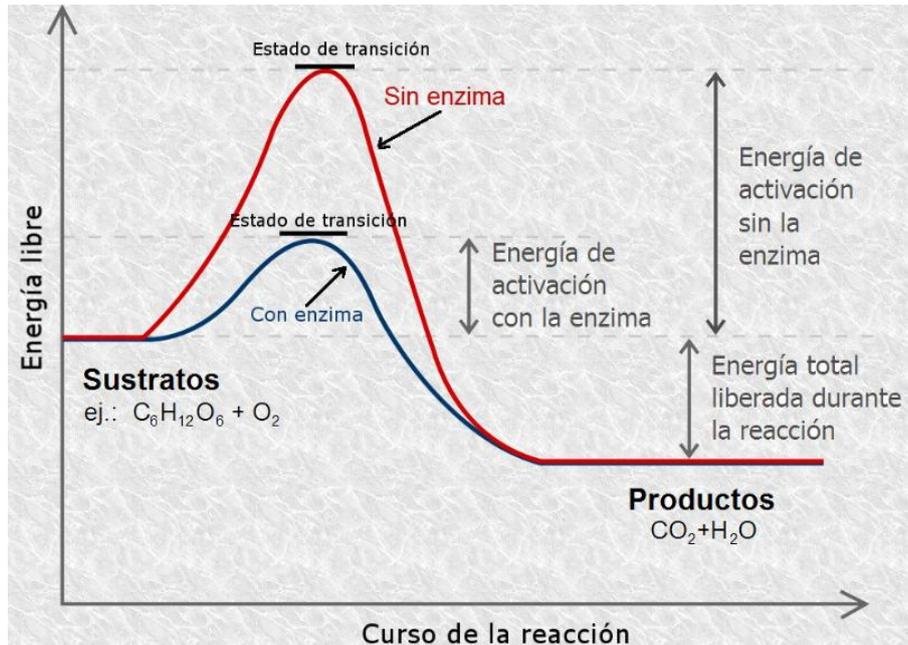


Figura 28: Gráfica de energía libre para reacciones con o sin enzima

Como indicación final, la presencia de la enzima solo modifica la velocidad de reacción del proceso, pero no el equilibrio de esta, la cual sigue las leyes de la termodinámica.

Actualmente hay varios modelos propuestos para explicar la acción enzimática. Los principales modelos son:

- Modelo de la llave-cerradura (Fischer, 1894): este modelo indica que la forma del centro activo y del sustrato son complementarias, con el ejemplo de una llave encajando en una cerradura. Este modelo presenta las desventajas de que no siempre es correcto (aunque es válido para muchos casos) ya que no explica cómo las enzimas pueden adaptarse a los sustratos ligeramente diferentes cambiando su forma ni cómo se produce la reacción de forma eficiente. [30] A continuación se muestra en la siguiente figura el modelo de Fischer llave-cerradura [31]:

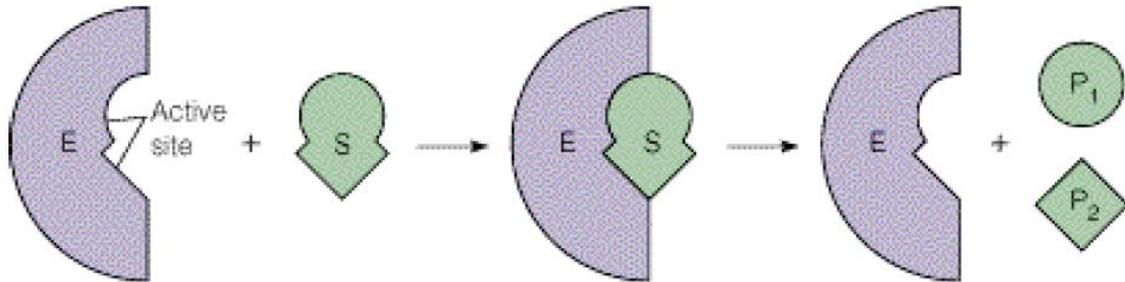


Figura 29: Modelo de Fischer llave-cerradura donde se representa la enzima (E), el sustrato (S) y los productos de la reacción formados (P1 y P2)

- Modelo del ajuste inducido (Koshland, 1958): el sitio activo adopta la forma ideal cuando está en presencia del sustrato. Se produce un cambio conformacional con la unión del sustrato y el centro activo permitiendo la formación de interacciones adicionales entre la enzima y el estado de transición, dando lugar al producto. También es conocido como el modelo del encaje inducido. [30] Se muestra en la siguiente imagen el modelo de Koshland del ajuste inducido [31]:

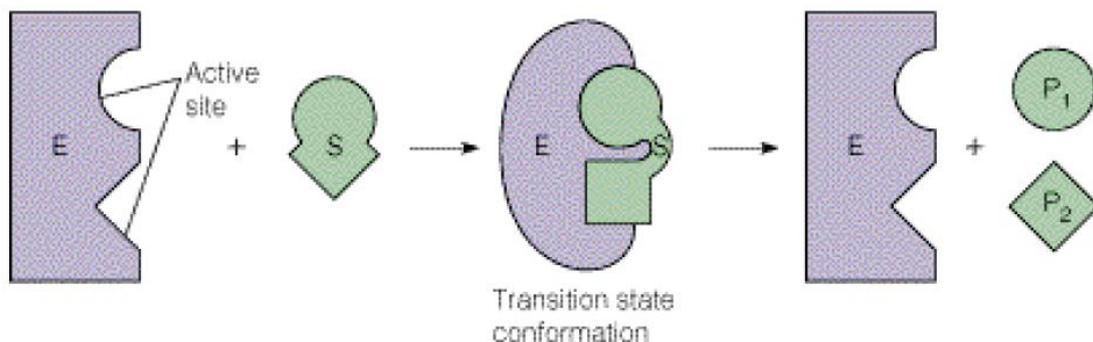


Figura 30: Modelo de Koshland del ajuste inducido donde se representa la enzima (E), el sustrato (S) y los productos de la reacción formados (P1 y P2)

### 3.3.3 NOMENCLATURA ENZIMÁTICA

La nomenclatura sistemática para nombrar a las enzimas se basa en la propuesta de los bioquímicos Malcom Dixon y Edwin Webb, quienes asentaron las bases de la catalogación

realizada por la Enzyme Commission de la International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB). Sigue tres principios generales [28]:

- Nombres de la enzima finalizados con el sufijo -asa y referidos a la actividad enzimática.
- Clasificación según la reacción que catalizan.
- La acción enzimática, sustrato y cosustrato son la base en la que se clasificarán las enzimas usando para su definición 4 números. Se seguirá la siguiente nomenclatura EC (Enzyme Commission) X.X.X.X.

A continuación, se analiza cada uno de los puntos que conforman la nomenclatura (EC X.X.X.X):

- El primer número de los 4 dígitos se refiere a la acción de la enzima:
  - Oxido-reductasas: catalizan reacciones de oxidorreducción. En este tipo de reacciones las enzimas catalizan la transferencia de electrones desde una molécula que dona (agente reductor) a otra aceptora (agente oxidante), la cual suele ser principalmente el oxígeno. Las subclases principales son: deshidrogenasa, reductasa y oxidasa.
  - Transferasas: con la ruptura de moléculas se transfieren grupos químicos de una molécula a otra. Catalizan la transferencia de grupos metilo, aldehído o glucosilo.
  - Hidrolasas: catalizan mediante hidrólisis la ruptura de enlaces C-O, C-N, C-C, C-S.
  - Liasas: catalizan reacciones no hidrolíticas con ruptura de enlaces C-O, C-N, C-C, C-S, ... dando lugar a dobles enlaces, anillos o reacciones inversas.
  - Isomerasas: catalizan cambios estructurales o geométricos dentro de una misma molécula. Convierten un isómero en otro.
  - Ligasas: catalizan la formación de uniones entre dos moléculas tipo C-C haciendo uso de energía que obtienen de la hidrólisis del ATP (adenosín trifosfato). Este tipo de enzimas también son denominadas sintetetas.
  - Translocasas: en 2018 se añadió la séptima clasificación para las enzimas que catalizan el movimiento de iones o moléculas a través de membranas o su separación

dentro de ellas. Algunas de ellas incluyen la reacción de la hidrólisis del ATP, pero no es su función primaria. [32]

- El segundo número indica la subclase. Ej: 1.1 (Actuando sobre el grupo CH-OH de donantes)
- El tercer número indica el sustrato o cosustrato.
- El cuarto número indica el número de serie de la enzima dentro de cada subclase.

Se muestra a continuación una tabla resumen con la clasificación de las clases de enzima con ejemplos [33].

Tabla 4: Tabla de clasificación de enzimas con ejemplos

	Nombre	Reacción Catalizada
Clase i	Oxidoreductasas	$AH_2 + B = A + BH_2$
Clase ii	Transferasas	$AX + B = BX + A$
Clase iii	Hidrolasas	$A-B + H_2O = AH + BOH$
Clase iv	Liasas	$A = B + X - Y = A-B$ <div style="text-align: center;"> <math>\begin{array}{c}   \quad   \\ X \quad Y \end{array}</math> </div>
Clase v	Isomerasas	$A = B$
Clase vi	Ligasas	$A + B + NTP = A-B + NDP + P$ (or $NMP + PP$ )
Clase vii	Translocasas	$AX + B \rightleftharpoons A + X + \rightleftharpoons B$

Se aporta a continuación el enlace web a la base de datos EXPASY elaborada según las recomendaciones de nomenclatura del IUBMB, donde se puede encontrar toda la información relacionada con la nomenclatura de las enzimas, describiendo cada tipo de enzima caracterizada[34].

### 3.4 CINÉTICA DE LAS REACCIONES ENZIMÁTICAS

La cinética enzimática es la ciencia que estudia la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas y los factores que le afectan. La aplicación principal de esta disciplina es predecir la velocidad de actuación de las enzimas. La velocidad de catálisis se puede determinar mediante el seguimiento de cualquiera de las especies implicadas en la reacción, ya sean sustratos o productos de esta. En este proyecto se ha optado por el estudio de la velocidad a la que desaparece el sustrato.

La actividad catalítica de las enzimas se mide en condiciones estándares, con concentración saturante y temperatura de 37 °C. En la actualidad se usa la Unidad (U, cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μM de sustrato por minuto) y el katal (kat, cantidad de enzima que cataliza 1 mol de sustrato por segundo), aunque se suele usar la U, al ser kat una unidad de mayor orden de magnitud.

El principal modelo para el estudio de las reacciones enzimáticas es el Modelo de Michaelis-Menten, que recibe este nombre por los científicos Leonor Michaelis y Maud Menten quienes, en el año 1913, diseñaron el modelo de la acción enzimática que explica el comportamiento hiperbólico de la velocidad con respecto a la concentración del sustrato.

#### 3.4.1 MODELO MICHAELIS-MENTEN

El mecanismo Michaelis-Menten sigue el siguiente esquema:



La expresión habitual de la ecuación Michaelis-Menten es la siguiente:

$$v = \frac{v_{max} * [S]}{K_m + [S]} \quad (7)$$

$K_m$  = Constante de Michaelis. Representa la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción enzimática es la mitad de la  $v_{max}$ . Es una constante que está en función del pH, temperatura e indica afinidad de la enzima por el sustrato.

- Si  $K_m$  aumenta,  $[ES]$  disminuye y la enzima presenta poca afinidad.
- Si  $K_m$  disminuye el complejo es muy estable,  $[ES]$  aumenta y la enzima presenta una gran afinidad.

$v_{max}$  = Velocidad máxima. Representa el número de moléculas de sustrato que pueden convertirse en producto por unidad de tiempo y por sitio activo de la enzima. Depende de la  $[E]$  inicial.

$S$  = Concentración del sustrato.

A continuación, se muestra una gráfica con la velocidad de reacción-concentración de sustrato, según los parámetros de la cinética enzimática [26]:

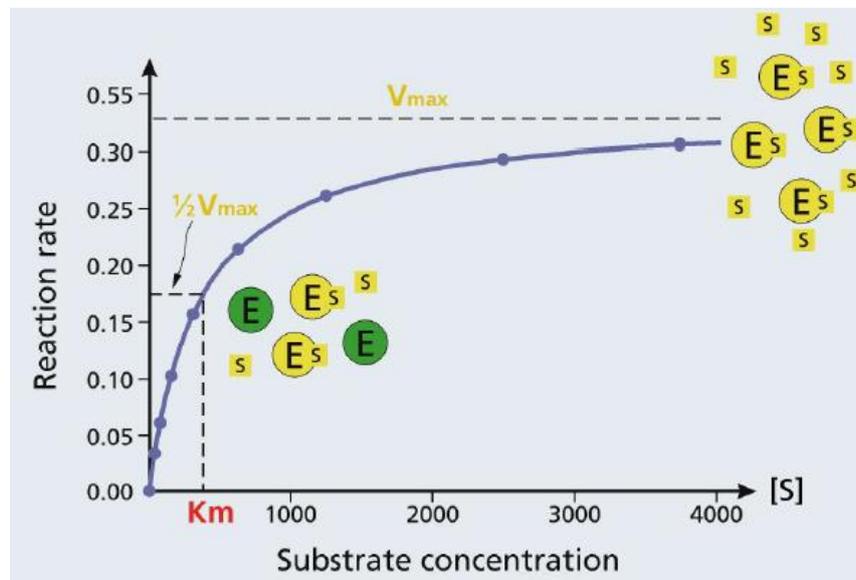


Figura 31: Gráfica velocidad de reacción-concentración de sustrato

Al existir una concentración de sustrato saturante, la reacción alcanza rápidamente un estado estacionario donde el complejo sustrato-enzima  $[ES]$  se mantiene constante.

Para estimar los valores de  $K_m$  y  $v_{max}$  se pueden emplear los ajustes de mínimos cuadrados basados en las linealizaciones (se transforma la ecuación mediante el reordenamiento de sus términos para la representación de una gráfica lineal) de la ecuación de Michaelis-Menten.

En este trabajo se ha empleado la linealización por el método Lineweaver-Burk de la ecuación de Michaelis-Menten, para ello aplicará la fórmula de las dobles inversas:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{max}} + \frac{[S]}{v_{max}} \quad (8)$$

### **3.4.2 FACTORES EXTERNOS QUE INFLUYEN EN LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LAS ENZIMAS**

Los principales factores externos que influyen en la actividad, es el efecto pH y el efecto de la temperatura.

En relación con el pH, tanto el pH óptimo como el intervalo de funcionamiento es diferente para cada enzima: Cuando el pH del medio cambia se produce una alteración en el estado de ionización de los grupos del centro activo. Las enzimas pueden tener dos tipos de curvas pH [35]:

- Curva de la actividad enzimática en máximo, necesitan un control más riguroso de pH del medio en el que actuará la enzima. Cualquier cambio en el pH influye rápidamente en un decrecimiento de la actividad enzimática.
- Curva de la actividad enzimática donde la enzima mantiene su actividad por encima del 75% alrededor del pH óptimo.

A continuación, se presenta una imagen de un posible ejemplo de una curva pH [35]:

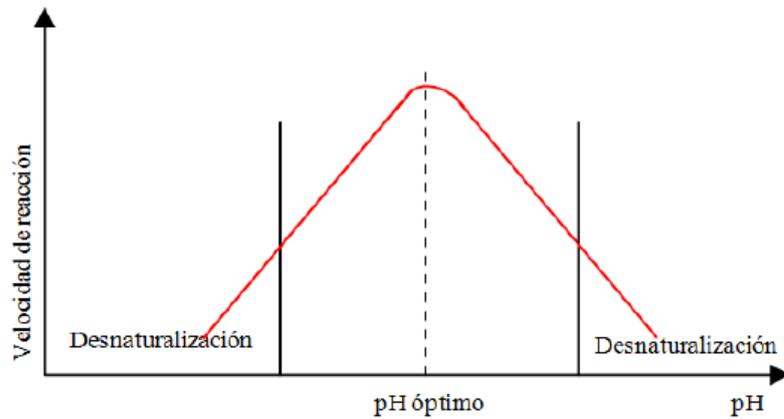
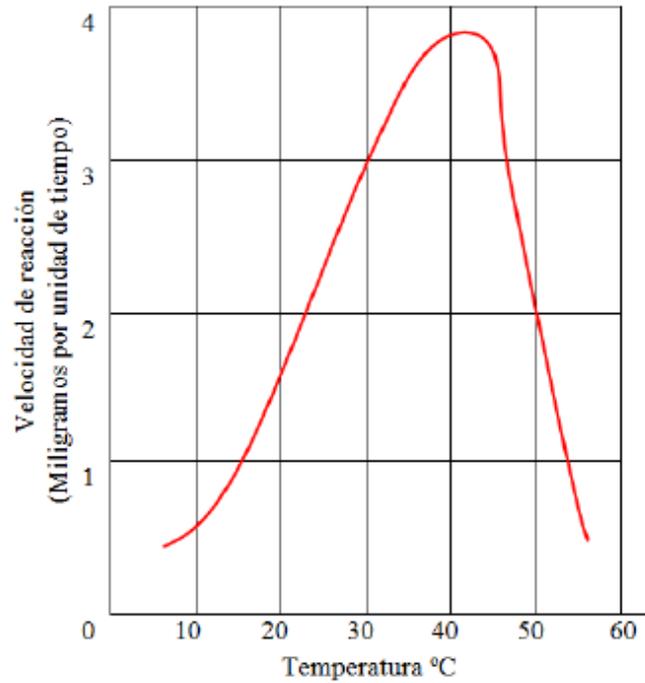


Figura 32: Ejemplo del efecto del pH en la velocidad de reacción

Con respecto a la temperatura, cada enzima tiene una temperatura óptima de funcionamiento y un aumento o disminución de la temperatura causa la ralentización de la actividad enzimática. A temperaturas altas hay más moléculas del sustrato que adquieren suficiente energía para reaccionar, aunque la disminución de la velocidad se produce por la desnaturalización de la enzima a altas temperaturas (la mayoría de las enzimas serían a partir de 60-70 °C).

La curva de temperatura suele ser proporcionada por los fabricantes. En la Figura 33 se muestra un ejemplo de una posible curva de temperatura [35]:



*Figura 33: Ejemplo del efecto de la temperatura en la velocidad de reacción*

## Capítulo 4. DEFINICIÓN DEL TRABAJO

### 4.1 JUSTIFICACIÓN

La presencia de los MP en el medioambiente presenta una tendencia creciente. Esto se debe no solo al aumento de la demanda del plástico por sus excelentes propiedades y a la acumulación de residuos plásticos, sino también a que los actuales métodos de reciclaje de dichos residuos son bastante ineficientes o dan lugar a la generación de subproductos altamente contaminantes. Tal y como se ha indicado en el Capítulo 3, los métodos de eliminación/gestión de los residuos, como los vertederos o la valorización energética, tienen un impacto ambiental muy significativo.

Debido a ello, se ha despertado un gran interés por el nuevo método de biodegradación. Este busca la degradación enzimática del PET, ofreciendo una nueva alternativa ecológica con gran potencial de degradación que aún se encuentra en etapas tempranas de desarrollo, aunque las perspectivas futuras de este método son bastante alentadoras. Actualmente se están realizando estudios e investigando diversas enzimas tales como las producidas por la *Ideonella sakaiensis* como la PETasa y MHETasa que no están siendo comercializadas, limitando en gran medida el avance de investigación. Por tanto, este proyecto permitirá mostrar un análisis de este nuevo proceso enzimático, haciendo uso de enzimas comercializadas fácilmente accesibles.

Es esperable que este proyecto sea el punto de partida para futuras investigaciones para las enzimas comerciales que se hayan investigado a lo largo de este trabajo, además de que se mostrará el proceso de preparación de los distintos ensayos y se realizará la definición de los parámetros necesarios para obtención de resultados analíticos, pudiendo asentar las bases para la investigación de más enzimas comercializadas.

## **4.2 OBJETIVOS DEL PROYECTO**

En este TFM se han establecido los siguientes objetivos:

1. Investigar algunas enzimas comerciales que puedan servir para la degradación de los MP. Para ello se hará un estudio de las propiedades de dichas enzimas además de validar en el laboratorio su eficacia para romper los enlaces. Paralelamente, se hará un estudio de las bases de datos de dichas enzimas, así como las páginas comerciales donde poder obtenerlas.

2. Llevar a cabo los estudios pertinentes para contrastar algunas de las enzimas hidrolasas que actualmente están comercializándose, viendo su eficiencia en la destrucción de los enlaces químicos que conforman los MP haciendo uso del modelo cinético-enzimático de Michaelis-Menten. Se compararán el desempeño de las enzimas en la degradación de MP, además de indicar conclusiones para futuras investigaciones en el uso enzimático de la degradación de MP.

3. Describir técnicamente el uso necesario de máquinas, técnicas y herramientas de laboratorio que permitan conservar en buenas condiciones a las enzimas hidrolasas, aplicar dichas enzimas a las muestras de agua y ver su eficiencia, así como la creación de los medios en los que se realizarán los ensayos. También se aprenderá a usar los distintos *softwares* que permitirán evaluar los resultados de la aplicación de diferentes técnicas instrumentales dirigidas a analizar la destrucción de los MP.

4. Realizar el análisis y estimación desde el punto de vista económico a escala de laboratorio, del uso y tratamiento de las enzimas comercializadas en los procesos de eliminación de los microcontaminantes en cada una de las distintas muestras de agua que se hayan tomado. Se tendrá en cuenta en esta estimación, el precio de los distintos elementos, herramientas y tecnologías que forman parte de los procesos de degradación enzimática en el laboratorio.

### 4.3 OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE

En el año 2015 las Naciones Unidas establecieron un acuerdo con 17 objetivos de desarrollo sostenible (ODS, mostrados en la Figura 35), con el propósito de establecer pautas para la sociedad para erradicar la pobreza, proteger el planeta y promover la paz y la prosperidad en toda la población antes del año 2030. Este trabajo Fin de Máster trata de abordar varios de estos objetivos, los cuales se comentarán a continuación.[36].



*Figura 34: Objetivos de Desarrollo Sostenible*

#### 4.3.1 ODS 3- SALUD Y BIENESTAR

Tal y como se comentó en los capítulos anteriores, la demanda del plástico está generando que los residuos plásticos estén aumentando, propiciando que actualmente haya una alta concentración de estos microcontaminantes en los ecosistemas marinos y, debido a las relaciones tróficas, también en los ecosistemas terrestres. Las personas están experimentando un incremento de concentraciones de estos contaminantes mediante la ingesta de alimentos contaminados favoreciendo la aparición de enfermedades tales como cáncer, o daños al sistema reproductivo y digestivo, entre otros[37]. Con este trabajo se espera poder analizar la eficacia de nuevos métodos para la reducción de los MP, así como abrir nuevas líneas de investigación de tratamiento de MP con enzimas comercializadas y asentar las bases de futuros trabajos.

### **4.3.2 ODS 6-AGUA LIMPIA Y SANEAMIENTO**

Observando la efectividad de las distintas enzimas en los ensayos preparados y realizados en el laboratorio para romper los enlaces del plástico, se podrá facilitar la reducción de este tipo de contaminantes tanto en las masas de agua continentales como marinas. De esta forma, se podrá ver con qué proceso enzimático se puede facilitar la correcta eliminación de los MP en las estaciones de tratamiento de agua potable (ETAP), en las estaciones depuradoras de agua residual (EDAR) y en las desalinizadoras, adecuando la reducción del contaminante en las aguas para consumo humano, así como las aguas regeneradas y depuradas.

### **4.3.3 ODS 9-INDUSTRIA, INNOVACIÓN E INFRAESTRUCTURAS**

La realización de este TFM apoya la investigación futura de un método eficiente para eliminar microcontaminantes de las aguas residuales en la industria (ARI) o en las aguas que pasan en las estaciones de depuración de aguas residuales (EDAR) con aguas residuales urbanas (ARU) antes de su vuelta a los cauces hídricos. Así se permitirá implementar oficialmente el proceso que se aplica para la eliminación de los MP a los procesos de limpieza de vertidos industriales. Asimismo, la presencia de estos contaminantes podría permitir su futura exigencia de eliminación como normativa en los valores límite emitidos. Actualmente, esta eliminación de MP no es exigida por los documentos de referencia de mejores técnicas disponibles (BREF) para la eliminación de contaminantes en los vertidos de cada actividad industrial[38].

### **4.3.4 ODS 13-ACCIÓN POR EL CLIMA**

Debido a las excelentes propiedades de los plásticos tales como peso ligero, resistencia al calor, etc., estos materiales están siendo usados en un amplio rango de productos, haciendo que para el año 2050 se espere que sean emitidos a la atmósfera (mediante su producción e incineración de residuos) 2,8 gigatoneladas de  $CO_2$  anuales. Esta cantidad de emisiones sería aproximadamente la misma que la emitida por 615 plantas de carbón de 500MW [4]. Con este proyecto se espera que se ayude a reducir las emisiones de  $CO_2$  por la quema de residuos plásticos y se propone una nueva forma de tratamiento donde su destrucción se realiza mediante métodos respetuosos con el medioambiente.

#### **4.3.5 ODS 14-VIDA SUBMARINA**

Los MP en ambientes acuáticos se pueden encontrar en diversos entornos, acumulándose principalmente en las áreas costeras[5]. Actualmente se estima la presencia de 51.000 millones de partículas contaminantes de plástico en el mar [4]. Esta alta presencia está afectando a la vida marina, favoreciendo los efectos contaminantes de bioacumulación y biomagnificación a lo largo de la cadena trófica. Este proyecto permitirá ver un método de degradación de los plásticos a sustancias no contaminantes, reduciendo de esta forma su presencia en el medio acuoso.

#### **4.3.6 ODS 15-VIDA DE ECOSISTEMAS TERRESTRES**

Este objetivo está directamente relacionado con el ODS 6 y el ODS 14. La investigación de la degradación de los MP en este proyecto facilitará una reducción del efecto contaminante de la bioacumulación y biomagnificación mencionados previamente. Esto es debido a que la degradación del PET hará descender el nivel de contaminación en los primeros círculos de la cadena alimentaria favoreciendo una reacción en cadena que afectará a toda la cadena trófica, minimizando el impacto en los ecosistemas terrestres.

## Capítulo 5. SISTEMA/MODELO DESARROLLADO

### 5.1 RESUMEN DE LA METODOLOGÍA DEL PROYECTO

Para la realización de este proyecto se utiliza el método experimental deductivo en 3 fases principales. La 1ª fase es de investigación mientras que la 2ª y la 3ª son fases experimentales:

- Fase de investigación y selección de enzimas: se hará un estudio bibliográfico para comprender el funcionamiento y qué tipos de enzimas pueden servir para el objetivo de este proyecto. En esta fase se hará uso principalmente de artículos y publicaciones científicas y bases de datos como Uniprot.org [39] o Expasy.org [34] para estudiar las características de dichas enzimas, centrándose sobre todo en las enzimas comerciales disponibles. De esta manera, combinando la información disponible en bibliografía y las correspondientes bases de datos, se estudiarán las características de diferentes enzimas candidatas, así como sus condiciones de operación óptimas en cuanto a pH y temperatura.
- Fase de definición de actividad enzimática: seleccionadas las enzimas, se analizan los parámetros de la cinética de la reacción enzimática, haciendo uso del modelo Michaelis-Menten y de la Ley de Lambert-Beer explicados en el capítulo 2 apartado 2.2.2 “Técnicas Espectrofotométricas” y en el capítulo 3 apartado 3.4 “Cinética de las Reacciones Enzimáticas”. Para ello se utiliza un sustrato de referencia, el paranitrofenol butirato, con el que se prepara un patrón; y haciendo uso del espectrofotómetro Spectroquant PROVE 100, se analiza la disminución de la concentración de dicho sustrato a través de las absorbancias medidas en unos tiempos dados y a las temperaturas óptimas de las enzimas para los distintos ensayos definidos. Para mantener y controlar la temperatura se hace uso de la Incubadora Orbital SKI 4, que además facilita la mezcla sustrato-enzima. En estos ensayos se usan las disoluciones buffer disolución salina tamponada (PBS) y Tris(hidroximetil)-aminometano con ácido clorhídrico (Tris-HCl) fijando el mismo valor de pH para su posterior comparación.

- Fase de desarrollo de ensayos de MP: finalizada la obtención de los parámetros de la actividad enzimática, se elegirá cuál es el medio adecuado para realizar los ensayos con el PET y las temperaturas óptimas de las enzimas. Se analizan los reservorios sintéticos de agua y de medio Tris-HCl (al comprobarse analíticamente tras la fase 2 que este medio es el más idóneo para los ensayos, capítulo 7, apartados 7.2 “Actividad Enzimática Lipasa Calc B” y 7.3 “Actividad Enzimática Cutinasa 2P”), que se han preparado previamente en el laboratorio para tener conocimiento de la concentración de partículas, fijando los valores de alta concentración y baja concentración de MP. Se realizan los ensayos haciendo tanto los controles negativos para obtener una referencia base, como los ensayos con las enzimas a sus temperaturas óptimas. Al igual que en la fase 2, se utiliza en los ensayos la Incubadora Orbital SKI 4. Para el análisis de las muestras se utiliza el Microscopio DSX1000 y el Microscopio FTIR para analizar el tamaño, la morfología y la composición de las partículas encontradas.

Una vez realizados los ensayos, se recopilan y se analizan los resultados comprobando si verdaderamente hay una clara reducción de presencia de los MP.

En los siguientes apartados se profundiza en el diseño y la realización de las 3 fases principales indicadas previamente.

## **5.2 SELECCIÓN DE ENZIMAS Y DEL SUSTRATO MODELO**

En este apartado se profundiza en el diseño de las condiciones de ensayo para la evaluación de las hidrólisis de PET, así como el sustrato de referencia necesario para evaluar la actividad enzimática en ausencia de PET.

### **5.2.1 SELECCIÓN DE ENZIMAS**

Como se resumió en el Capítulo 3 3.2.2 “Tratamientos Biológicos”, el código asociado, según la IUBMB, a las enzimas hidrolasas capaces de romper los enlaces esteres se encuentran dentro de la clase EC 3.1 de la clasificación enzimática. Para este proyecto se ha trabajado con dos tipos de enzimas (lipasas y cutinasas) que pueden cumplir con el objetivo de reducir la cantidad de MP de PET en el ambiente. El estudio se centra en la optimización de las temperaturas de operación, así como el pH que deberán tener las disoluciones buffer para maximizar la actividad de la enzima.

#### **5.2.1.1 Lipasa B**

Del conjunto de enzimas que conforman las lipasas (EC 3.1.1.3), la lipasa B, procedente de la *Candida antartica*, se está utilizando para catalizar diversas reacciones como: hidrólisis, esterificación, amonólisis y la formación de enlaces C-C. Esto se debe a las excelentes propiedades catalíticas tales como una alta selectividad, estabilidad tanto frente a disolventes orgánicos como a ante amplios intervalos de temperatura y enantioselectividad (preferencia de una reacción química para formar un enantiómero sobre su imagen especular). Actualmente se está utilizando esta enzima en las industrias farmacéuticas, químicas, alimentación y producción de energía [40] [41].

A continuación, se indican en dos gráficas la dependencia de la actividad enzimática de la temperatura y el pH [41]:

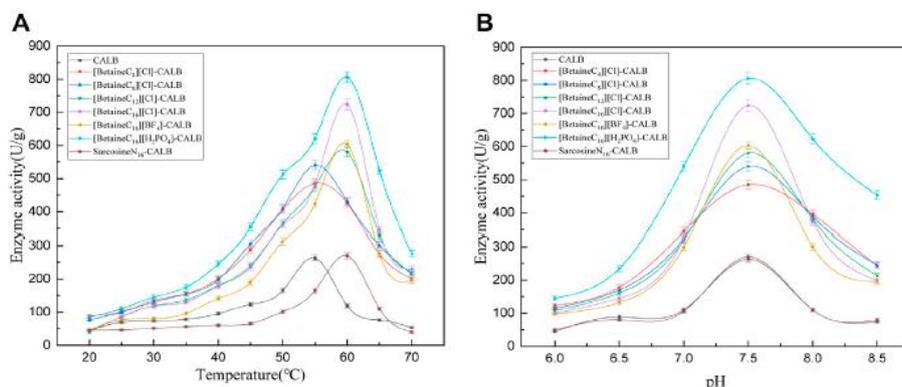


Figura 35: Actividad enzimática de la Calc B dependiendo de la temperatura (A) y el pH (B)

### 5.2.1.2 Cutinasa 2P

La cutinasa 2P (EC 3.1.1.74) procede del organismo hongo *Arxula adenivorans* el cual está siendo ampliamente utilizado para biotecnología industrial. Esta enzima también denominada ACUT2 [42], presenta actividad enzimática sobre cutinas naturales, poliésteres sintéticos biodegradables y sustratos modelo como el paranitrofenol butirato. El rango de actividad enzimática para esta enzima es bastante elevado, teniendo rangos de funcionamientos del pH desde 3,5 a 8 y rangos de temperatura de 5 a 60 °C. [42]

A continuación, se muestran en las Figuras 36 y 37 la influencia de la temperatura y el pH, respectivamente, sobre la actividad de esta enzima[43].

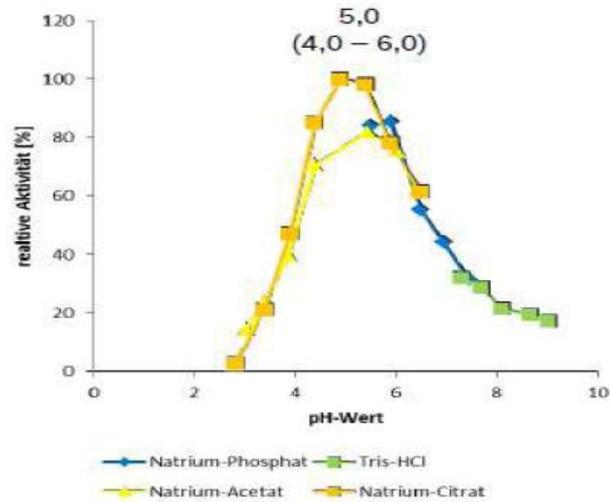


Figura 36: Actividad enzimática de la cutinasa 2P dependiendo del pH y del medio.

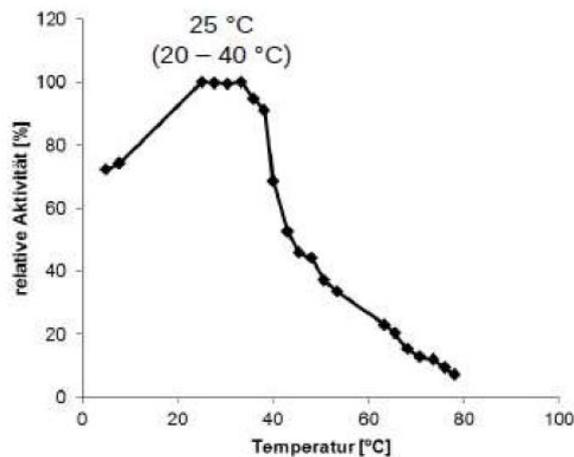


Figura 37: Actividad enzimática de la cutinasa 2P dependiendo de la temperatura.

## 5.2.2 SELECCIÓN DE SUSTRATO DE REFERENCIA

Una vez seleccionadas y estudiadas las enzimas, es necesario definir su actividad catalítica. Para ello se hace uso de sustratos de referencia como los paranitrofenoles (pNP), los cuales pueden clasificarse de diversas formas tales como: paranitrofenol butirato, paranitrofenol propionato, paranitrofenol palmirato, etc. Hay estudios que muestran cómo la absorbancia del

paranitrofenol depende del pH y la temperatura [44]. A niveles bajos de pH, el pNP absorbe principalmente a 317 nm debido a un aumento de su forma protonada, y a niveles de pH 10 (formas más aniónicas) o de temperaturas elevadas absorbe a 410 nm. [44] A continuación, se muestra una reacción de hidrólisis del pNP ester [44]:

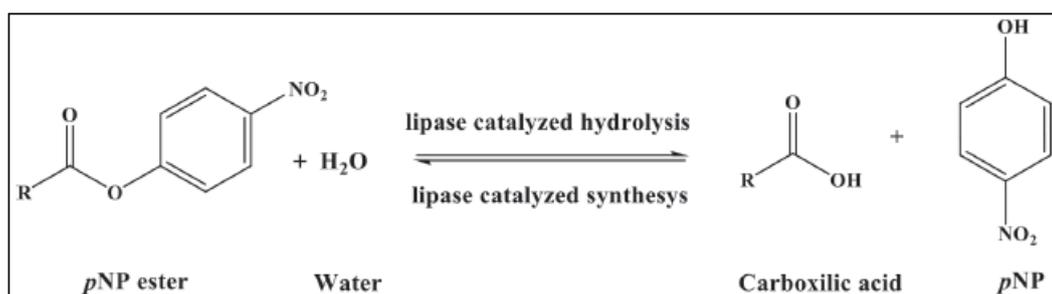


Figura 38: Hidrólisis del compuesto pNP ester para formar pNP

En este proyecto se ha optado por estudiar la disminución del sustrato paranitrofenol butirato (pNPB) en vez de estudiar la formación de producto pNP haciendo que sea necesario estudiar a qué longitud de onda se muestra la absorbancia máxima. Este análisis se desarrolla en el Capítulo 5, apartado 5.3.1 “Calibración del Espectrofotómetro Spectroquant”. Ambos métodos de estudio son igualmente válidos y permiten caracterizar la cinética enzimática.

### **5.3 DISEÑO DE LOS ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA**

#### **5.3.1 OBTENCIÓN DEL ESPECTRO DEL PNP-BUTIRATO**

En este apartado se define con qué longitud de onda se analizan las muestras de los ensayos de actividad enzimática con el sustrato paranitrofenol butirato (pNPB). Para ello se usa el espectrofotómetro Spectroquant PROVE 100 mostrado en el Capítulo 2, a fin de obtener el espectro de absorción de dicho compuesto, registrando absorbancia a lo largo de un determinado intervalo de longitudes de onda.

Se realiza el registro del espectro del mencionado compuesto utilizando una disolución de concentración 0,4 mM empleando como disolvente tanto Tris-HCl como PBS. El resultado de este estudio permitirá conocer la longitud de onda idónea para las mediciones que se realizarán durante los ensayos. El espectro se obtiene a temperatura ambiente debido a que las muestras tomadas en los distintos ensayos se medirán a dicha temperatura y para facilitar la posterior comparación.

Se muestran las gráficas de las dos diluciones, con las absorbancias medidas para cada longitud de onda en las Figuras 39 y 40, respectivamente.

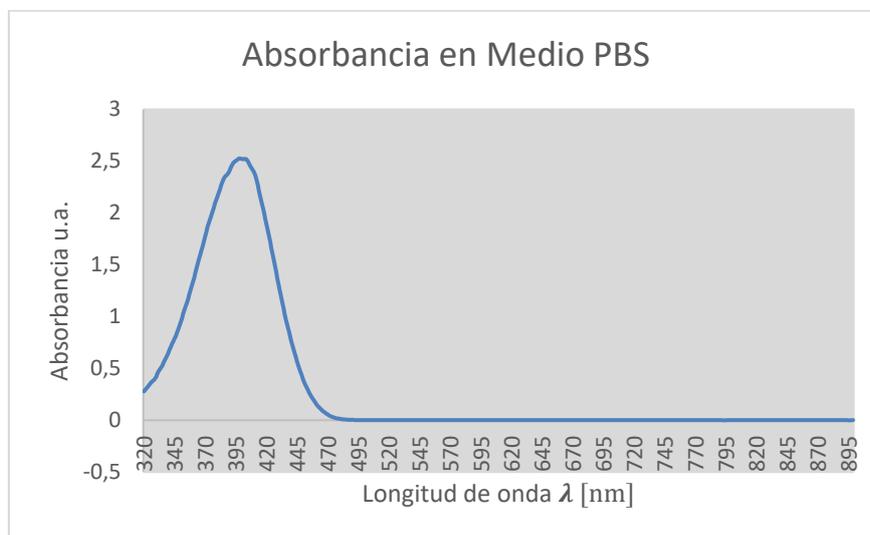


Figura 39: Absorbancia-longitud de onda para una concentración-0.4 de pNPB en medio PBS

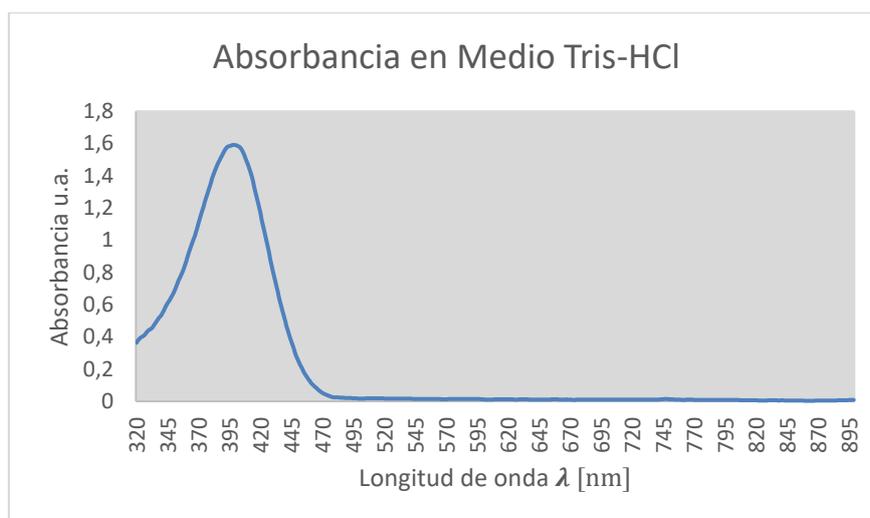


Figura 40: Absorbancia-longitud de onda para una concentración-0.4 de pNPB en medio Tris-HCl

Los resultados muestran que la máxima absorbancia que ofrece el compuesto empleado se presenta en el rango de longitud de onda de 398-407 nm. En coherencia con lo anterior, para este trabajo se ha escogido como longitud de onda en la que se analizan las muestras 405 nm. Adicionalmente, se analiza también las absorbancias a una longitud onda inferior (380 nm) para verificar que se sigue la misma tendencia.

## 5.3.2 DESARROLLO DE ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

### 5.3.2.1 Selección de disoluciones buffer y de compuestos

Las disoluciones buffer, amortiguadoras o tampones son sistemas encargados de evitar grandes variaciones de pH. Generalmente son soluciones de ácidos débiles y de sus bases conjugadas o de bases débiles y sus ácidos conjugados, los cuales pueden resistir a la adición tanto de ácidos como de bases [45]. En este proyecto se han elegido las disoluciones buffer tris (hidroximetil)-aminometano (Tris) y disolución salina tamponada (PBS) para realizar una comparativa de la acción enzimática dependiendo del medio.

- Disolución Tris-HCl: cuyo soluto es la sal hidrocioruro de Tris (hidroximetil)-aminometano, es un compuesto orgánico que actúa como buen regulador y estabilizador fiable del pH muy empleado en los ámbitos de la bioquímica de proteínas, biología molecular y enzimología. Esta disolución se prepara disolviendo *pellets* de Tris Base en agua purificada y ajustando el pH resultante mediante la adición de ácidos.
- Disolución salina tamponada: es una disolución compuesta por cloruro de sodio, cloruro de potasio, dihidrógenofosfato de potasio e hidrógenofosfato de disodio permitiendo obtener valores de pH en torno 7-7,4.

### 5.3.3 PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES BUFFER Y COMPUESTOS

Para la modificación del pH inicial de las disoluciones, se utiliza los compuestos de ácido clorhídrico (HCl) y de hidróxido de sodio (NaOH) para reducir o incrementar el pH respectivamente. En los ensayos llevados a cabo se preparan lotes de 100 mL cada vez que es necesario su uso.

#### 5.3.3.1 Preparación de 100 mL de HCl

Se dispone de ácido clorhídrico 37% cuya masa molar es 36,46 g/mol, y una densidad de 1,19 kg/L. Para preparar 100 mL de una disolución 1M se puede calcular el número de moles necesario según la expresión (9).

$$1M = \frac{X \text{ mol}}{100 \text{ mL}} \quad (9)$$

$$X = 0,1 \text{ mol}$$

Para disponer de dicha cantidad de moles se requiere la siguiente masa:

$$0,1 \text{ mol} * 36,46 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 3,65 \text{ g} \quad (10)$$

Dado que la pureza del producto es de 37%, para tener 3,65 g es necesario pesar 9,85 g.

Teniendo en cuenta la densidad, se puede obtener el volumen necesario de producto

$$0,84 * 10^{-3} \text{ mL} * 9,85 \frac{\text{g}}{1000 \text{ g}} = 8,28 \text{ mL} \quad (11)$$

Se añaden los mL calculados de HCl a un matraz con 50 mL de agua destilada, y se enrasa hasta alcanzar los 100 mL de disolución. Una vez que preparada la muestra, se deposita el contenido en un frasco de cristal (previamente limpiado y descontaminado) y se recubre de *Parafilm* para evitar la evaporación y la contaminación externa.

### 5.3.3.2 Preparación de 100 mL de NaOH

Se dispone de hidróxido de sodio cuya masa molar es 40,00 g/mol. Para preparar 100 mL de una disolución 1 M NaOH se realiza el cálculo análogo al mostrado en la ecuación 9 consiguiendo el resultado  $X = 0,1 \text{ mol}$ .

Si se busca calcular la masa necesaria para concentración indicada se hace el siguiente cálculo:

$$0,1 \text{ mol} * 40 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 4 \text{ g} \quad (12)$$

Se añaden los 4 g calculados de NaOH a un matraz con 50 mL de agua destilada y se enrasa hasta los 100 mL de disolución. Una vez preparada la muestra, se deposita el contenido en un frasco de cristal (previamente limpiado y descontaminado), se recubre de *Parafilm* el tapón para evitar la evaporación y la contaminación externa.

### 5.3.3.3 Preparación de 200 mL de PBS

Se disuelve una tableta de PBS comercial en un recipiente con aproximadamente 50 mL de agua pura, se homogeniza y se lleva a un matraz aforado de 200 mL enrasando con agua hasta dicho volumen.

Con el pH-metro se mide el pH de la disolución (pH 7,6) para poder realizar una comparación posterior con el otro medio de disolución. Finalmente, se deposita el contenido en un frasco de cristal (previamente limpiado y descontaminado), se recubre de *Parafilm* el tapón para evitar la evaporación y la contaminación externa y se conserva en la nevera.

### 5.3.3.4 Preparación de 200 mL de Tris-HCl 0,1 M

Se dispone de Base Tris, que está en formato de *pellets*, de masa molar 121,14 g/mol. En los siguientes cálculos se muestra la masa necesaria de Base Tris para preparar la disolución:

$$0,2 L * 0,1 M = 0,02 mol \quad (13)$$

$$0,02 mol * \frac{121g}{mol} = 2,42 g \quad (14)$$

Se transfieren los 2,42 g en un recipiente con aproximadamente 50 mL de agua pura, se homogeniza la mezcla y se transfiere a un matraz aforado de 200 mL, enrasando con agua hasta dicho volumen. El pH de la disolución se ajustó a 7,60 mediante la adición de HCl de 1 M. La evolución del pH del medio Tris dependiendo de la cantidad de HCl añadido se puede ver en la siguiente gráfica:

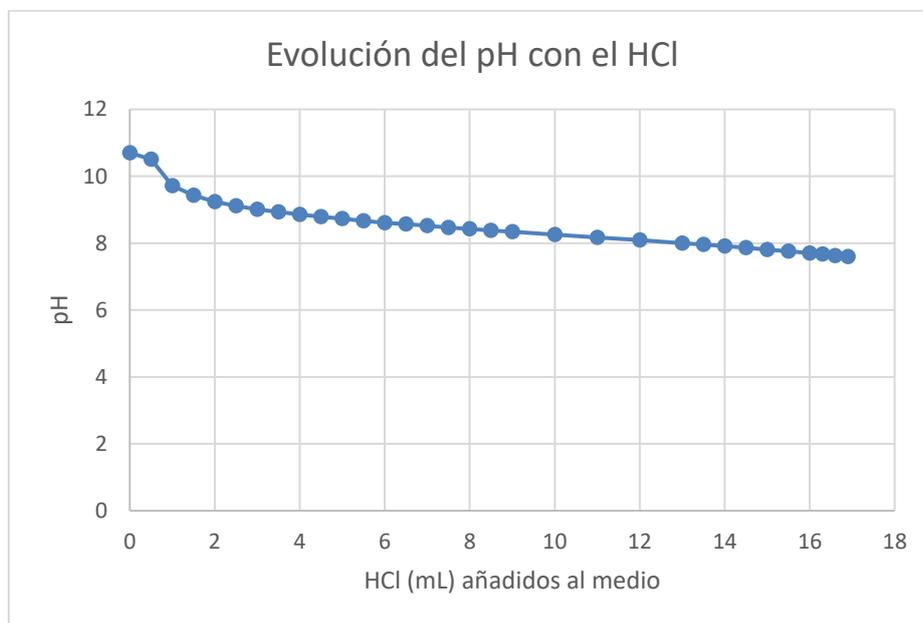


Figura 41: Evolución del pH respecto a los HCl añadidos a la Solución de Tris

Una vez alcanzado el pH requerido se distribuye el contenido resultante en 2 frascos de vidrio de 100 mL cada uno, se cubre la tapa con *Parafilm* para evitar la contaminación y la evaporación del producto siendo finalmente depositados los frascos en la nevera.

### 5.3.3.5 Preparación del sustrato pNPB

Se utiliza la distribuidora Sigma Aldrich para la obtención del parnitrofenol butirato con una masa molecular de 209 g/mol y densidad de 1.19 g/mL. La concentración de parnitrofenol empleada en este proyecto se define en el Capítulo 5 5.3.4 “Diseño de los ensayos” y 5.3.5 “Diseño de los Patrones”, donde las concentraciones de pNPB están entre el rango de 0,05-0,5 mM. Para lograr estas concentraciones se ha fijado el valor de concentración de la disolución madre a 12 mM en 10 mL, permitiendo, mediante esta concentración inicial, poder realizar diluciones en todas las concentraciones definidas.

Primero se obtendrá el número de moles requeridos a partir de la concentración objetivo (ecuación 15). Con los moles se obtiene la masa necesaria usando la masa molar (ecuación 16). Como el soluto es un líquido se usa la densidad para obtener el volumen a pipetear (ecuación

17), posteriormente enrasándolo al volumen total de 10 mL para obtener dicha concentración inicial.

$$12\text{mM} * 0,01\text{L} = 0,12\text{ mol} \quad (15)$$

$$0,12\text{ mmol} * 209 \frac{\text{g}}{\text{mol}} * \frac{1\text{mol}}{1000\text{ mmol}} = 0,025\text{g} = 25\text{ }\mu\text{g} \quad (16)$$

$$\frac{0,025\text{ g}}{1,19\text{ g/mL}} = 0,021\text{ mL} = 21\text{ }\mu\text{L} \quad (17)$$

De esta forma se obtiene una disolución de pNPB a 12 mM en un volumen de 10 mL

### **5.3.4 DISEÑO DE LOS ENSAYOS**

Los ensayos que se realizan en este proyecto se clasifican dependiendo de la enzima empleada (lipasa o cutinasa), así como del medio de disolución (Tris-HCl o PBS). Para cada ensayo se fija el pH de ambas diluciones y la concentración de pNPB y se varía la cantidad de enzima a añadir. Las temperaturas de ensayo se corresponden con las óptimas para ambas enzimas. El pH del medio de ensayo se ha fijado en 7.6, al ser un valor donde se consigue una buena actividad enzimática en ambas enzimas. El valor de concentración de pNPB escogido está de acuerdo con la bibliografía consultada. (0,4 mM de sustrato paranitrofenol [46].

La duración de los ensayos se ha fijado en 60 min. A lo largo de los mismos se toman muestras a diferentes tiempos (9 tomas de la muestra + 1 toma previa antes de añadir la enzima e iniciar el ensayo) de las que se mide absorbancia. El volumen de muestra es 250  $\mu\text{L}$  sobre los cuales se añaden 750  $\mu\text{L}$  de agente de NaOH con el objetivo de desnaturalizar la enzima y parar la reacción a los tiempos deseados.

Los tiempos que se han fijado para los ensayos están diseñados para tener en cuenta el efecto de saturación enzimática, así como por la disminución de sustrato disponible, priorizando la toma de muestreos en los primeros 15 minutos del ensayo (0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20, 30, 60 min). Este efecto de estabilización de la actividad enzimática se ha demostrado que ocurre a lo largo del proyecto, recopilándose en el Capítulo 7 apartados 7.2 y 7.3.

Para finalizar la reacción y antes de comenzar el análisis, es necesario desnaturalizar la enzima cambiando el pH del medio de reacción. Para este cometido se hace uso de los compuestos HCl y NaOH los cuales acidifican o basifican el medio de dilución. Se hace uso, tal y como se ha comentado previamente de un porcentaje 75% compuesto acidificante/basificante y 25 % de la muestra analizada, para tener la certeza que el pH del medio ha cambiado lo suficiente como para desnaturalizar la enzima.

Se comprueba que al añadir 750  $\mu\text{L}$  de HCl o de NaOH las muestras de Tris-HCl se diluyen perdiendo parcial o totalmente la coloración mientras que la muestras de PBS al aplicarse el NaOH adquieren una alta coloración. Se realiza una comparación, tal y como se refleja en la Figura 42 (dilución en 750  $\mu\text{L}$  de HCl o NaOH), donde se ve que la dilución PBS solo muestra coloración al aplicarse un cambio a medio básico y el Tris-HCl muestra coloración tanto cuando no se aplica dilución o con el uso de NaOH.



*Figura 42: Comparación de colores del medio Tris-HCl(arriba) y PBS (abajo) únicamente con concentración-0.4 de pNP-B (medio), ante la adición de HCl (izquierda) y NaOH (derecha)*

Para corroborar que el uso de HCl impide una correcta medición de absorbancia en las diluciones buffer seleccionadas, se realiza un ensayo con la disolución buffer Tris-HCl al ser el único de los dos medios en presentar a pH neutro ( $\text{pH} \approx 7,6$ ) algo de coloración. El ensayo tiene las mismas proporciones que se utilizan en el ensayo de actividad enzimática: 75% del compuesto desnaturalizador de la enzima y 25% de muestra a analizar. Se comprueba que para

una concentración de 0,4 de pNPB en medio TRIS-HCl, la absorbancia medida es 0 cuando se añade una alta cantidad de HCl.

Los resultados demuestran que tanto la disolución Tris-HCl como el PBS tienen el mismo comportamiento cuando el pH se acidifica: la coloración en ambos medios se pierde, imposibilitándose su análisis en el espectrofotómetro en el rango de espectro visible.

Por último, el volumen del ensayo se ha fijado a 6 mL, porque permite realizar todas las tomas de 0,25 mL necesarias a lo largo del tiempo de ensayo y la toma de muestras adicionales si fueran requeridas.

#### **5.3.4.1 Preparación del ensayo con lipasa B**

Para determinar la actividad enzimática de la lipasa B sobre el sustrato pNPB, tanto la concentración como el volumen del ensayo se fijan en 0,4 mM y 6 mL, respectivamente. Para obtener esos valores se hacen los siguientes cálculos para cada uno de los 3 elementos principales del ensayo:

➤ Sustrato pNP-Butirato

Se parte del compuesto madre preparado con una concentración principal de 12 mM, y se realiza una dilución de 6 mL para obtener la concentración 0.4 mM. El volumen necesario para preparar esta disolución es de 200  $\mu$ L de concentración 12 mM:

$$V_o * 12 \text{ mM} = 6\text{mL} * 0,4 \text{ mM} \quad (18)$$

$$V_o = 0,2\text{mL} = 200 \mu\text{L} \quad (19)$$

➤ Enzima Lipasa B

La actividad enzimática de la lipasa B es 9 U/mg, según la página del fabricante[47]. Primero se calcula la cantidad de micromoles que hay en el ensayo a partir de la concentración y el volumen (ecuación 20), con los moles se calcula la U necesaria para que haya una reacción en el tiempo fijado de 60 minutos que dura el ensayo (ecuación 21) y por último se calcula la masa necesaria para obtener la actividad enzimática buscada (ecuación 22).

$$0,0004 M * \frac{6}{1000} L = 2,4 * 10^{-6} mol = 2,4 \mu mol \quad (20)$$

$$U = \frac{2,4 \mu mol}{60 min} = 0,04 U \quad (21)$$

$$\frac{0,04 U}{9 \frac{U}{mg}} = 0,004 \hat{=} mg = 4,4 \mu g \quad (22)$$

Se hace uso de la balanza analítica donde se pesa una cantidad de enzima aproximadamente de 1000  $\mu g$  la cual se disuelve en 4 mL de medio PBS obteniéndose una concentración de 0,25  $\mu g / \mu L$ .

La cantidad de  $\mu L$  para la obtención de esa cantidad de masa de enzima es:

$$\frac{4,4 \mu g}{0,25 \mu g / \mu L} = 17,6 \mu L \quad (23)$$

➤ Medio del ensayo

Se preparan los ensayos para las cantidades simples y dobles de enzima:

$$\begin{aligned} (\text{Simple concentración de enzima}) & 6000 - 200 - 17,6 \\ & = 5782,4 \mu L \end{aligned} \quad (24)$$

$$\begin{aligned} (\text{Doble concentración de enzima}) & 6000 - 200 - 35,2 \\ & = 5764,2 \mu L \end{aligned} \quad (25)$$

### 5.3.4.2 Preparación del ensayo de la cutinasa 2P

Para el ensayo de la cutinasa 2P sobre el sustrato pNPB, tanto la concentración (0,4 mM) como el volumen (6mL) deberán ser los mismos valores que los del ensayo de la lipasa B para poder realizar la posterior comparación. Se muestran, a continuación, los siguientes cálculos para cada uno de los 3 elementos principales del ensayo:

➤ Sustrato pNP-Butirato

Se realizan los mismos cálculos que los realizados en las ecuaciones (18) y (19) obteniendo el mismo resultado que en el ensayo de la lipasa B de 200  $\mu\text{L}$ .

➤ Enzima Cutinasa 2P

La actividad enzimática de la cutinasa 2P es 20 U/mg, según la página del fabricante [43]. Al igual que se hizo para el ensayo con la lipasa B, primero se calcula la cantidad de micromoles que hay en el ensayo a partir de la concentración y el volumen (ecuación 26). Con los moles se puede obtener la U necesaria para que haya una reacción enzimática en los 60 minutos que dura el ensayo (ecuación 27) y por último se calcula la masa necesaria para obtener la actividad enzimática buscada (ecuación 28):

$$0,0004 \text{ M} * \frac{6}{1000} \text{ L} = 2,4 * 10^{-6} \text{ mol} = 2,4 \mu\text{mol} \quad (26)$$

$$U = \frac{2,4 \mu\text{mol}}{60 \text{ min}} = 0,04 \text{ U} \quad (27)$$

$$\frac{0,04 \text{ U}}{20 \frac{\text{U}}{\text{mg}}} = 0,002 \text{ mg} = 2 \mu\text{g} \quad (28)$$

Se pesa una cantidad de enzima aproximadamente de 1000  $\mu\text{g}$  la cual se disuelve en 4 mL de medio PBS obteniéndose una concentración de 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

La cantidad de  $\mu\text{L}$  para la obtención de esa cantidad de masa de enzima es:

$$\frac{2 \mu\text{g}}{0,25 \mu\text{g}/\mu\text{L}} = 8 \mu\text{L} \quad (29)$$

- Medio del ensayo

Se prepara los ensayos para las cantidades simples y dobles de enzima:

$$(Simple\ concentraci3n\ de\ enzima)\ 6000 - 200 - 8 = 5792\ \mu L \quad (30)$$

$$(Doble\ concentraci3n\ de\ enzima)\ 6000 - 200 - 16 = 5784\ \mu L \quad (31)$$

### 5.3.5 DISEÑO DE LOS PATRONES

Para analizar la disminuci3n de la concentraci3n del pNPB en los ensayos de las disoluciones Tris y PBS, se diseñan dos baterías de 8 patrones para cada disoluci3n buffer respectivamente. Las concentraciones de este sustrato en los patrones abarcan todo el rango de concentraciones necesarias para estudiar la caída de la concentraci3n del pNPB tras aplicar la enzima. El rango elegido abarca desde la concentraci3n 0 mM hasta la concentraci3n 0,5 mM de pNPB, teniendo en cuenta que la concentraci3n inicial del ensayo este fijado en 0,4 mM.

Las concentraciones se preparan a partir de la concentraci3n de 12 mM de pNPB preparada en el apartado 5.3.3.5. Para cada concentraci3n requerida en el patr3n se realizan diluciones usando la siguiente f3rmula:

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

Conociendo los parámetros:  $C_1 = 12\ mM(fijado)$ ,  $V_2 = 5\ mL(fijado)$  y  $C_2 =$  la concentraci3n buscada.

En la Tabla 5 se muestran los volúmenes necesarios de la disoluci3n de 12 mM (V1) y de disoluci3n Tris-HCl o PBS (V3), respectivamente, para preparar 5 mL de cada uno de los patrones previamente descritos.

Tabla 5: Volúmenes para la preparaci3n de los patrones

C (mM)	V1 (mL)	V3(mL)
0,00	0,000	5,000

0,05	0,021	4,979
0,08	0,033	4,967
0,10	0,042	4,958
0,20	0,083	4,917
0,30	0,125	4,875
0,40	0,167	4,833
0,50	0,208	4,792

Como se indicó en el apartado 5.3.4, al añadir NaOH, tanto la disolución Tris-HCl como la de PBS muestran la coloración necesaria que evidencia la presencia de pNPB para el correcto empleo de las técnicas de espectrofotometría indicadas en el capítulo 2.

### **5.3.6 ANÁLISIS DE LAS MEDIDAS (EJEMPLO LIPASA B DUPLICANDO LA CANTIDAD DE ENZIMA EN MEDIO TRIS-HCl)**

Una vez se realiza la toma de datos de las absorbancias de los ensayos y de las curvas de los patrones (los datos obtenidos de los ensayos se muestran en los ANEXOS I, II, III, IV), se representan los datos de absorbancia frente a tiempo para cada ensayo (estas gráficas se muestran en el Capítulo 7 “Análisis de resultados”). Como ejemplo demostrativo de cómo se realiza el proceso se ha escogido el ensayo de la lipasa B con doble cantidad de enzima en medio Tris-HCl del cual se detallará paso a paso el procedimiento seguido. Se muestra a continuación la gráfica absorbancia frente a tiempo del ensayo.

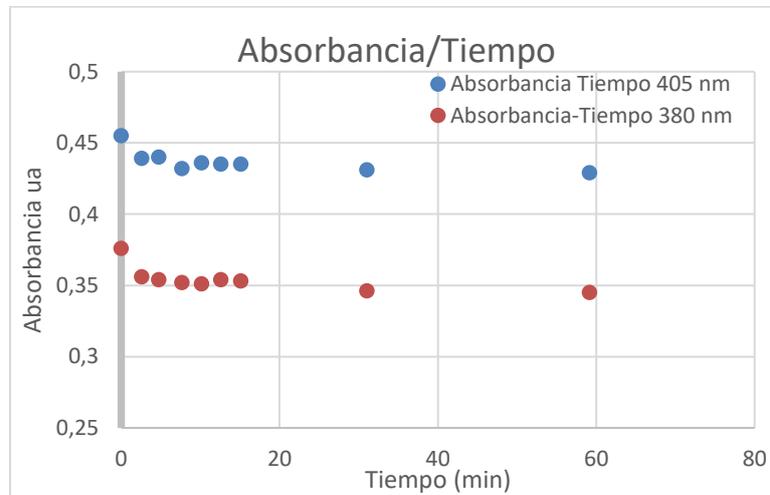


Figura 43: Gráfica absorbancia-tiempo de la lipasa B a doble cantidad de enzima en medio Tris-HCl

Para analizar cómo ha ido disminuyendo la concentración del sustrato a lo largo del tiempo del ensayo, se usa las técnicas espectrofotométricas descritas en el capítulo 2 apartado 2.2.2 donde se explica la ley de Lambert-Beer. Para ello se hace uso de la curva de calibrado explicado en el apartado 2.2.2.2 donde conocidas las absorbancias a distintas concentraciones se obtiene una recta lineal conforme a la ley de Lambert-Beer. La recta de regresión lineal (conocidas la pendiente de la recta y la ordenada en el origen) permite estimar las concentraciones de las muestras a partir de los valores de absorbancia de las mismas, tal y como se ve en la ecuación 6.

A continuación, se muestra la curva patrón empleada para analizar los datos absorbancia-tiempos mostrados en la gráfica anterior. En la gráfica se muestran las absorbancias obtenidas para el buffer Tris-HCl+pNPB a 405 nm (azul) y Tris-HCl+pNPB (25%) +NaOH (75%) (verde).

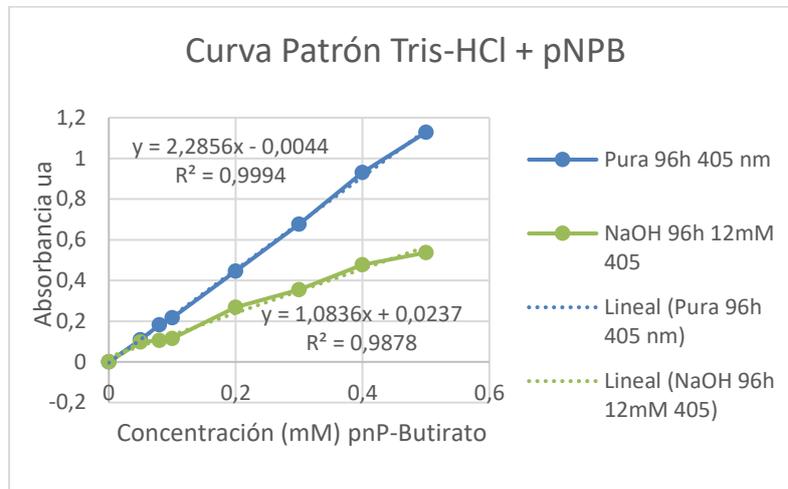


Figura 44: Curva patrón del Tris-HCl con pNPB

Para obtener las concentraciones del ensayo a partir de los puntos de muestreo se hace uso de la recta de calibrado de Tris-HCl + pNPB (25%) + NaOH (75%) debido a que las muestras a estudiar están en esa proporción para que ocurra la desnaturalización de la enzima. Siguiendo el ejemplo escogido, se realiza a continuación el cálculo para obtener la cantidad de concentración para cada punto de absorbancia analizado durante el ensayo de la lipasa B con doble cantidad de enzima en disolución Tris-HCl:

$$C = \frac{A - 0,0237}{1,0836} \quad (32)$$

Este cálculo se realiza para cada uno de los puntos de muestra obtenidos en el ensayo. En la siguiente figura se recogen los datos obtenidos de concentración-tiempo del ensayo lipasa B para doble cantidad de enzima en disolución Tris-HCl.

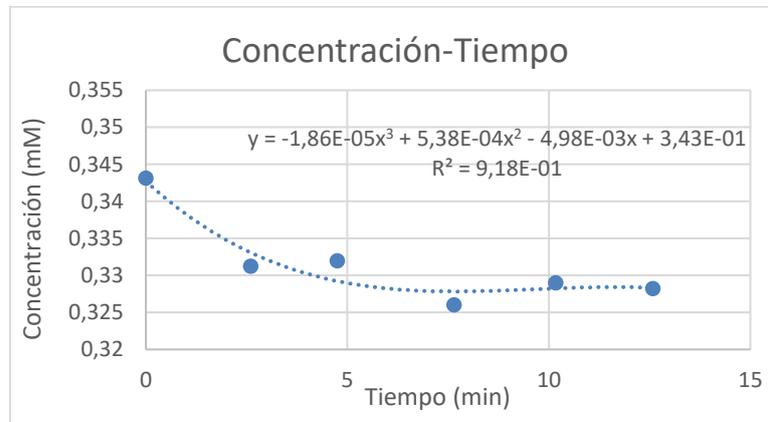


Figura 45: Gráfica concentración-tiempo del ensayo lipasa B en medio Tris-HCl

Una vez se obtienen las concentraciones, se hace uso de las ecuaciones del modelo Michaelis-Menten explicado en el capítulo 3 apartado 3.4 “Cinética de las reacciones enzimáticas” para estimar los parámetros característicos de las enzimas bajo sus condiciones de operación (velocidad máxima y la constante de Michaelis). Dicho modelo, relaciona la velocidad de reacción con la concentración del sustrato como se presenta en la ecuación 7. El ajuste a una curva polinómica obtenida en la gráfica previa permite, mediante posterior derivación, obtener la velocidad de reacción  $r$  la cual se relaciona con la concentración de sustrato de la siguiente forma:

$$r = \frac{-d[S]}{dt} \quad (33)$$

Esta fórmula indica la disminución del sustrato a través del tiempo debido a la acción degradadora de la enzima. A continuación, se obtienen los datos de la velocidad de reacción para cada concentración del ensayo donde se realiza la derivada de la función polinómica en función de la concentración:

$$r = -1 * (3 * (-1,86 * 10^{-5} * C^2) + 2 * (5,38 * 10^{-4} * C^1 - 4,98 * 10^{-3})) \quad (34)$$

Para cada concentración obtenida en el ensayo se obtiene la velocidad de reacción asociada, permitiendo continuar con la linealización de las dobles inversas de Lineaweaver-Burk, explicado en el capítulo 3 apartado 3.4.1, y obtener los parámetros de la cinética enzimática

( $v_{max}$  y  $K_m$ ) tal y como se define en la ecuación 8. En las gráficas siguientes se representan los resultados obtenidos de r-concentración y la gráfica inversa de r-inversa de la concentración.

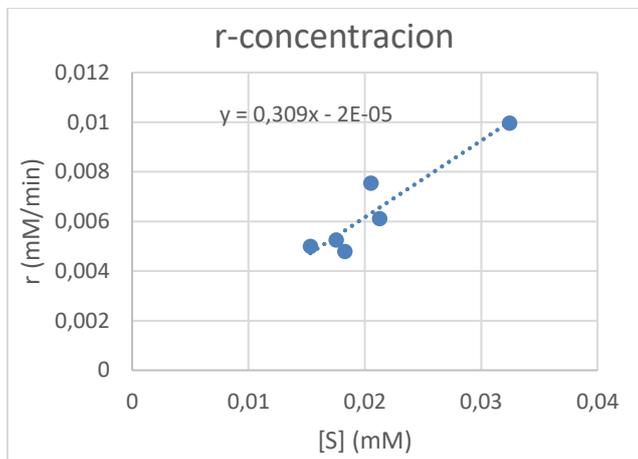


Figura 46: Velocidad de reacción frente a la concentración del ensayo lipasa B en medio Tris-HCl

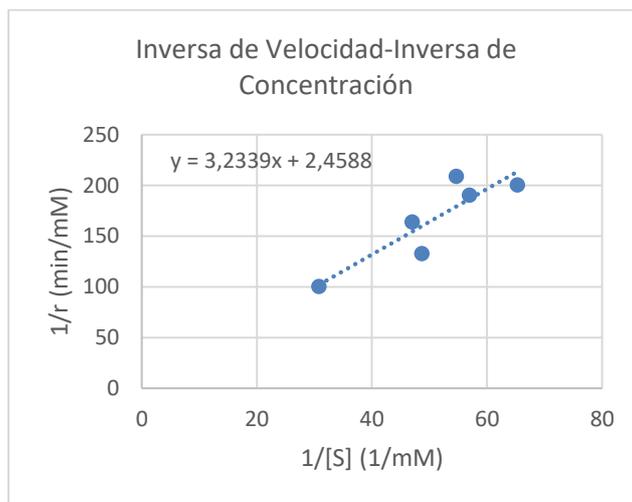


Figura 47: Inversa de la velocidad de reacción frente a la inversa de concentración del ensayo lipasa B en medio Tris-HCl

Para el caso que se está definiendo en este apartado se realizan los siguientes cálculos:

$$v_{max} = \frac{1}{2,4588} = 0,406 \text{ mM/min}^{-1} \quad (35)$$

$$K_m = v_{max} * 3,233 = 1,31 \text{ min}^{-1}$$

Todos los gráficos previos junto con los cálculos para la obtención de la cinética enzimática se muestran para cada ensayo realizado en el capítulo 7 “Análisis de resultados”.

## **5.4 ENSAYOS DE DEGRADACIÓN DEL PET**

### **5.4.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS SÍNTÉTICAS**

El trabajo se centra en el estudio de PET debido a que, tal y como se ha indicado en el Capítulo 1 “Introducción”, es uno de los plásticos que más se usa en la actualidad y sobre todo en los envases y las botellas de agua. En la Figura 48 se muestra la botella empleada.

Tal y como se vio en los ensayos de análisis de la actividad enzimática, el medio Tris-HCl (capítulo 7 apartado 7.2), fue el más idóneo para conseguir una eficiente reacción catalítica enzimática.



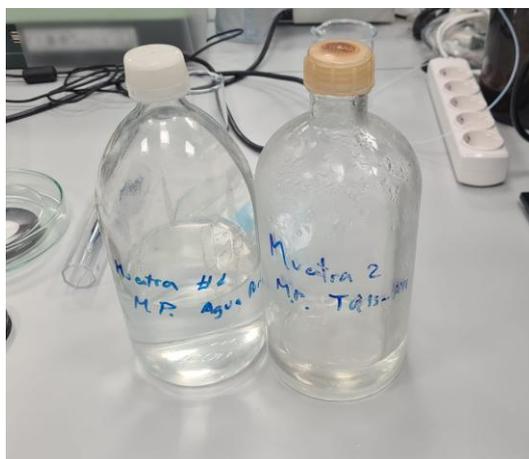
*Figura 48: Botella de plástico usada para la obtención del PET*

Se han preparado dos reservorios sintéticos para analizar el impacto de las enzimas directamente sobre los MP sin que la aparición de elementos externos afecte al rendimiento. El primer reservorio está compuesto por agua purificada y PET, y el segundo reservorio está compuesto de Tris-HCl + PET.

Para la obtención de las muestras sintéticas se han realizado los siguientes pasos:

- Se realiza la limpieza del mortero, botella de plástico y de todas las herramientas de corte necesarias para romper el plástico, con el objeto de quitar todas las posibles impurezas.
- Se aplican cortes con las tijeras y cúteres, para obtener fragmentos de plástico con un tamaño inferior a 5 mm. Se ha priorizado la cara de la botella de plástico que tenía ausencia de pegatinas para minimizar la aparición de elementos que no son PET.
- Se vierten los fragmentos de plástico en el cuenco del mortero y haciendo uso de nitrógeno líquido, se fragiliza los plásticos para su posterior trituración a un tamaño inferior a las 100  $\mu\text{m}$ . Se recomienda en esta fase hacer uso de gafas protectoras por el posible impacto de PET que salta.
- Se echan los MP obtenidos en 500 mL de agua pura. Se hace el mismo procedimiento para la mezcla de 150 mL de Tris-HCl.
- Se realiza un filtrado de ambos reservorios sintéticos mediante el uso de unas gasas estériles de primeros auxilios, obteniendo finalmente las reservas de Agua Pura y Tris-HCl con una concentración indeterminada de MP.
- Los envases con las muestras filtradas son sellados con *Parafilm* para evitar la evaporación y contaminación externa y son almacenados en la nevera.

En la Figura 49 se muestran los reservorios sintéticos  $\text{H}_2\text{O} + \text{PET}$  y  $\text{Tris-HCl} + \text{PET}$  en botellas de vidrio.



*Figura 49: Botellas de la muestra de H<sub>2</sub>O + PET y Tris-HCl + PET*

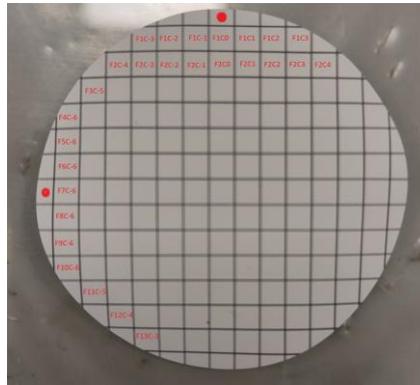
#### **5.4.2 ANÁLISIS DE MUESTRAS SÍNTÉTICAS**

Una vez preparada las muestras sintéticas que se van a emplear en los ensayos para la degradación de MP, se calcula las concentraciones de partículas que hay en ambos reservorios preparados artificialmente. De esta forma se puede determinar y controlar la cantidad de MP requeridos en cada uno de los experimentos, realizando las diluciones necesarias y filtrando las mismas.

Para la determinar la concentración de MP se hace uso del microscopio Olympus DSX1000, que permite analizar la forma de las partículas que se pueden encontrar (MP, sales, restos de filtro...) así como observar la cantidad de elementos que hay en un cuadrante dado analizado de filtro, y el microscopio FTIR, que permite asegurar que los elementos encontrados son restos de PET, descartando sales o restos de celulosa.

Se observó que los reservorios sintéticos presentaban una alta concentración de MP, siendo necesario usar una de las estrategias de submuestreo analizadas en el Capítulo 2. Se ha optado por la estrategia de submuestreo de analizar un 25% del filtro. Para asegurar una correcta comparación se aplicará a todas las muestras a analizar.

A continuación, se muestra una imagen de las coordenadas que se utilizan en los análisis de los filtros para poder situar los elementos encontrados:



*Figura 50: Patrón de referencia para los filtros*

Seguidamente se exponen dos tablas como ejemplo con datos de partículas medidas y analizadas de los reservorios sintéticos. Con este análisis se ha determina la forma de los tipos de MP que aparecerán en los ensayos con enzimas. En la tabla se recoge la forma, el color, las dimensiones de la partícula, las coordenadas del filtro donde se ubica la partícula y el polímero a que corresponde la señal analizada por IR en transmitancia. El tipo de polímero se obtiene mediante una comparación con la biblioteca de espectros de polímeros y el espectro obtenido al analizar el MP.

Principalmente las partículas encontradas en los reservorios sintéticos fueron partículas PET, celulosa y cupra. Las partículas PET son las obtenidas, en la preparación de los MP de los reservorios sintéticos. Las partículas de celulosa y cupra proceden del filtro de celulosa del purificador del agua.

Para identificar qué tipo de material es el cupra, se hace uso del microscopio FTIR y se comprueba que el espectro de la molécula que se analiza muestra las mismas características que las de una fibra de celulosa, presentando además la misma forma fibrosa. Por tanto, en los posteriores ensayos y análisis, el polímero cupra ha sido estudiado como una partícula de celulosa.

Tabla 6: Elementos analizados por infrarrojos de la muestra de H<sub>2</sub>O Pura + PET

Forma	Color	L [μm] A[μm <sup>2</sup> ]	Código	Tipo de polímero
Fragmento	Transparente	4242,850	F2C-1 64	Poliéster
Fragmento	Azul	3047,303	F2C0	Cupra
Fragmento	Azul	802,114	F2C0 (2)	Celulosa/Cupra
Fragmento	Transparente	900,726	F2C0 (3)	Lana
Fragmento	Transparente	4523,599	F3C0	PET
Fibra	Rojo	2259,326	F1C0	Celulosa
Fragmento	Transparente	4288,703	F3C0 (2)	PET
Fragmento	Transparente	5765,809	F3C0 (3)	PET
Fragmento	Transparente	956,774	F3C0 (4)	PET

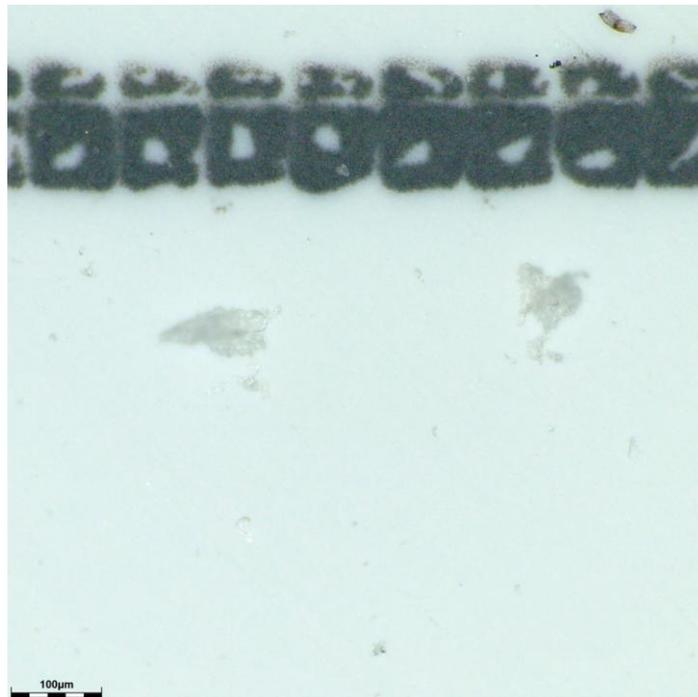
Tabla 7: Elementos analizados por infrarrojos de la muestra de TRIS + PET

Forma	Color	L [μm] A[μm <sup>2</sup> ]	Código	Tipo de polímero
Fragmento	Transparente	1458,735	F1C0	Celulosa
Fragmento	Transparente	200,298	F1C0 (2)	PET
Fragmento	Transparente	8061,789	F2C0	PET
Fragmento	Transparente	5519,312	F3C-1	Cupra/Celulosa
Fragmento	Transparente	4400,012	F2C0 (2)	PET
Fragmento	Azul	7352,293	F4C0	Cupra/Celulosa
Fragmento	Transparente	6329,916	F5C-4	PET
Fragmento	Transparente	10005,609	F4C-4	PET
Fragmento	Transparente	3427,279	F3C-1(2)	PET

Los MP encontrados en los análisis de los dos reservorios sintéticos presentaron 2 tipos de morfologías, fibra y fragmento. En las Figuras 51 y 52 se muestran dos ejemplos de dichas morfologías.



*Figura 51: Fibra de PET procedente de los reservorios sintéticos.*



*Figura 52: Fragmento de PET procedente de los reservorios sintéticos.*

Las concentraciones obtenidas de los reservorios sintéticos se muestran en la gráfica siguiente, presentando unas concentraciones muy elevadas a las que se realizarán en los ensayos.

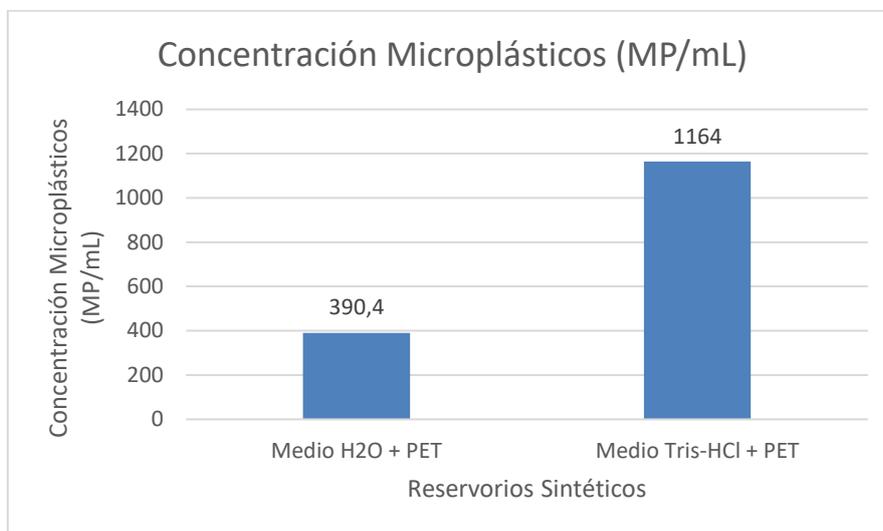


Figura 53: Concentración de MP en los reservorios sintéticos

### 5.4.3 DESARROLLO DE LOS ENSAYOS EXPERIMENTALES CON PET

Una vez preparadas las concentraciones de las muestras sintéticas que se usan en el laboratorio, se definen las condiciones y análisis de los ensayos. Para las condiciones de los ensayos se estudia la actividad enzimática de la lipasa B y la cutinasa 2P para las temperaturas de 55 °C y 37 °C. Estas temperaturas, tal y como se ha indicado en apartados anteriores, son las temperaturas óptimas de funcionamiento de estas enzimas respectivamente. El medio donde se realiza los ensayos es el medio Tris-HCl.

#### 5.4.3.1 Definición de las concentraciones de los reservorios sintéticos

Para la preparación del sustrato de los ensayos, se analiza si la presencia de más o menos sustrato afecta a la actividad de las enzimas. Con este fin se han fijado dos concentraciones diferentes de MP, alta y baja. Para fijar cuál sería la concentración de referencia se ha utilizado la cantidad de MP PET encontrada durante el estudio del Lago Luruaco en Colombia [48]. En dicho estudio se indicaba el promedio de partículas de MP en la estación seca de  $0,25 \text{ MP} \cdot \text{L}^{-1}$  y en la húmeda  $1,90 \text{ MP} \cdot \text{L}^{-1}$ . El PET aparecía únicamente en forma de fragmento siendo un 35,3% del total de fragmentos de MP los cuales a su vez solo conformaban un 20,8% de las partículas de MP encontradas dividiéndose en fragmentos y fibras de MP [48]. Haciendo el

siguiente cálculo se obtiene el promedio de MP PET que se encontró en Colombia tanto en la estación seca como en la estación de lluvias:

- Estación de lluvias:

$$1,9 \frac{MP}{L} * 0,208 * 0,353 = 0,1395 \frac{MP}{L} = 1,395 * 10^{-4} \frac{MP}{mL} \quad (36)$$

- Estación seca:

$$0,25 \frac{MP}{L} * 0,208 * 0,353 = 0,01835 \frac{MP}{L} = 1,835 * 10^{-5} \frac{MP}{mL} \quad (37)$$

Al ser concentraciones muy pequeñas las que se encuentran en la naturaleza y para una correcta evaluación de los ensayos, se ha aumentado la concentración MP/mL. La reserva denominada como concentración baja tendrá aproximadamente 1 MP por cada cuadrado en la cuadrícula estudiada del filtro, mientras que la concentración alta de PET será de un orden de magnitud superior, esperando encontrar alrededor de 10 MP por cuadrado en la cuadrícula estudiada del filtro. El volumen final para ambos medios se ha fijado en 300 mL.

A continuación, se expone los procedimientos con el objetivo de reducir la concentración de los MP que hay en los reservorios sintéticos analizados previamente (390,4 MP/mL en el medio H<sub>2</sub>O + PET y 1164 MP/mL en el medio Tris-HCl + PET) así de esta forma obtener las concentraciones teóricas iniciales de los ensayos. Para fijar estas cantidades de PET, se ha contado la cantidad de cuadrados del filtro que se planea analizar para poder fijar las concentraciones de alta y baja concentración. Antes de tomar la cantidad requerida de la reserva sintética original, es necesario agitarla para favorecer la homogeneización.

Medio H<sub>2</sub>O + PET: los cuadrados de la cuadrícula del filtro que se analizan son 132.

- Baja densidad de PET (concentración 1 partícula por cuadrado)

$$\text{Concentración teórica final: } \frac{132 \text{ partículas}}{300 \text{ mL}} = 0,44 \text{ partículas/mL}$$

$$390,4 \frac{MP}{mL} * V = 300mL * 0,44 \frac{MP}{mL} \quad (38)$$

$$V = 0,338 \text{ mL}$$

- Alta densidad de PET (concentración de 10 partículas por cuadrado)

Concentración teórica final:  $\frac{1320 \text{ partículas}}{300 \text{ mL}} = 4,4 \text{ partículas/mL}$

$$390,4 \frac{MP}{mL} * V = 300mL * 4,4 \frac{MP}{mL} \quad (39)$$

$$V = 3,38 \text{ mL}$$

Medio Tris-HCl + PET: los cuadrados de la cuadrícula del filtro que se analizan son 136.

- Baja densidad de PET (concentración de 1 partícula por cuadrado)

Concentración teórica final:  $\frac{136 \text{ partículas}}{300 \text{ mL}} = 0,453 \text{ partículas/mL}$

$$1164 \frac{MP}{mL} * V = 300mL * 0,453 \frac{MP}{mL} \quad (40)$$

$$V = 0,116 \text{ mL}$$

- Alta densidad de PET (concentración de 10 partículas por cuadrado)

Concentración teórica final:  $\frac{1360 \text{ partículas}}{300 \text{ mL}} = 4,53 \text{ partículas/mL}$

$$1164 \frac{MP}{mL} * V = 300mL * 4,53 \frac{MP}{mL} \quad (41)$$

$$V = 1,16 \text{ mL}$$

### 5.4.3.2 Definición y desarrollo de los ensayos

Para los ensayos de degradación del PET se ha fijado el volumen total del ensayo de 6 mL, de los cuales la cantidad de enzima que se añade es un orden de magnitud inferior, 0,6 mL, siendo el resto el medio con el PET que se pretende ensayar. Las temperaturas de los ensayos son las temperaturas óptimas de las enzimas y la velocidad de agitación es de 200 rpm. Se procede a continuación a definir los ensayos que se realizarán para analizar cómo afecta la enzima a la degradación del PET.

Controles Negativos:

- 2 ensayos con solamente agua destilada en los tubos *Falcon*, a las temperaturas de 55° C y 37° C respectivamente.
- 2 ensayos de medio H<sub>2</sub>O + PET (baja concentración) sin enzima a las condiciones de 55° C y 37° C.
- 2 ensayos de medio H<sub>2</sub>O + PET (alta concentración) sin enzima a las condiciones de 55° C y 37° C.
- 2 ensayos con solamente medio Tris-HCl en los tubos *Falcon*, a las temperaturas de 55° C y 37° C
- 2 ensayos de medio Tris-HCl + PET (baja concentración) sin enzima a las condiciones de 55° C y 37° C.
- 2 ensayos de medio Tris-HCl + PET (alta concentración) sin enzima a las condiciones de 55° C y 37° C.

Ensayos con MP en medio Tris-HCl:

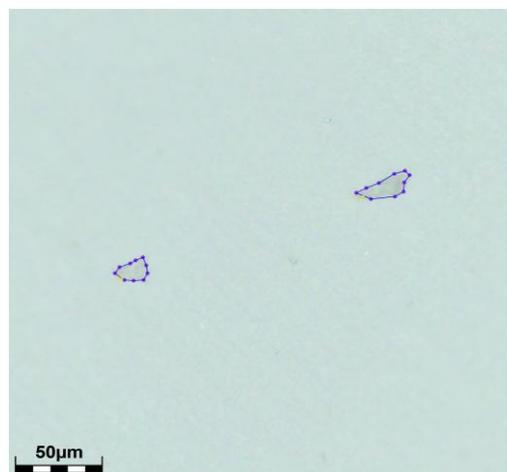
- Ensayos a 37° C:
  - 2 ensayos con la enzima Lipasa B con alta y baja concentración de PET.
  - 2 ensayos con la enzima Cutinasa 2P con alta y baja concentración de PET
- Ensayos a 55° C:
  - 2 ensayos con la enzima Lipasa B con alta y baja concentración de PET.
  - 2 ensayos con la enzima Cutinasa 2P con alta y baja concentración de PET

Una vez definidas las cantidades y el número de ensayos que se realizarán en esta fase del proyecto, se fija el tiempo del ensayo a 48 horas. Finalizado el tiempo, se filtra el contenido de cada ensayo en los filtros de nitrato de celulosa y se secan en estufa a una temperatura de 60 °C durante 24-48 horas. Finalizado ese tiempo se retira de la estufa y los filtros se colocan en placas Petri para que alcancen la temperatura del ambiente y no absorban humedad del medio.

#### **5.4.4 PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS MEDIDAS**

El análisis de las muestras se hará mediante los microscopios Olympus DSX1000 y FTIR. Al igual que se realizó para el análisis de los reservorios sintéticos, se ha usado la estrategia de submuestreo para analizar el 25% del filtro puesto que la concentración de PET en los ensayos ha sido elevada.

El microscopio Olympus DSX1000 permite analizar la cantidad y la morfología de las partículas encontradas en los análisis, permitiendo conocer sus dimensiones. Se muestra a continuación una imagen de las partículas encontradas con el microscopio.



*Figura 54: Partículas encontradas con el microscopio Olympus DSX1000*

Con el microscopio FTIR se determina el material de las micropartículas. Para minimizar las interferencias del filtro, se ha realizado una limpieza de los espectros de IR no considerando las regiones correspondientes a las bandas características de la celulosa. De esta manera, se evitan los problemas de medida debidos a la mayor intensidad de señal causada por el filtro y la

generada por las muestras. Una vez realizado este proceso, el *software* empleado compara el espectro de IR con los disponibles en su base de datos para finalmente estimar el grado de semejanza con al espectro obtenido de la muestra.

Tabla 8: Tramos del espectro retirados, correspondientes al filtro de celulosa

Inicio del tramo	Fin del tramo
1690 $cm^{-1}$	1614 $cm^{-1}$
1315 $cm^{-1}$	1260 $cm^{-1}$
1160 $cm^{-1}$	989 $cm^{-1}$
885 $cm^{-1}$	815 $cm^{-1}$
721 $cm^{-1}$	700 $cm^{-1}$

Se muestra, a continuación, dos imágenes procedentes del microscopio FTIR. En la Figura 55, se muestra una partícula de la muestra siendo analizada. En la Figura 56, se observa el análisis comparativo mediante FTIR, donde se contrasta el espectro de la misma partícula analizada con los espectros del PET y PET metalizado de la biblioteca de espectros del software. Ambos espectros presentan bandas características del PET, como la señal intensa cerca del 1700  $cm^{-1}$  asociada al estiramiento del grupo C=O del grupo éster y las bandas en las regiones 1250-1000  $cm^{-1}$ . Por tanto, debido a la interacción con las distintas longitudes de onda de la región IR, la partícula presenta indicios de ser un PET.



Figura 55: Partícula PET encontrada en el ensayo

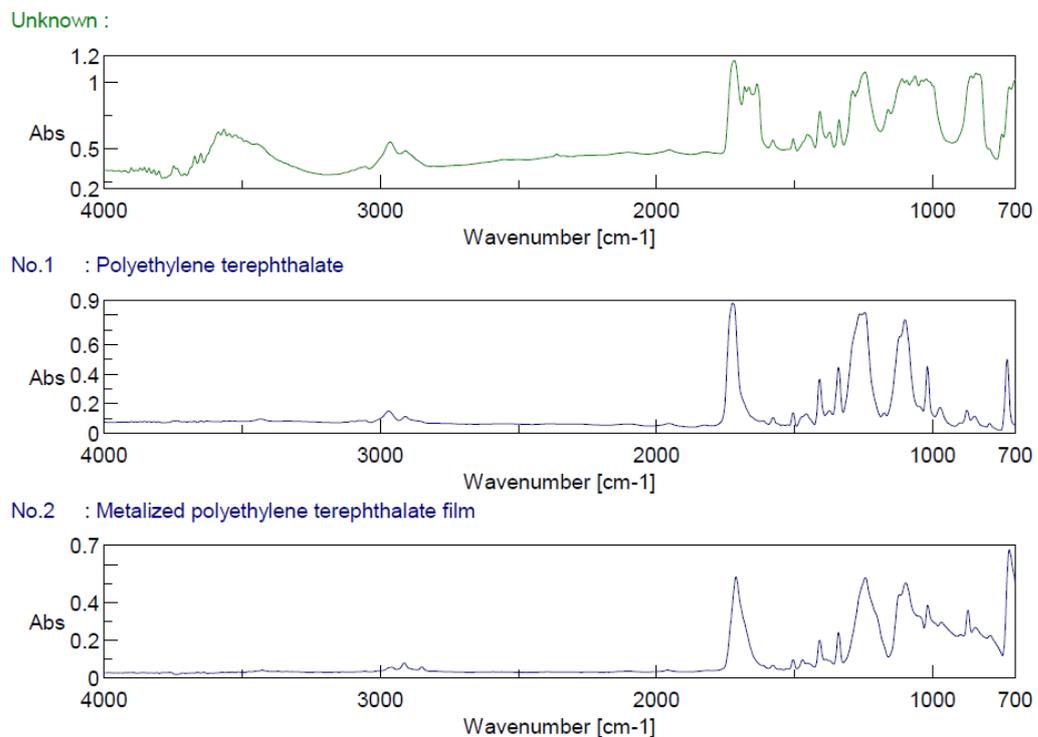


Figura 56: Comparación de espectros de la partícula hallada en el análisis

## Capítulo 6. PLANIFICACIÓN Y ESTIMACIÓN ECONÓMICA

En este capítulo se muestran los costes necesarios para realizar a escala de laboratorio todos los ensayos pertinentes a la degradación enzimática de los MP, el coste de los dispositivos empleados, así como los costes de las herramientas necesarias para la medición evolutiva de la degradación.

### 6.1 PRESUPUESTO DE LOS DISPOSITIVOS EMPLEADOS

*Tabla 9: Coste de los equipos empleados*

Nombre	Precio individual €	Unidades	Precio Total €
Microscopio OLYMPUS DSX 1000	60.000,00	1	60.000,00
Espectrofotómetro de Infrarrojo JASCO (FTIR + microscopio)	101.200,75	1	101.200,75
Espectrofotómetro Spectroquant PROVE 100	6.944,16	1	6.944,16
Balanza analítica Mettler Toledo XS205	10.354,40	1	10.354,40
Purificador de agua MERCK Direct-Q	13.860,00	1	13.860,00
Campana de extracción	5.447,95	1	5.447,95
Estufa de laboratorio	1.399,00	1	1.399,00
Incubadora orbital SKI 4	4.354,79	1	4.354,79
pH-metro GLP 21	1.125,00	1	1.125,00
			204.686,05

## 6.2 PRESUPUESTO DE HERRAMIENTAS DE LABORATORIO, COMPUESTOS Y ENZIMAS

Se emplea una cantidad de 10 tubos *Eppendorf* por cada ensayo. Como el total de los ensayos son 16, el total de tubos *Eppendorf* es de 160 tubos.

Respecto a los tubos *Falcon* utilizados en este proyecto, para el desarrollo de todos los experimentos se ha requerido un total de 118. Pero la cantidad de tubos utilizados en este proyecto es superior al haberse realizado ensayos de prueba y error a lo largo del trabajo.

Tabla 10: Coste de herramientas de laboratorio, compuestos y enzimas

Nombre	Precio individual €	Unidades	Precio Total €
Mortero de Laboratorio	697,00	1	697,00
Placas Petri	2,55	44	112,20
Tubos <i>FALCON</i> de 15 ml estériles	0,29	118	34,22
Tubos <i>Eppendorf</i> Protein LoBind	0,12	160	19,84
Nitrógeno líquido (carga del depósito de 25 L)	310,33	1	310,33
Base Tris (100g)	42,00	1	42,00
Fosfato sódico monobásico (500g)	78,40	1	78,40
Hidróxido de Sodio (NaOH) (500g)	83,80	1	83,80
Ácido Clorhídrico (HCl)-37% (500 mL)	640,00	1	640,00
Lipasa B Candida antarctica, recombinante del <i>Aspergillus oryzae</i> (50 mg)	229,00	1	229,00
Cutinasa 2P (10.000 U)	59,00	1	59,00
4-Nitrofenil Butirato (1g)	120,00	1	120,00
			2.425,79

El precio total de los dispositivos, herramientas y componentes necesarios para la realización de este proyecto es de 207.111,84 €. Hay que destacar que el precio obtenido se tiene en cuenta simplificaciones indicadas previamente, así como que el precio se basa en procedimientos de laboratorio sin tener en cuenta la escalabilidad de los precios a escala industrial.

## **Capítulo 7. RECOPIACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

En este capítulo se muestran los resultados de los ensayos, conclusiones, comprobando o rechazando las hipótesis propuestas en este trabajo. Para una correcta comprensión de los resultados y para facilitar un orden de lectura adecuado, se ha dividido este capítulo en cuatro partes importantes, teniendo en cuenta el orden cronológico de obtención de los resultados:

- Preparación de los patrones de referencia.
- Actividad enzimática de la lipasa Calc B.
- Actividad enzimática de la Cutinasa 2P.
- Resultados de los ensayos con PET.

### ***7.1 PREPARACIÓN PATRONES DE REFERENCIA***

En este apartado se analizan los resultados y observaciones encontradas al aplicar los patrones de referencia tanto en la dilución buffer Tris-HCl y PBS. Para tener en cuenta si el parámetro tiempo afecta a los resultados, se realizaron diversos patrones de referencia para distintos días. Las curvas de los patrones de ambas disoluciones buffer fueron las siguientes:

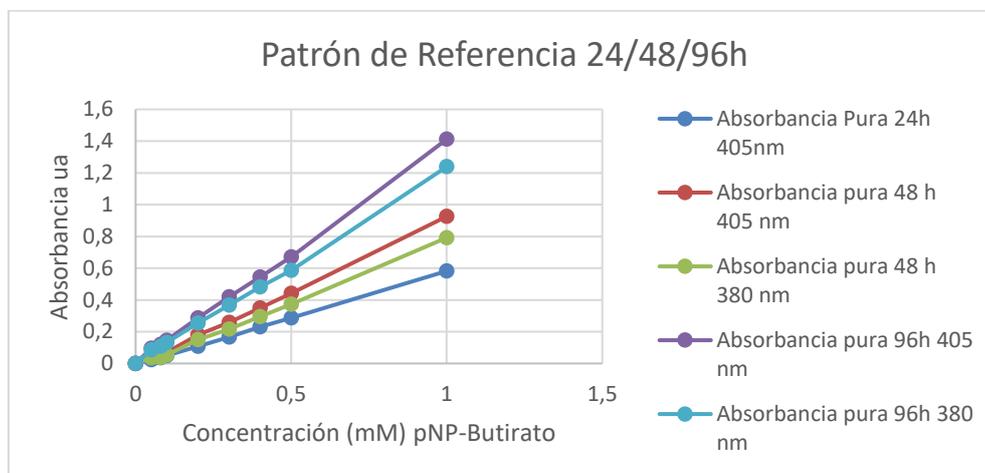


Figura 57: Patrón de referencia 24/48/96h del medio Tris-HCl

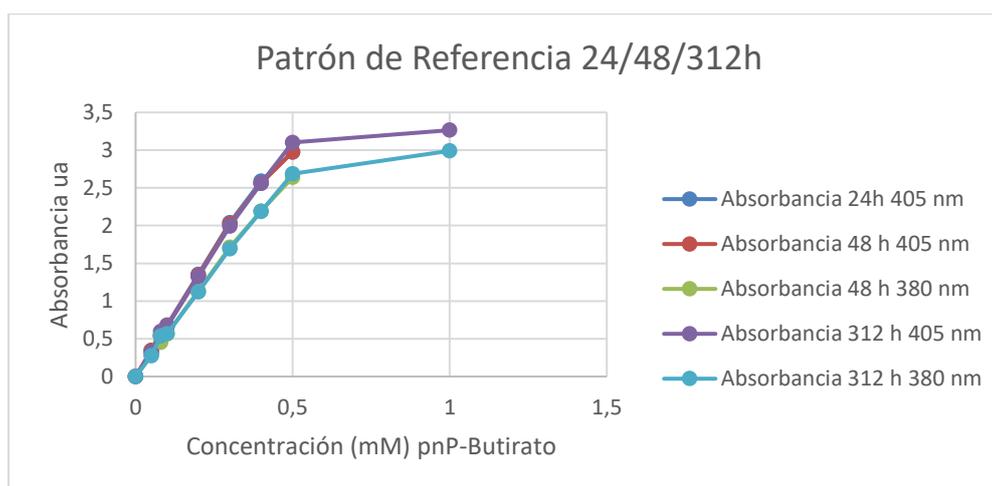


Figura 58: Patrón de referencia 24/48/312h del medio PBS

Tal y como se valoró previamente en el capítulo 5 (apartado 5.3 “Calibración del espectrofotómetro Spectroquant”) la longitud de onda 405 nm es la adecuada para la medición de la muestra con el sustrato de referencia pNPB.

En coherencia con lo observado en la Figura 57, se comprueba que en la dilución buffer Tris-HCl preparada con una concentración de 12 mM, a medida que pasa el tiempo la absorbancia aumenta, este aumento también afecta a las absorbancias de las disoluciones de las concentraciones 0,05-0,5 Mm. Este aumento de las absorbancias no se apreció en las curvas patrón del buffer PBS realizándose en distintos días sin apreciarse variación de absorbancia.

## **7.2 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA LIPASA CALC B**

En este apartado, enfocado en los ensayos de la lipasa B, se muestra las curvas patrón preparadas para cada medio buffer, se analiza los resultados, así como se indican los cálculos realizados para la obtención de los parámetros de la cinética enzimática ( $v_{max}$  y  $K_m$ ). La forma de obtención de las curvas patrón se muestra en el capítulo 5, apartado 5.3.5 “Diseño de los patrones”, mientras que los cálculos mostrados para la obtención de los parámetros de la cinética enzimática siguen el procedimiento indicado en el capítulo 5, apartado 5.3.6 “Análisis de las medidas ejemplo lipasa B duplicando la cantidad de enzima en medio Tris-HCl”.

## 7.2.1 PATRONES DE REFERENCIA DE LOS ENSAYOS

### 7.2.1.1 Patrón de referencia disolución Tris-HCl

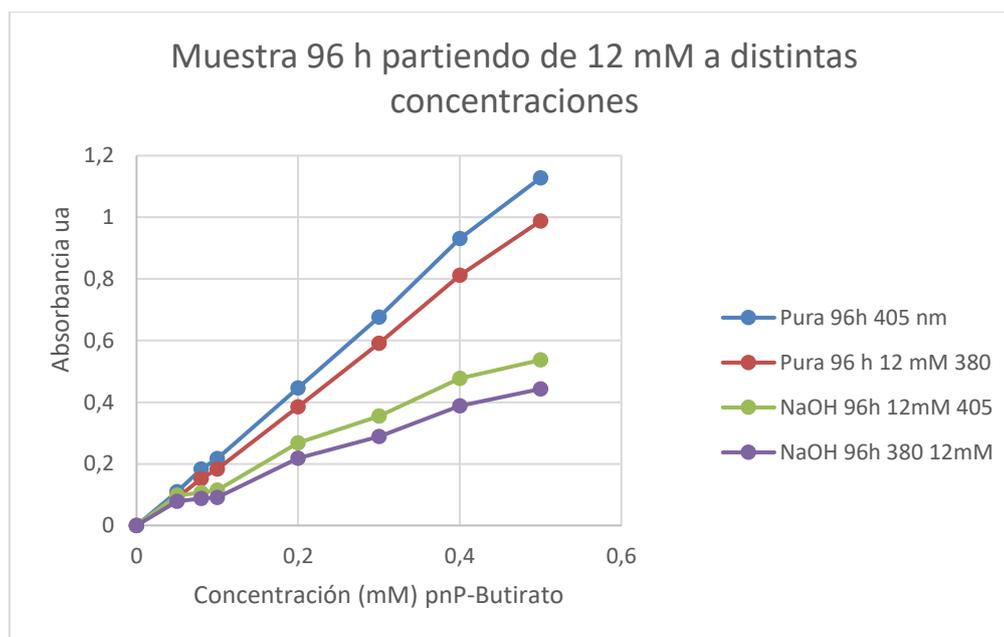


Figura 59: Patrón de referencia para la acción enzimática lipasa B medio Tris-HCl

### 7.2.1.2 Patrón de referencia disolución PBS

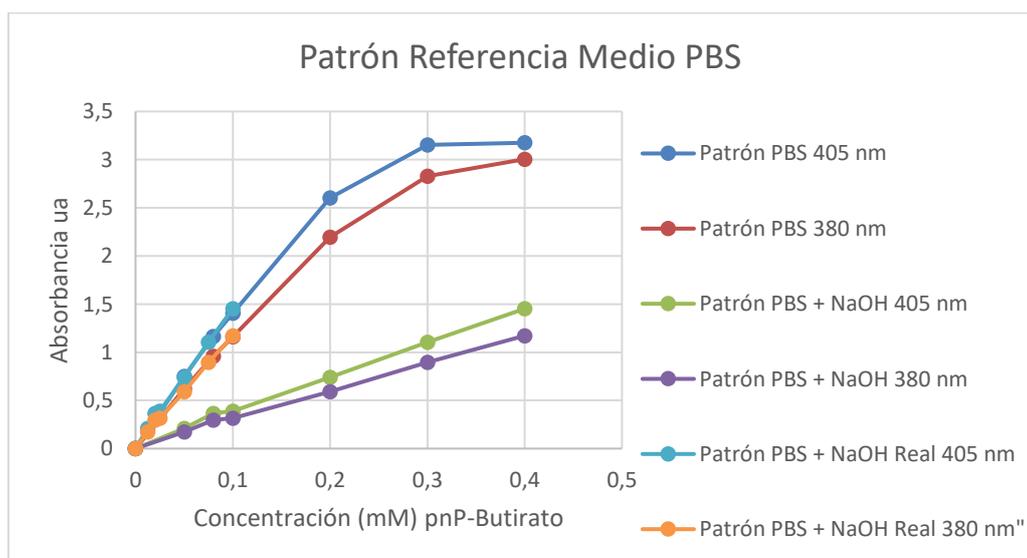


Figura 60: Patrón de referencia para la acción enzimática lipasa B medio PBS

## 7.2.2 ENSAYOS DISOLUCIÓN TRIS-HCl

### 7.2.2.1 Ensayos realizados a 55° C

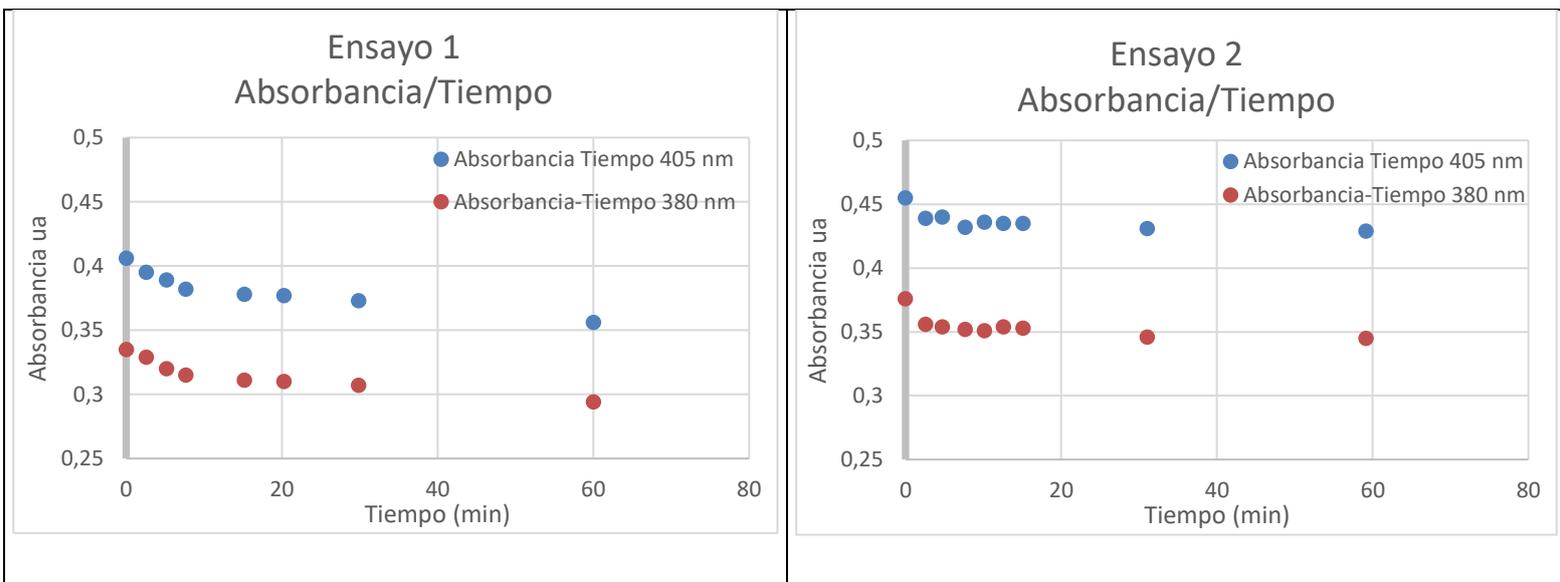


Figura 61: Gráficas absorbancia/tiempo de los ensayos de Lipasa B a 55 °C en medio Tris-HCl

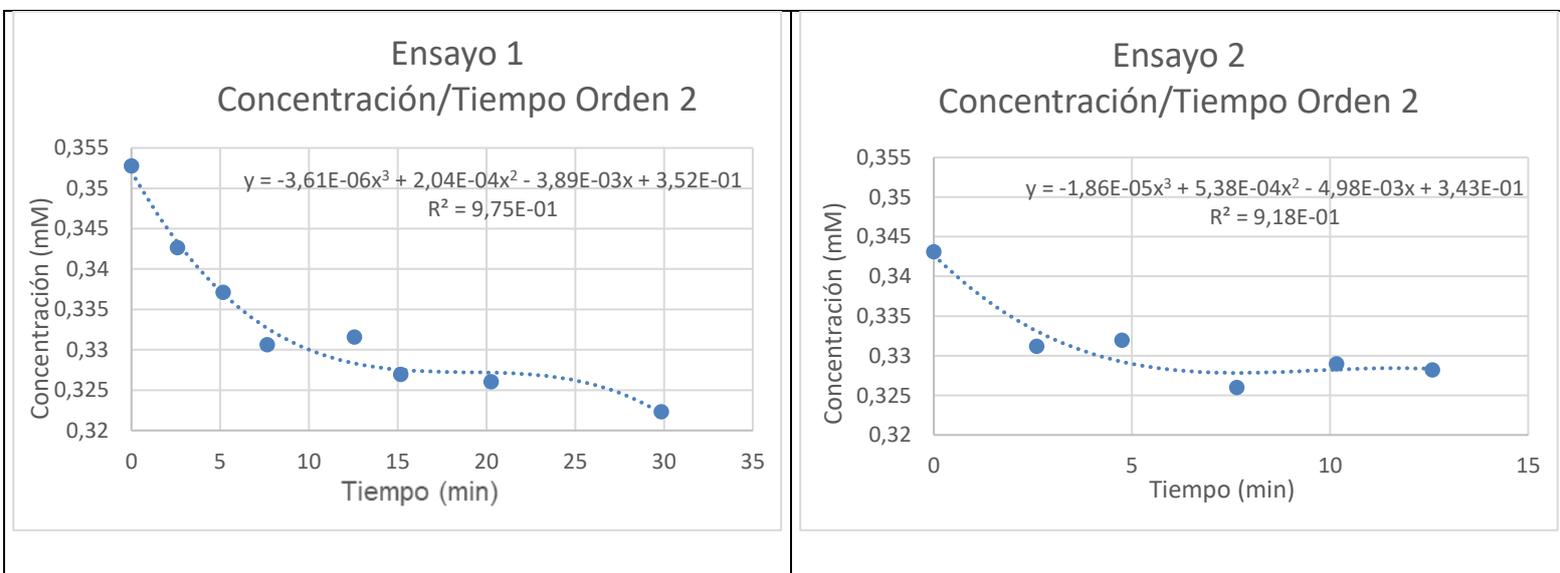


Figura 62: Gráficas concentración/tiempo de los ensayos de lipasa B a 55 °C en medio Tris-HCl

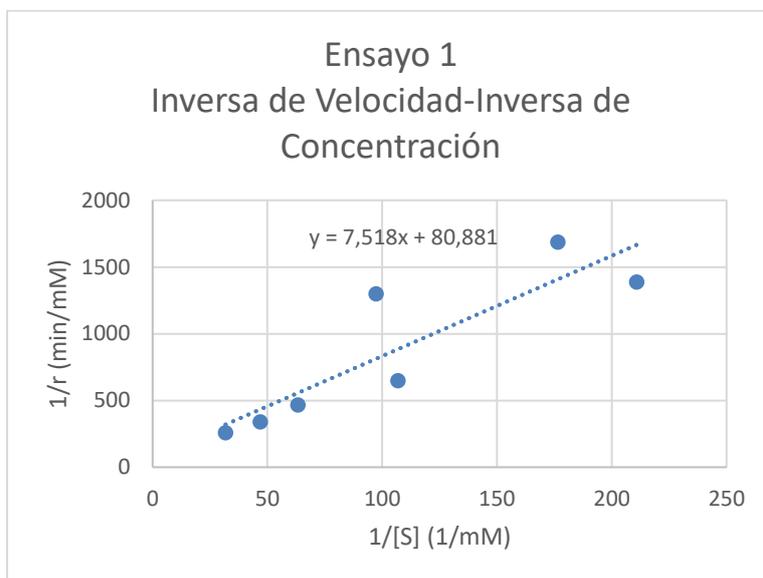


Figura 63: Gráfica inversa de velocidad/inversa de concentración del ensayo 1 de lipasa B a 55 °C en medio Tris-HCl

La gráfica presenta en los ejes tanto la inversa de la velocidad como la inversa de la concentración, esto permite aplicar la linealización de las dobles inversas de Lineaweaver-Burk, explicado en el capítulo 3 apartado 3.4.1, y obtener los parámetros de la cinética enzimática ( $v_{max}$  y  $K_m$ ) tal y como se define en la ecuación 8. Como ejemplo se ha desarrollado los cálculos para obtener los parámetros del ensayo 1 con la enzima lipasa B a 55 °C en medio Tris-HCl. Este procedimiento se aplica a todos los ensayos realizados en esta fase del proyecto. En este mismo capítulo, en el apartado “Resumen y análisis de los resultados de la actividad enzimática”, se recopilan los parámetros de la cinética enzimática de todos los ensayos.

$$y = 7,518x + 80,881$$

$$v_{max} = \frac{1}{80,881} = 0,012 \frac{\text{mM}}{\text{min}} \quad (42)$$

$$K_m = 7,518 * 0,012 = 0,092 \text{ mM} \quad (43)$$

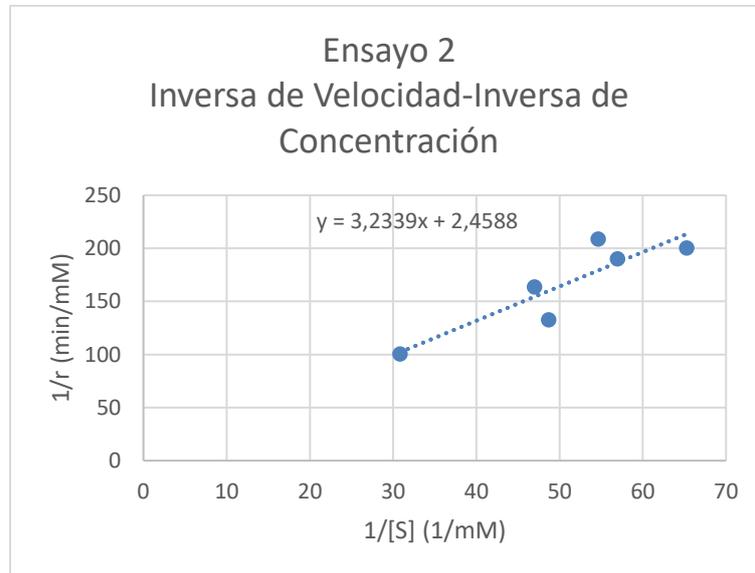


Figura 64: Gráfica inversa de velocidad/inversa de concentración del ensayo 2 de lipasa B a 55 °C en medio

### 7.2.2.2 Ensayos realizados a 37°C

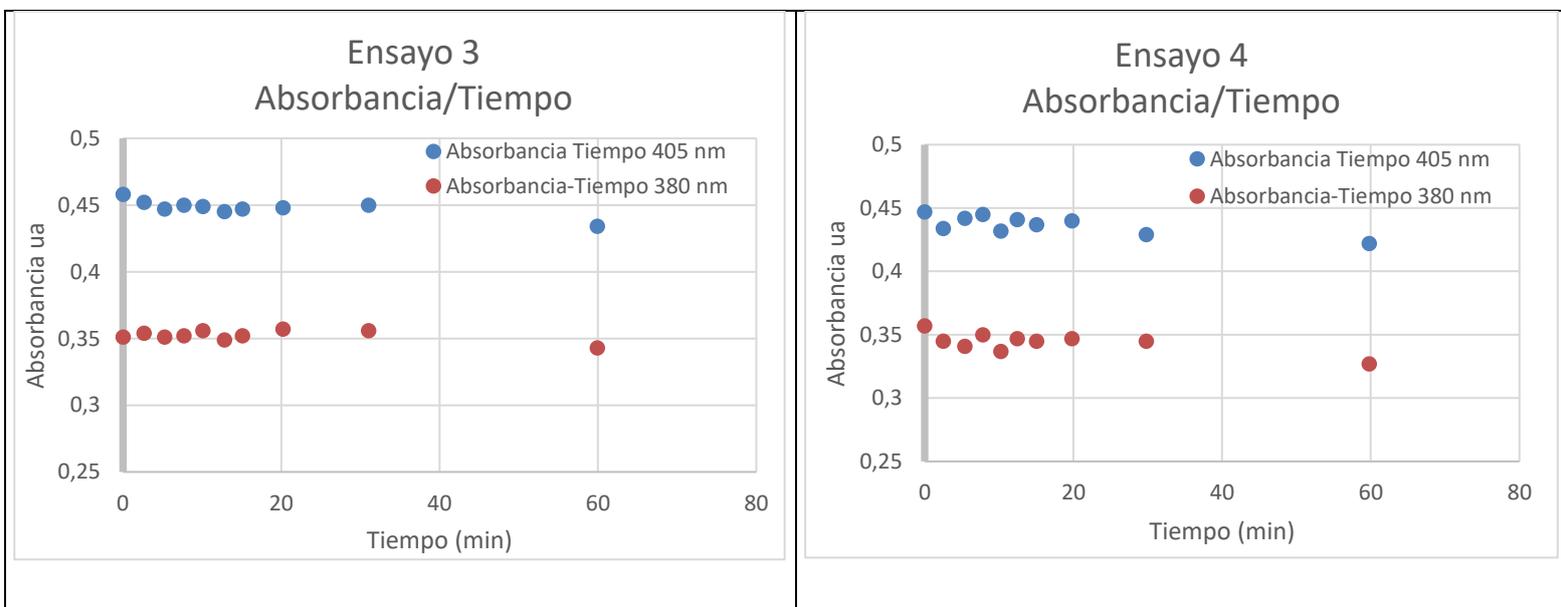


Figura 65: Gráficas absorbancia/tiempo de los ensayos de lipasa B a 37 °C en medio Tris-HCl

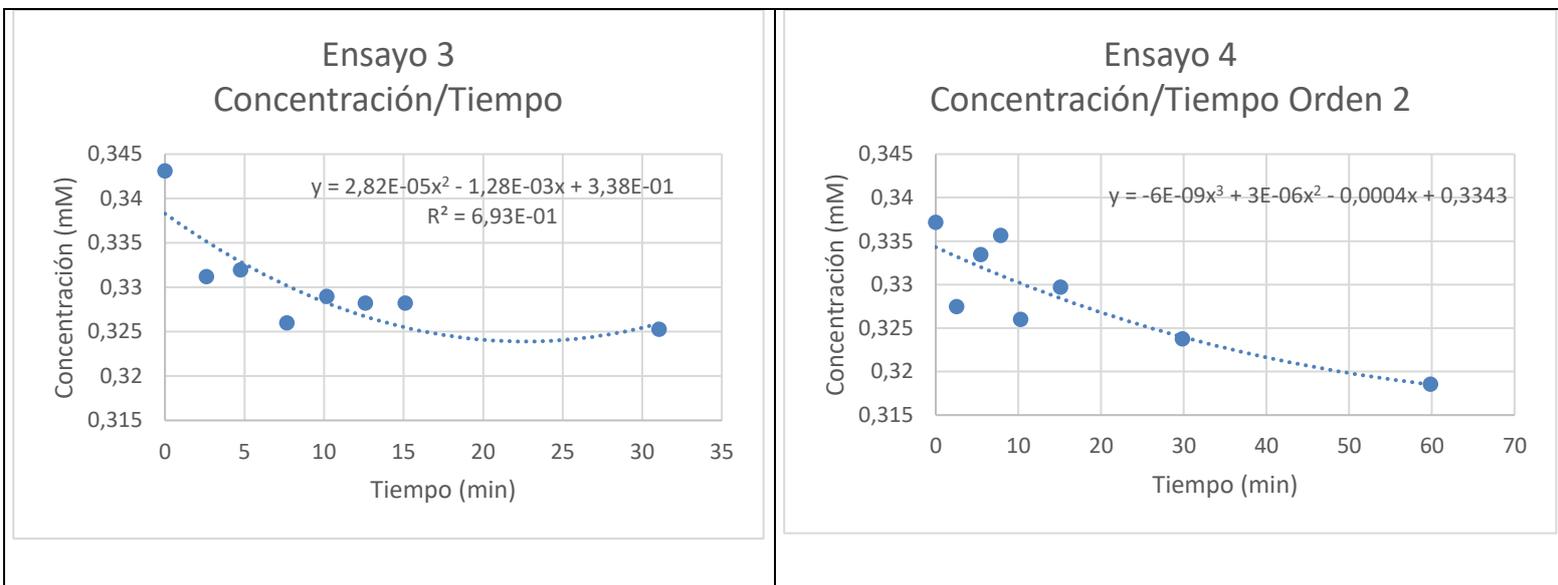


Figura 66: Gráficas concentración/tiempo de los ensayos de lipasa B a 37° C en medio Tris-HCl

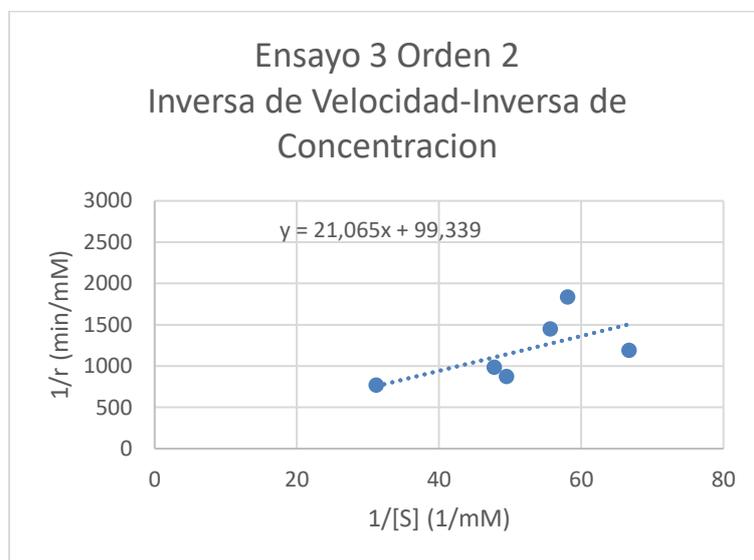


Figura 67: Gráfica inversa de velocidad/inversa de concentración del ensayo 3 de lipasa B a 37 °C en medio Tris-HCl

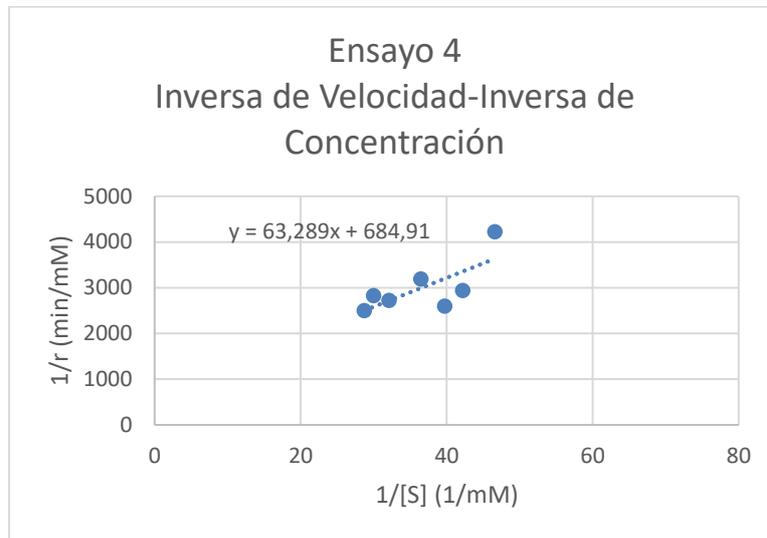


Figura 68: Gráfica inversa de velocidad/inversa de concentración del ensayo 4 de lipasa B a 37 °C en medio Tris-HCl

## 7.2.3 ENSAYOS DISOLUCIÓN PBS

### 7.2.3.1 Ensayos realizados a 55°C

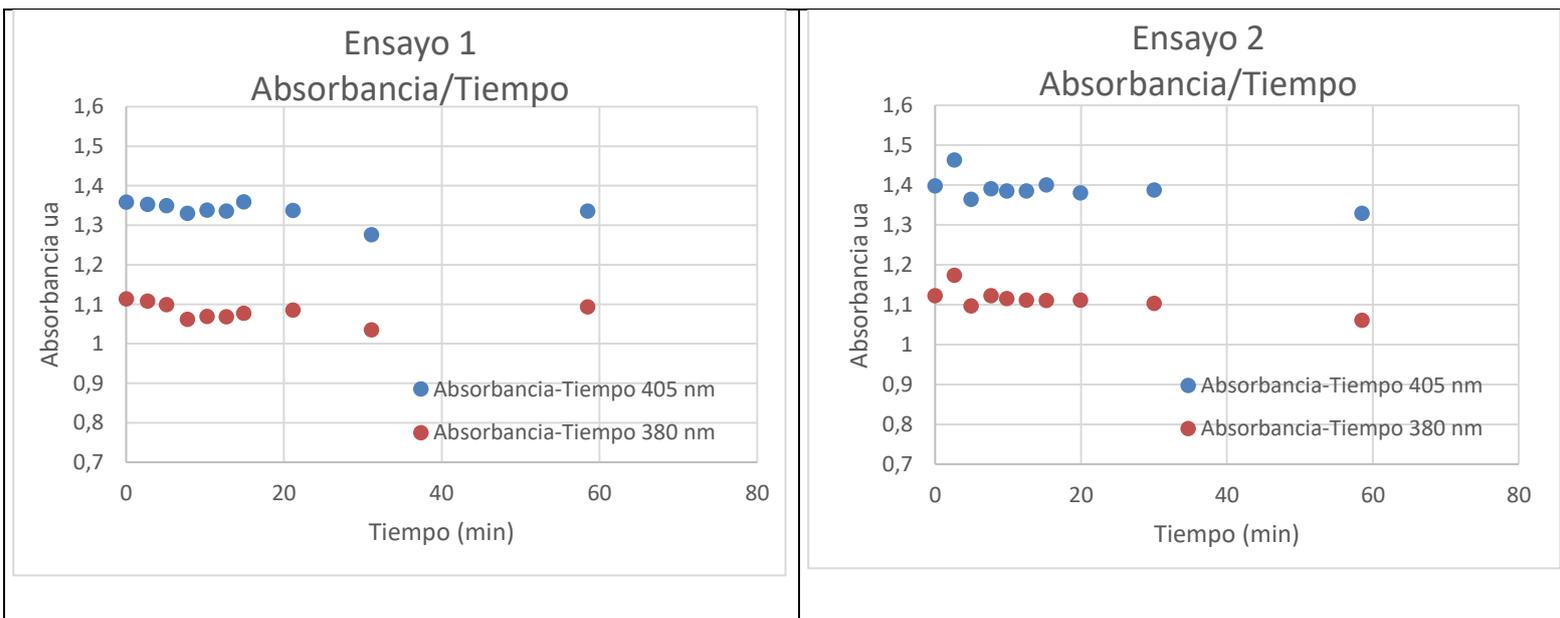


Figura 69: Gráficas absorbancia/tiempo de los ensayos de lipasa B a 55° C en medio PBS

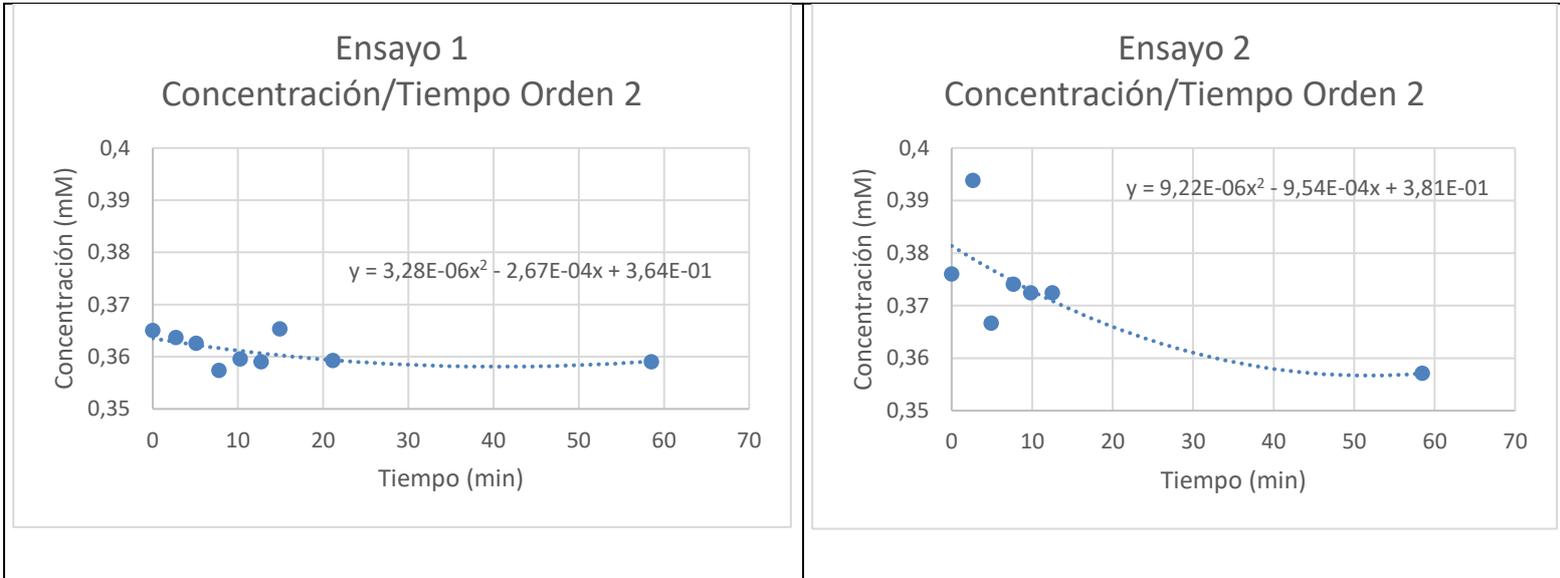


Figura 70: Gráficas concentración/tiempo de los ensayos de lipasa B a 55° C en medio PBS

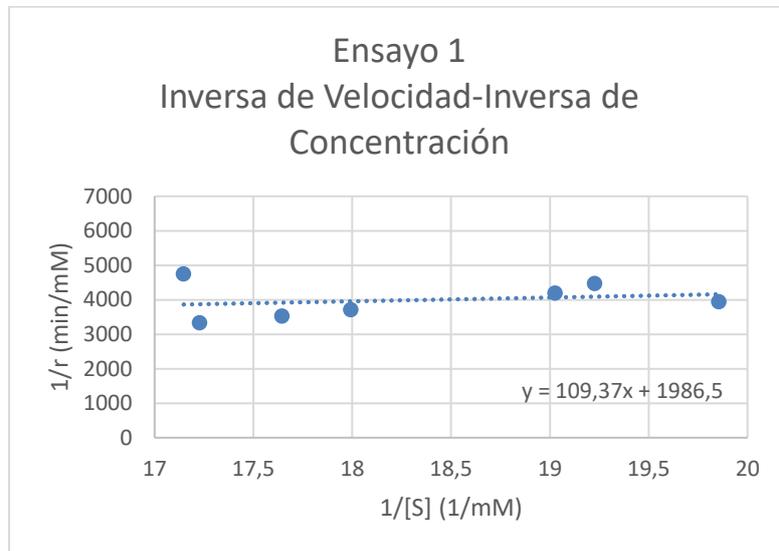


Figura 71: Gráfica inversa de velocidad/inversa de concentración del ensayo 1 de lipasa B a 55 °C en medio PBS

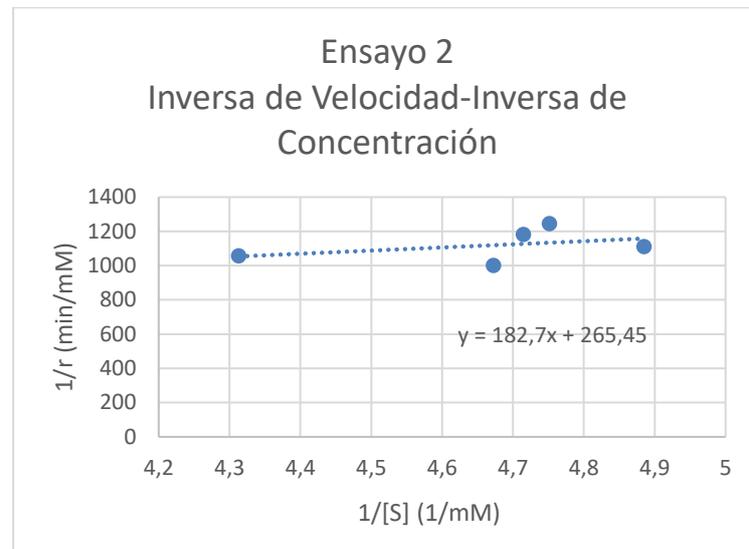


Figura 72: Gráfica inversa de velocidad/inversa de concentración del ensayo 2 de lipasa B a 55 °C en medio PBS

7.2.3.2 Ensayos realizados a 37°C

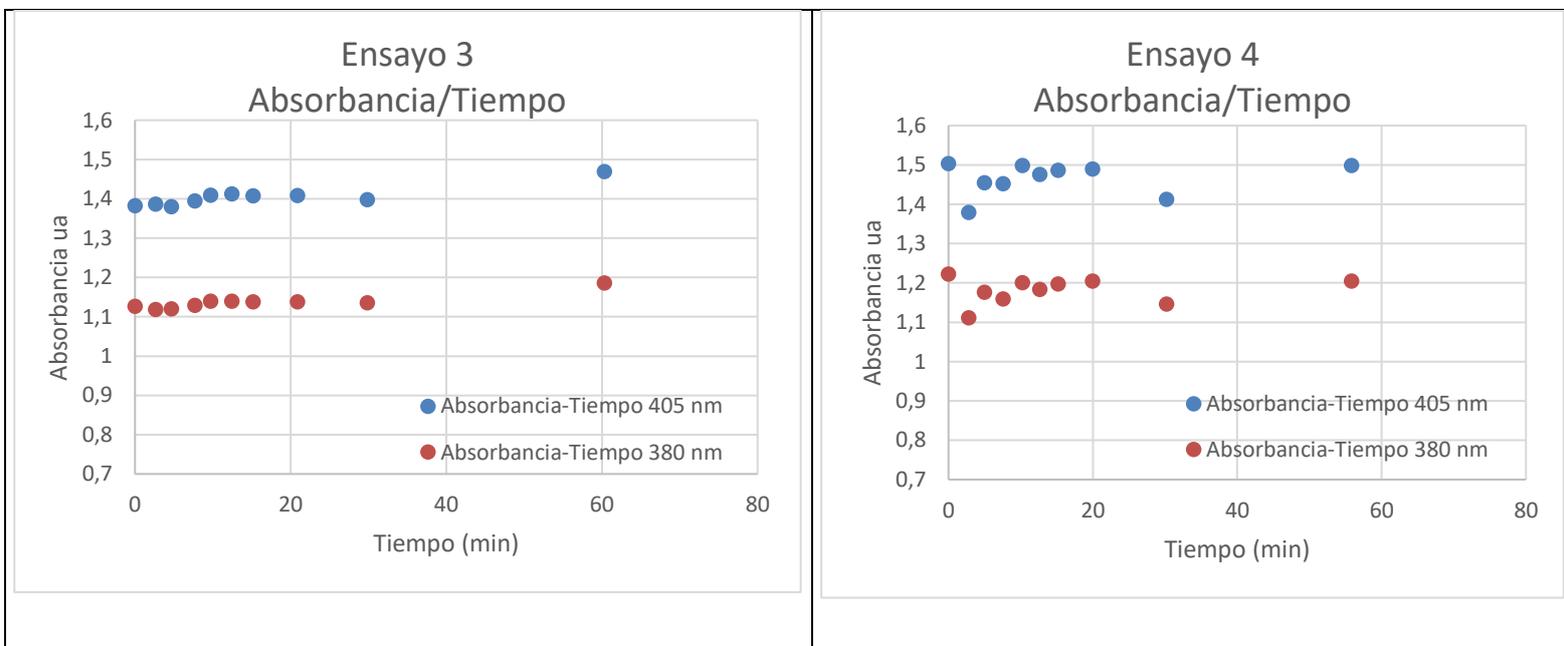


Figura 73: Gráficas absorbancia/tiempo de los ensayos de lipasa B a 37 °C en medio PBS

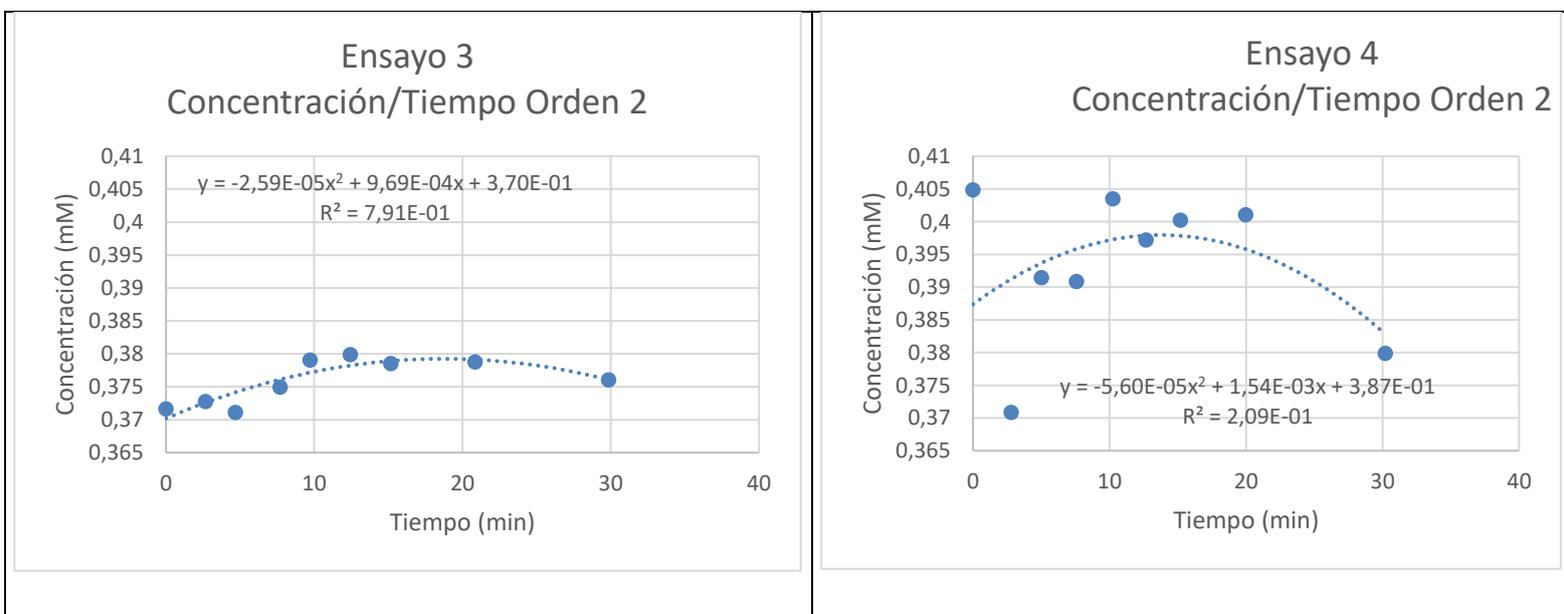


Figura 74: Gráficas concentración/tiempo de los ensayos de lipasa B a 37 °C en medio PBS

Las gráficas concentración/tiempo mostradas previamente demuestran que la enzima no está teniendo efecto en el sustrato no pudiéndose continuar con el estudio para obtener los parámetros de la actividad enzimática.

### **7.3 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CUTINASA 2P**

En este apartado, enfocado en los ensayos de la cutinasa 2P, se muestra las curvas patrón preparadas para cada medio buffer, se analiza los resultados, así como se indican los cálculos realizados para la obtención de los parámetros de la cinética enzimática ( $v_{max}$  y  $K_m$ ). La forma de obtención de las curvas patrón se muestra en el capítulo 5, apartado 5.3.5 “Diseño de los patrones”, mientras que los cálculos mostrados para la obtención de los parámetros de la cinética enzimática siguen el procedimiento indicado en el capítulo 5, apartado 5.3.6 “Análisis de las medidas ejemplo lipasa B duplicando la cantidad de enzima en medio Tris-HCl”.

### 7.3.1 PATRONES DE REFERENCIA DE LOS ENSAYOS

#### 7.3.1.1 Patrón de referencia disolución Tris-HCl

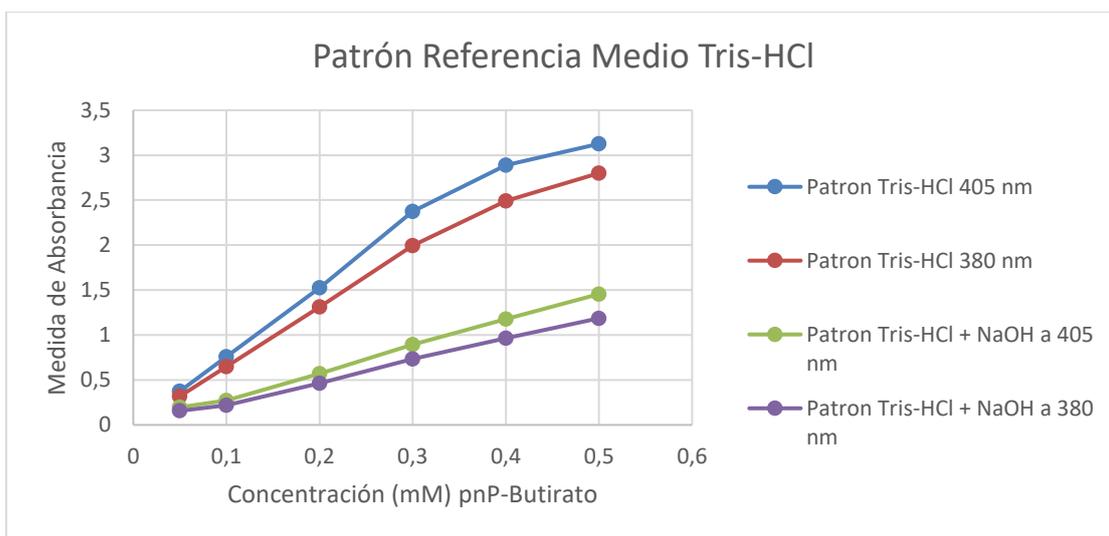


Figura 75: Patrón de referencia para la acción enzimática cutinasa 2P medio Tris-HCl

#### 7.3.1.2 Patrón de referencia disolución PBS

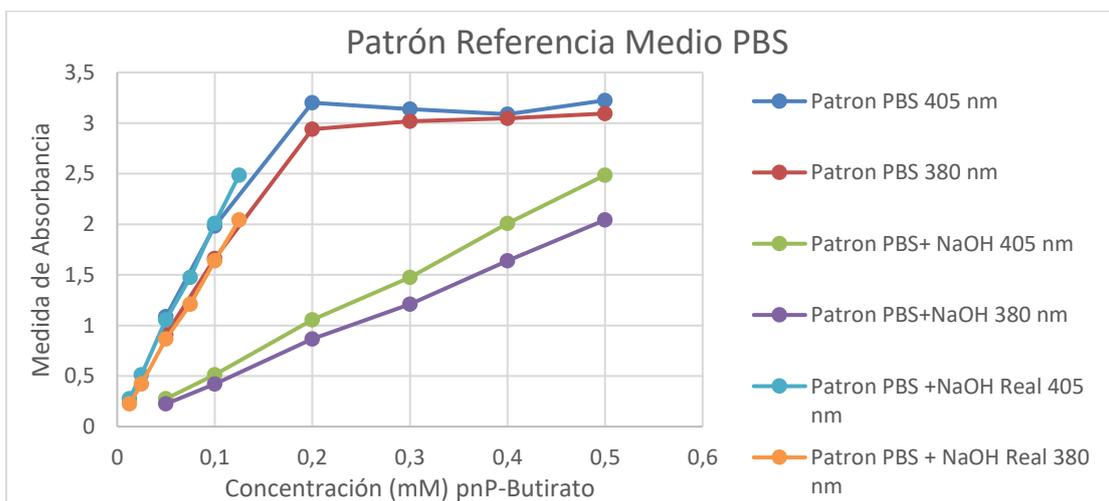


Figura 76: Patrón de referencia para la acción enzimática cutinasa 2P medio PBS

## 7.3.2 ENSAYOS DISOLUCIÓN TRIS-HCl

### 7.3.2.1 Ensayos realizados a 55° C

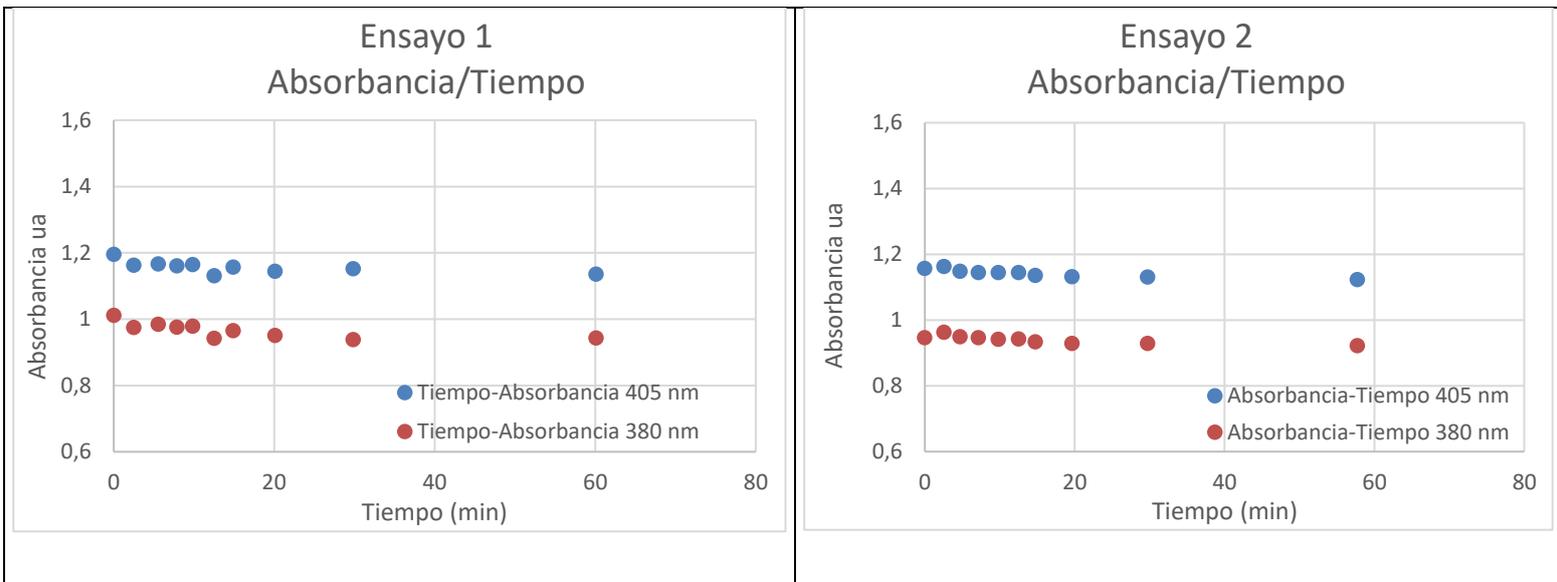


Figura 77: Gráficas absorbancia/tiempo de los ensayos de cutinasa 2P a 55 °C en medio Tris-HCl

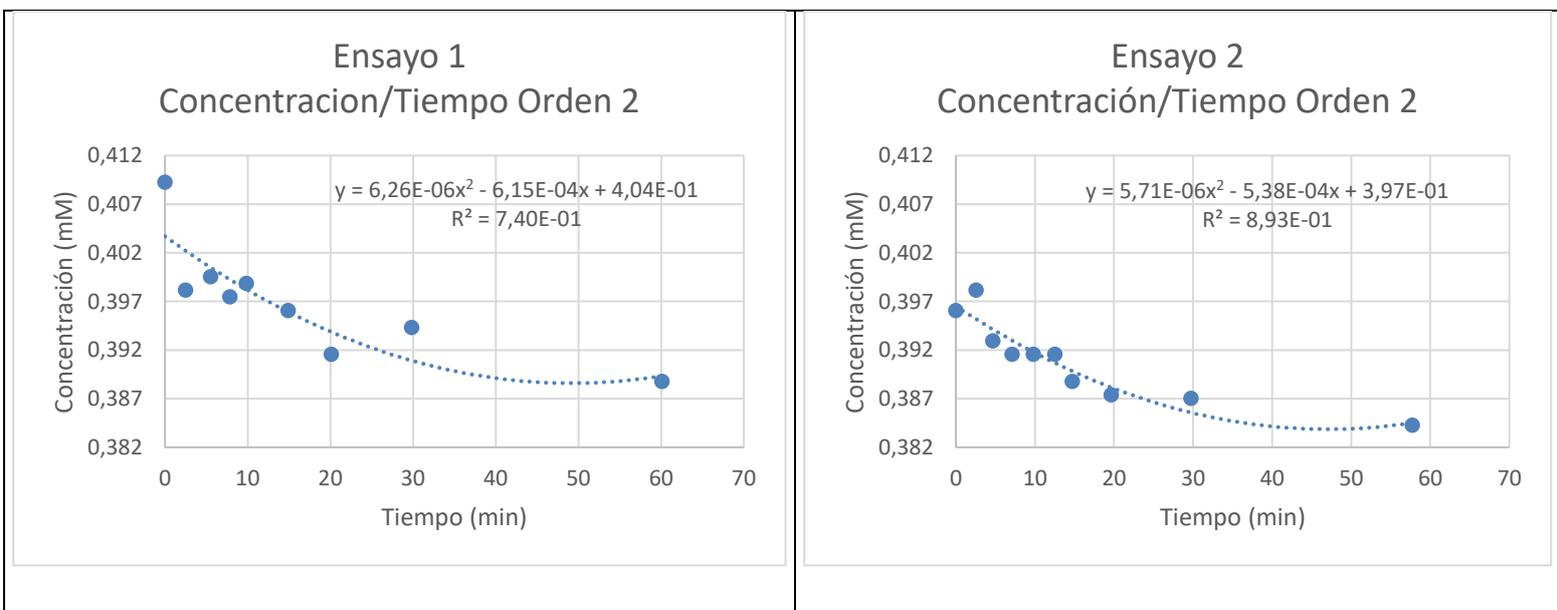


Figura 78: Gráficas concentración/tiempo de los ensayos de cutinasa 2P a 55 °C en medio Tris-HCl

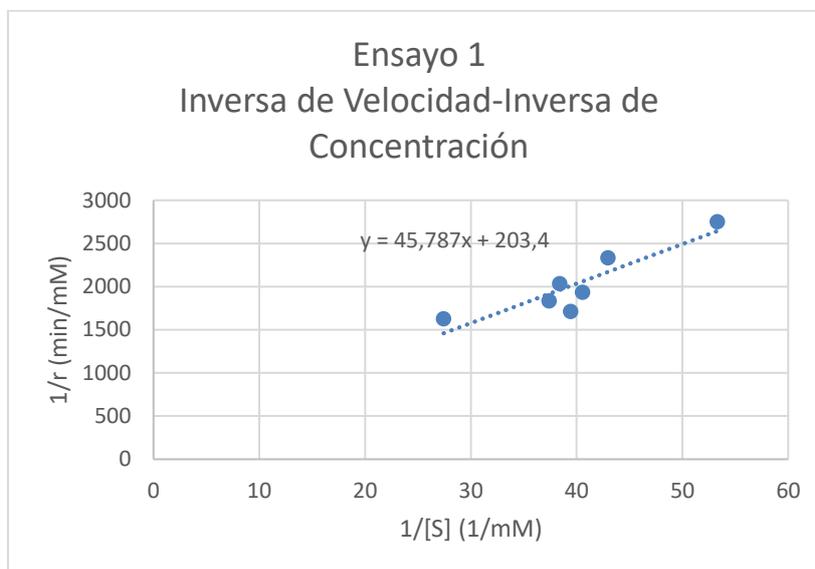


Figura 79: Gráfica inversa de velocidad/inversa de concentración del Ensayo 1 de cutinasa 2P a 55 °C en medio Tris-HCl

La gráfica de la figura 79 presenta en los ejes tanto la inversa de la velocidad como la inversa de la concentración, esto permite aplicar la linealización de las dobles inversas de Lineaweaver-Burk, explicado en el capítulo 3 apartado 3.4.1, y obtener los parámetros de la cinética enzimática ( $v_{max}$  y  $K_m$ ) tal y como se define en la ecuación 8. Como ejemplo se ha desarrollado los cálculos para obtener los parámetros del ensayo 1 con la enzima lipasa B a 55 °C en medio Tris-HCl. Este procedimiento se aplica a todos los ensayos realizados con la enzima cutinasa. En este mismo capítulo, en el apartado “Resumen y análisis de los resultados de la actividad enzimática”, se recopilan los parámetros de la cinética enzimática de todos los ensayos.

$$y = 45,787x + 203,4$$

$$v_{max} = \frac{1}{203,4} = 4,916 * 10^{-3} \frac{\text{mM}}{\text{min}} \quad (44)$$

$$K_m = 45,787 * 4,916 * 10^{-3} = 0,225 \text{ mM} \quad (45)$$

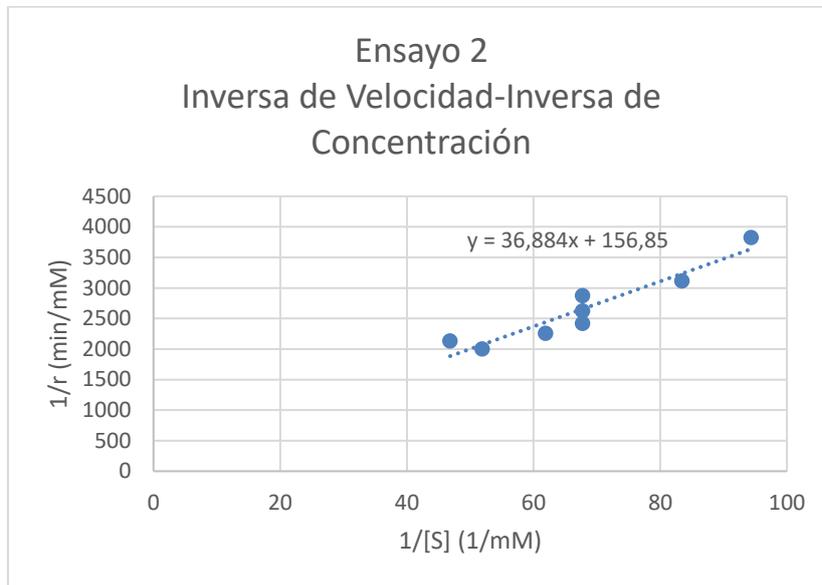


Figura 80: Gráfica inversa de velocidad/inversa de concentración del ensayo 2 de cutinasa 2P a 55 °C en medio Tris-HCl

### 7.3.2.2 Ensayos realizados a 37° C

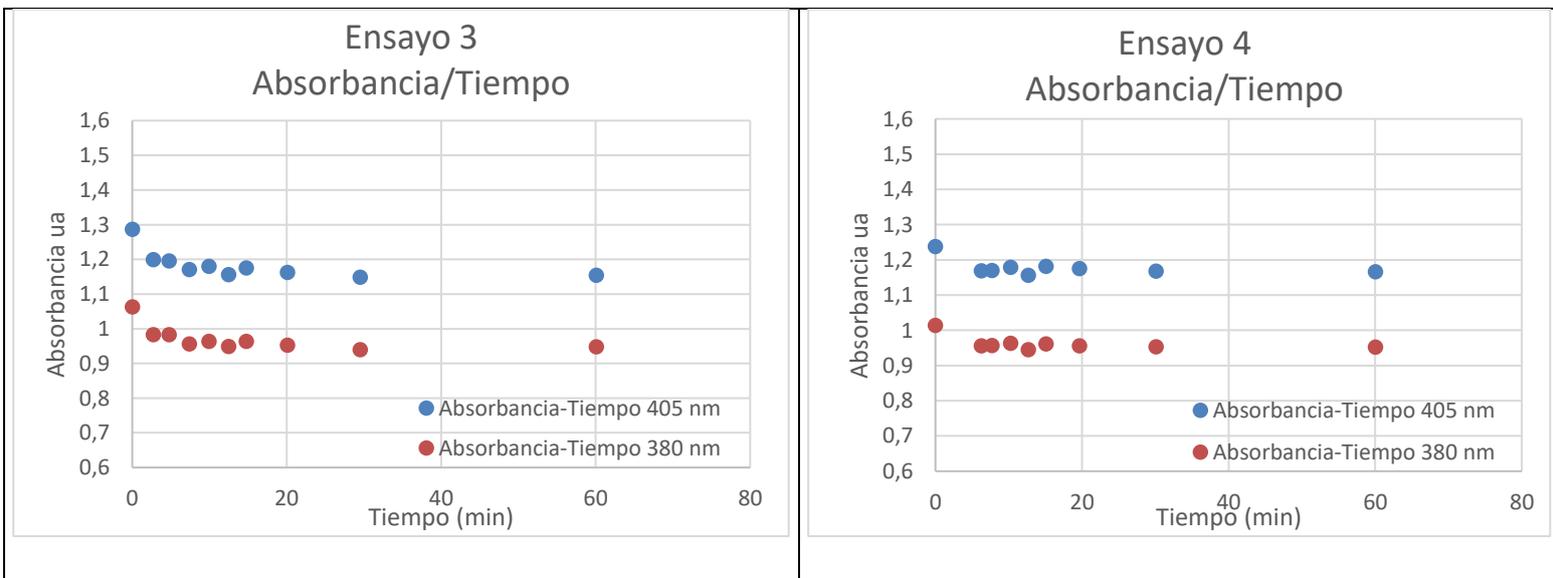


Figura 81: Gráficas absorbancia/tiempo de los ensayos de cutinasa 2P a 37 °C en medio Tris-HCl

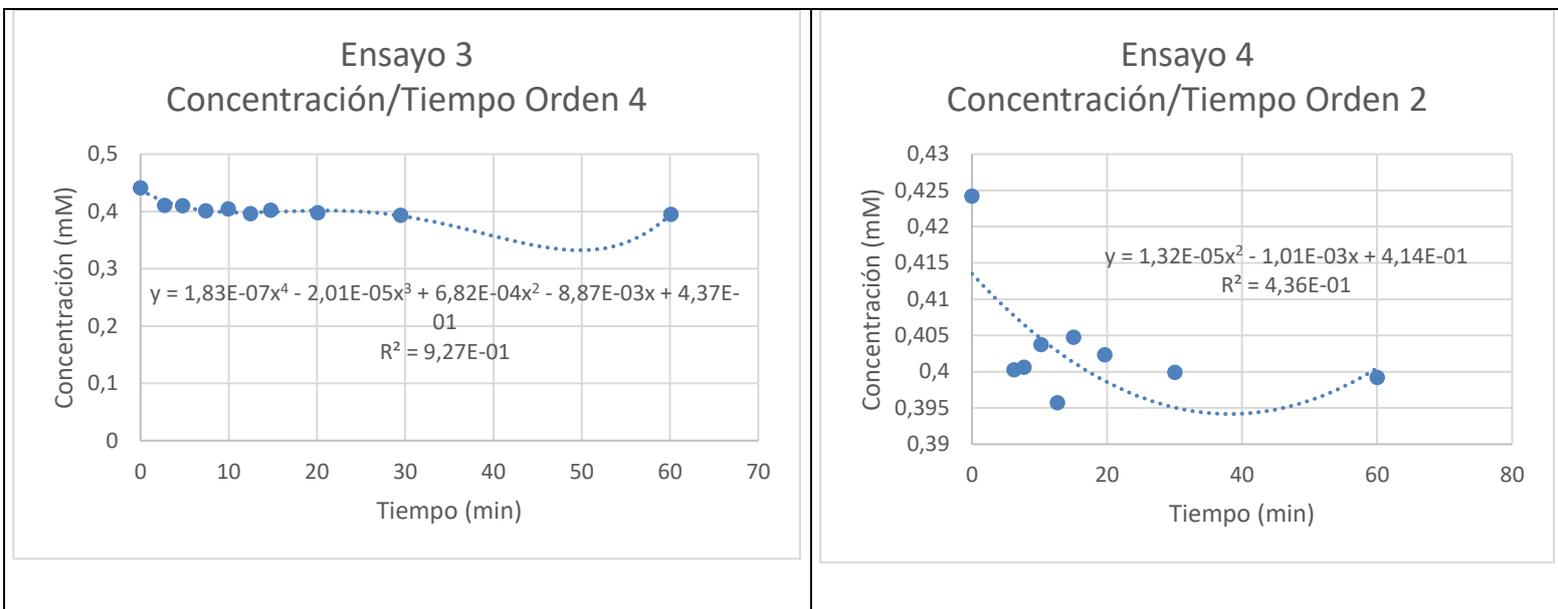


Figura 82: Gráficas concentración/tiempo de los ensayos de cutinasa 2P a 37 °C en medio Tris-HCl

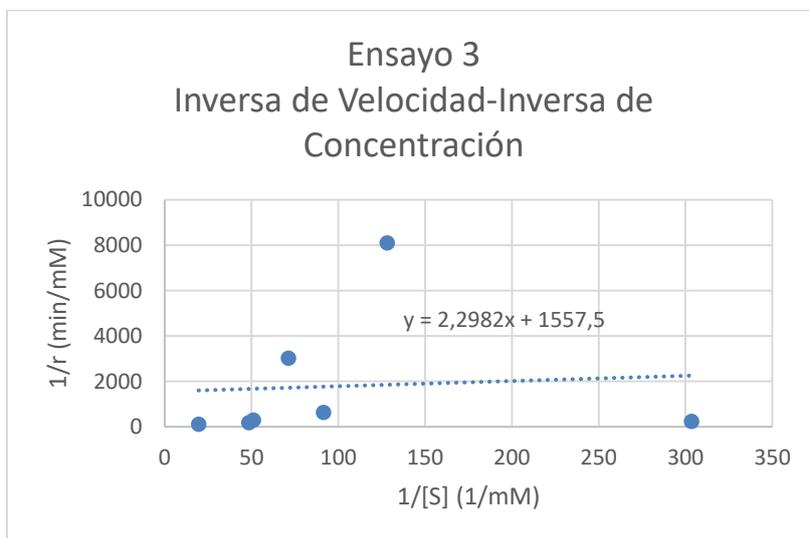


Figura 83: Gráfica inversa de velocidad/inversa de concentración del ensayo 3 de cutinasa 2P a 37 °C en medio Tris-HCl

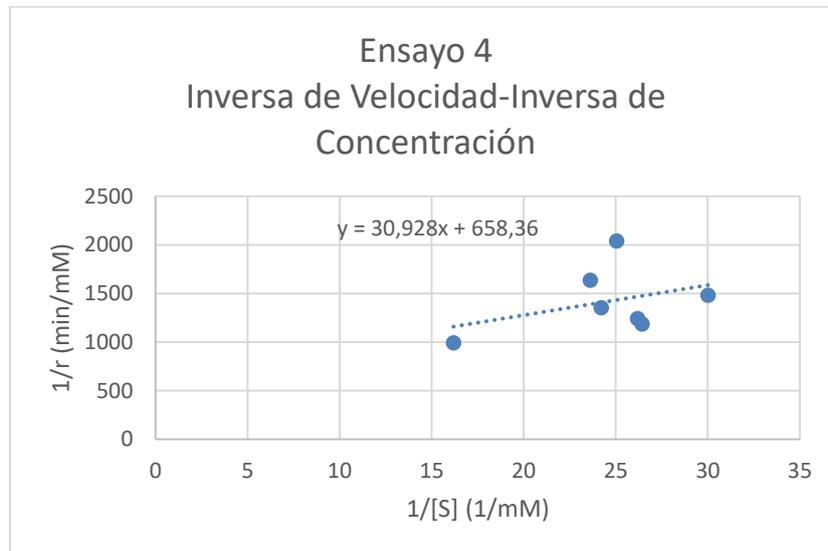


Figura 84: Gráfica inversa de velocidad/inversa de concentración del ensayo 3 de cutinasa 2P a 37° C en medio Tris-HCl

### 7.3.3 ENSAYOS DISOLUCIÓN PBS

#### 7.3.3.1 Ensayos realizados a 55°C

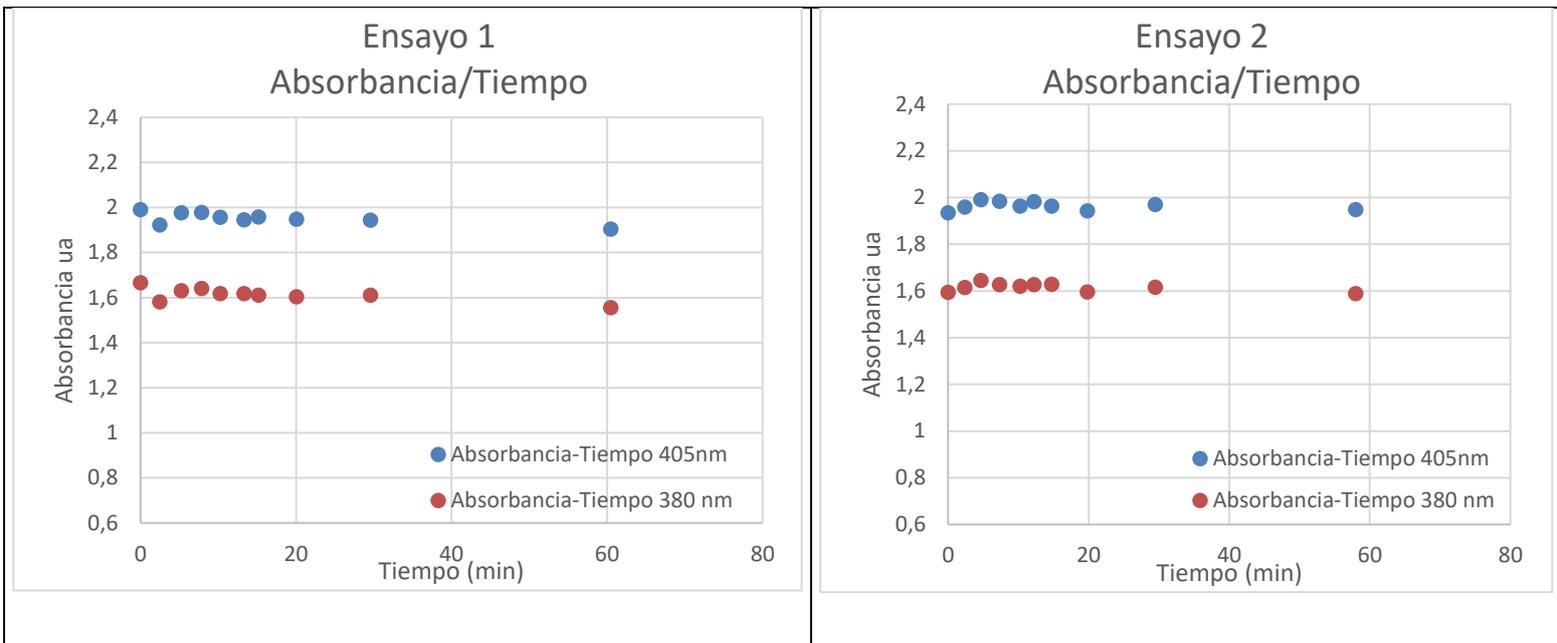


Figura 85: Gráficas Absorbancia/Tiempo de los Ensayos de cutinasa 2P a 55 °C en Medio PBS

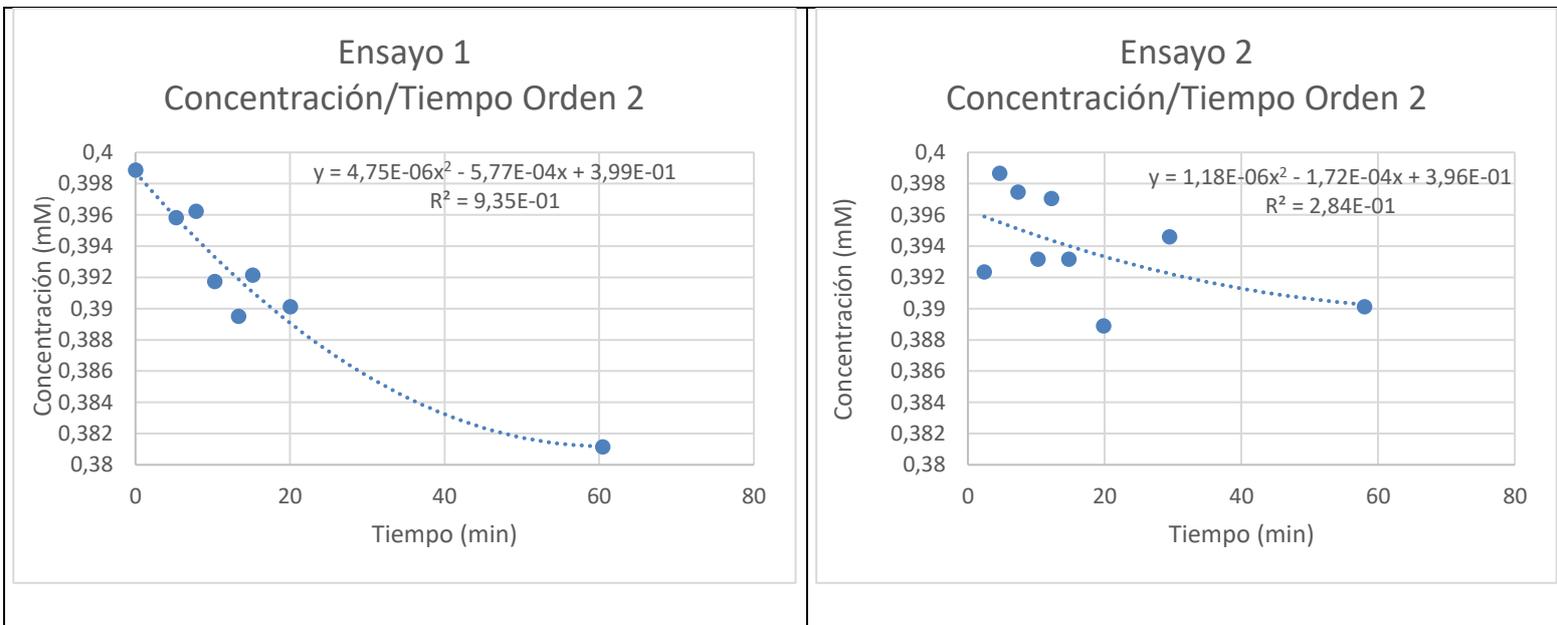


Figura 86: Gráficas absorbancia/tiempo de los ensayos de cutinasa 2P a 55 °C en medio PBS

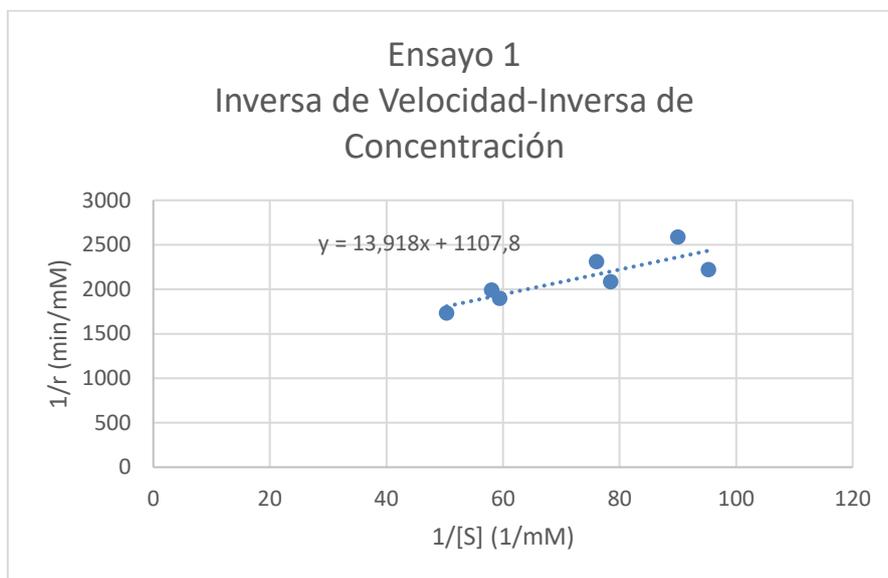


Figura 87: Gráfica inversa de velocidad/inversa de concentración del ensayo 1 de cutinasa 2P a 55 °C en medio PBS

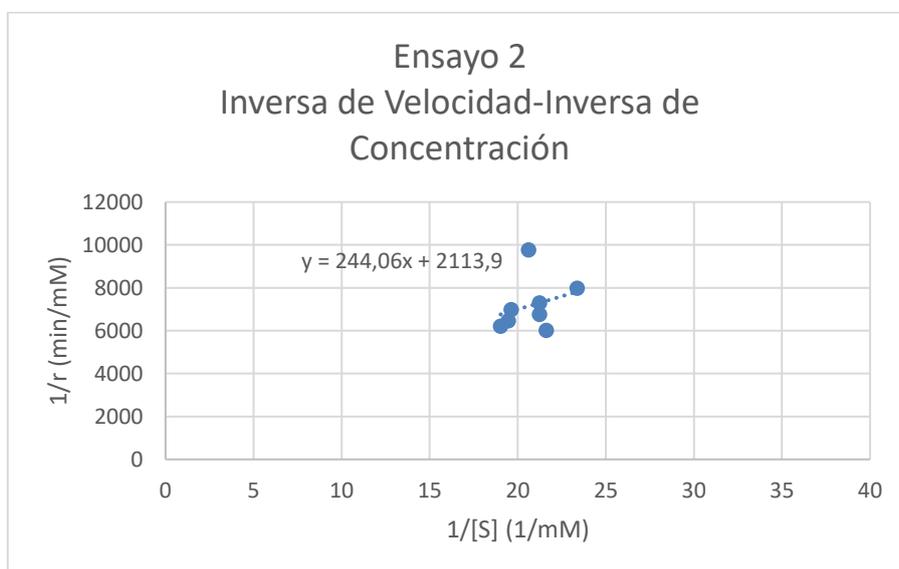


Figura 88: Gráfica inversa de velocidad/inversa de concentración del ensayo 2 de cutinasa 2P a 55 °C en medio PBS

7.3.3.2 Ensayos realizados a 37°C

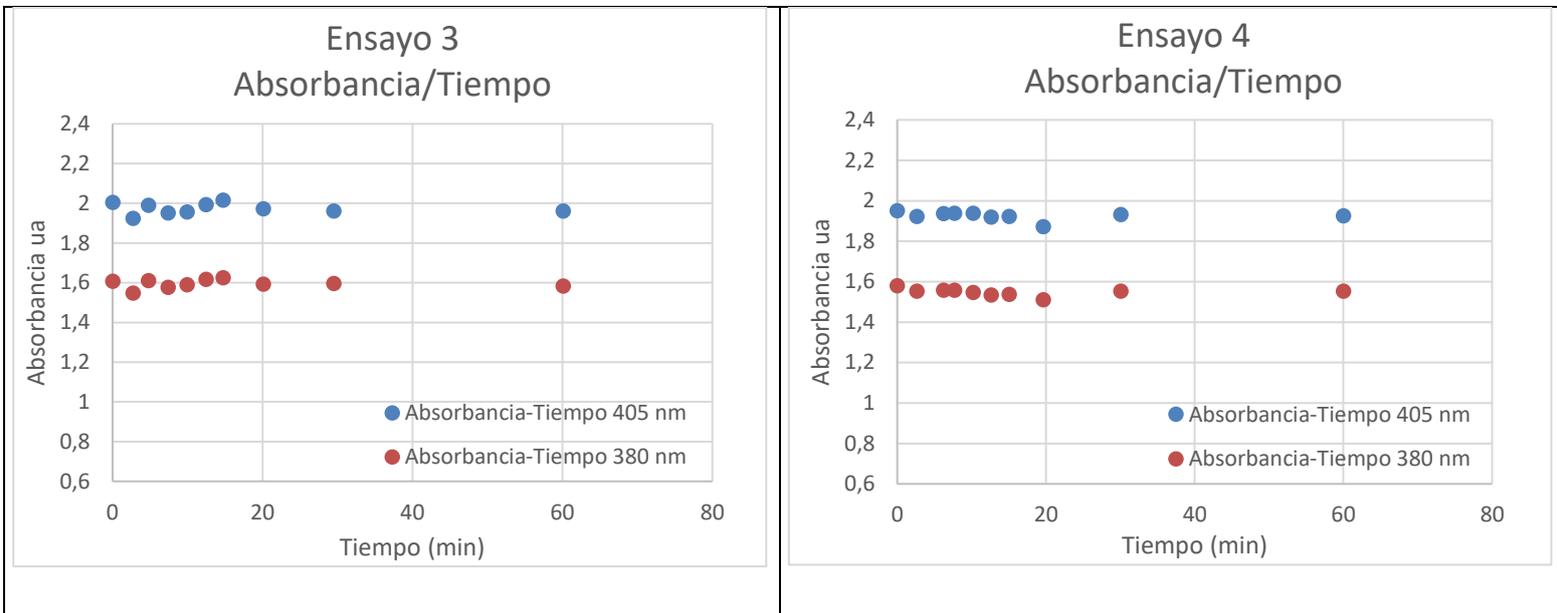


Figura 89: Gráficas absorbancia/tiempo de los ensayos de cutinasa 2P a 37 °C en medio PBS

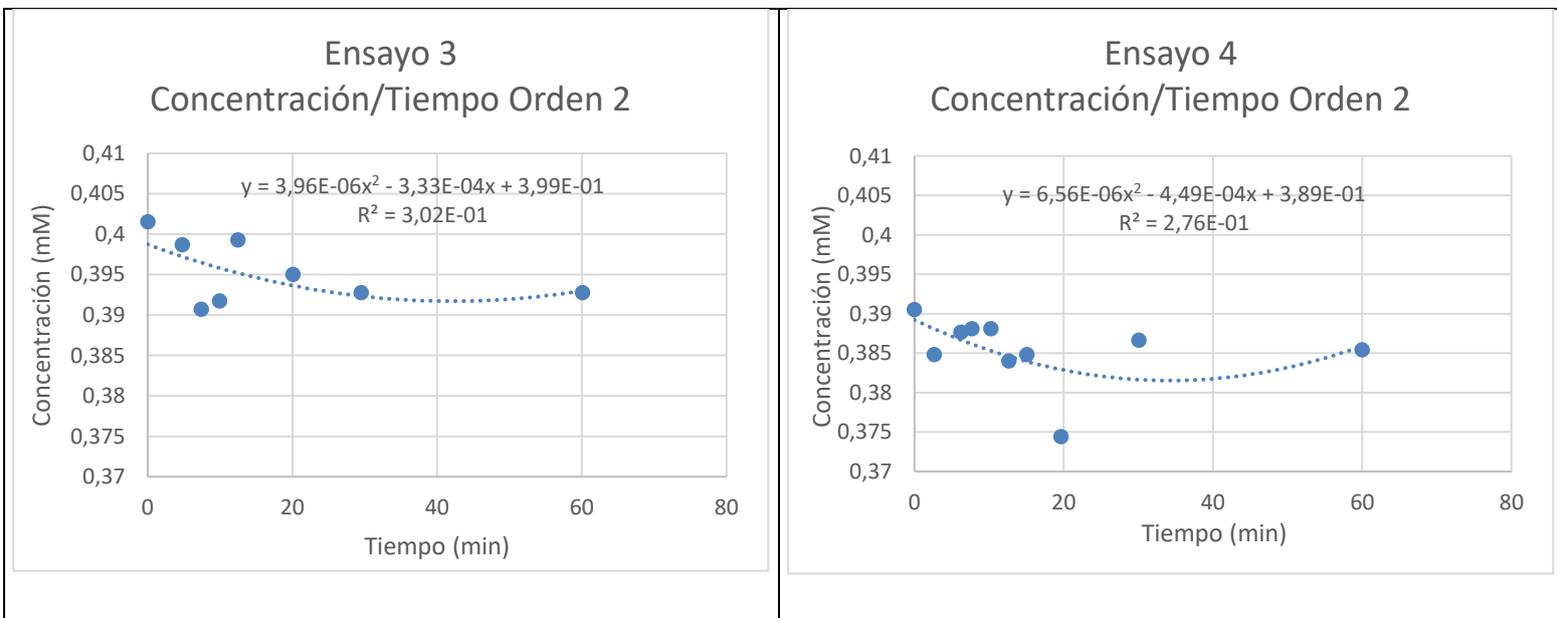


Figura 90: Gráficas absorbancia/tiempo de los ensayos de cutinasa 2P a 37° C en medio PBS

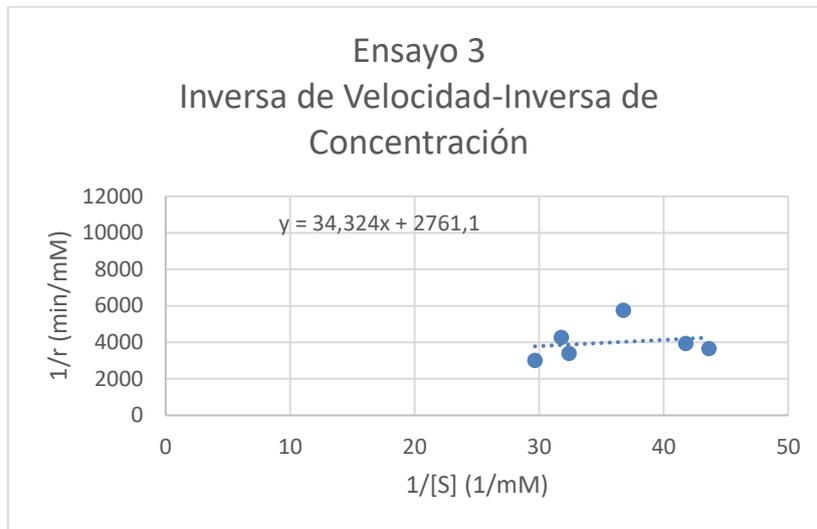


Figura 91: Gráfica inversa de velocidad/inversa de concentración del ensayo 3 de cutinasa 2P a 37° C en medio PBS

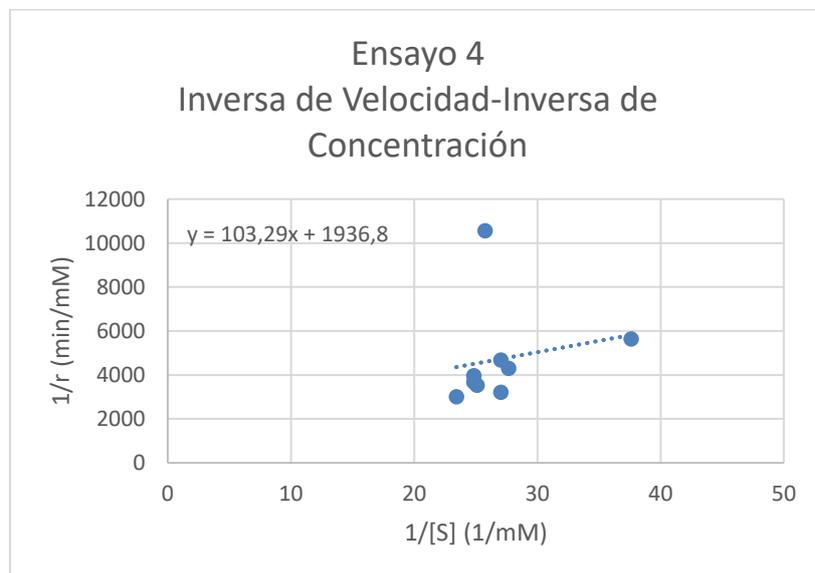


Figura 92: Gráfica inversa de velocidad/inversa de concentración del ensayo 4 de cutinasa 2P a 37° C en medio PBS

## **RESUMEN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA**

En este apartado se recopilan los resultados de los parámetros obtenidos de los apartados 7.2 y 7.3. También se comparan los valores obtenidos en los diversos ensayos analizando y agrupando los diversos resultados.

Tabla 11: Parámetros de la cinética enzimática de los ensayos con una cantidad simple de enzima

Temperatura	Simple concentración de enzima							
	Tris-HCl buffer				PBS buffer			
	Lipasa B		Cutinasa 2P		Lipasa B		Cutinasa 2P	
	v máx. (mM/min)	Km (mM)	v máx. (mM/min)	Km (mM)	v máx. (mM/min)	Km (mM)	v máx. (mM/min)	Km (mM)
55 °C	0,012	0,092	$4,916 \cdot 10^{-3}$	0,225	$5,000 \cdot 10^{-3}$	0,055	$9,020 \cdot 10^{-4}$	0,0125
37 °C	0,003	0,212	$6,420 \cdot 10^{-4}$	$1,475 \cdot 10^{-3}$	-	-	$3,621 \cdot 10^{-4}$	0,0124

Tabla 12: Parámetros de la cinética enzimática de los ensayos con una cantidad doble de enzima

Temperatura	Doble concentración de enzima							
	Tris-HCl buffer				PBS buffer			
	Lipasa B		Cutinasa 2P		Lipasa B		Cutinasa 2P	
	v máx. (mM/min)	Km (mM)	v máx. (mM/min)	Km (mM)	v máx. (mM/min)	Km (mM)	v máx. (mM/min)	Km (mM)
55 °C	0,406	1,315	$6,375 \cdot 10^{-3}$	0,235	$3,700 \cdot 10^{-3}$	0,688	$4,730 \cdot 10^{-4}$	0,115
37 °C	0,001	0,092	$1,518 \cdot 10^{-3}$	0,0469	-	-	$5,163 \cdot 10^{-4}$	0,0533

En las tablas 11 y 12 se observa que las velocidades máximas de ambas enzimas son superiores en los ensayos con el medio buffer Tris-HCl que las que se obtienen en la disolución PBS, incluso habiendo casos donde no se ha registrado actividad de la enzima en el sustrato. En

consecuencia, para la obtención de la mejor actividad enzimática para la degradación del PET, se opta por solo la utilización del buffer Tris-HCl.

Además, cuando la cantidad de enzima aumenta, la velocidad de reacción en los ensayos donde cada enzima se encuentra a su temperatura óptima también experimenta un incremento, permitiendo una mejora de la eficacia de la degradación enzimática a tener en cuenta para los ensayos con sustrato PET.

#### ***7.4 RESULTADOS DE LAS MUESTRAS CON PET***

Con los resultados obtenidos en los ensayos anteriores, se comprueba que el medio Tris-HCl es el adecuado de cara a maximizar la actividad enzimática. En este apartado se muestra el análisis de los MP encontrados tras llevar a cabo los ensayos previamente definidos, analizando y planteando hipótesis para futuros trabajos.

El primer paso ha sido la identificación de las partículas encontradas en los ensayos como PET. Según el análisis empleando microscopía FTIR, y de acuerdo con la base de datos disponibles, se identifican los espectros obtenidos a partir de los principales fragmentos encontrados como PET y restos de celulosa. En las imágenes siguientes se muestran los espectros y las imágenes obtenidos del material PET y de celulosa encontrados en los ensayos.

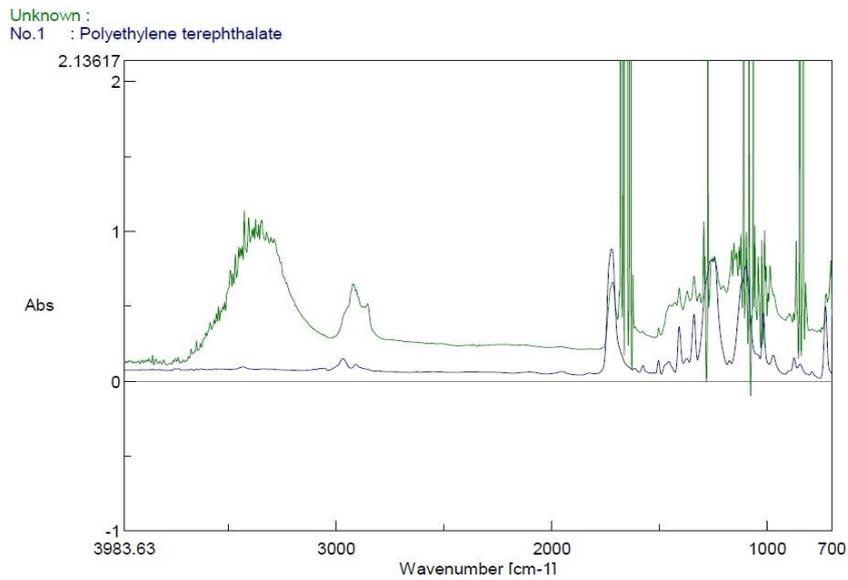


Figura 93: En verde el espectro de la partícula PET analizada en el FTIR y en azul el espectro del PET procedente de la biblioteca de la base de datos con el que se hace la comparación.

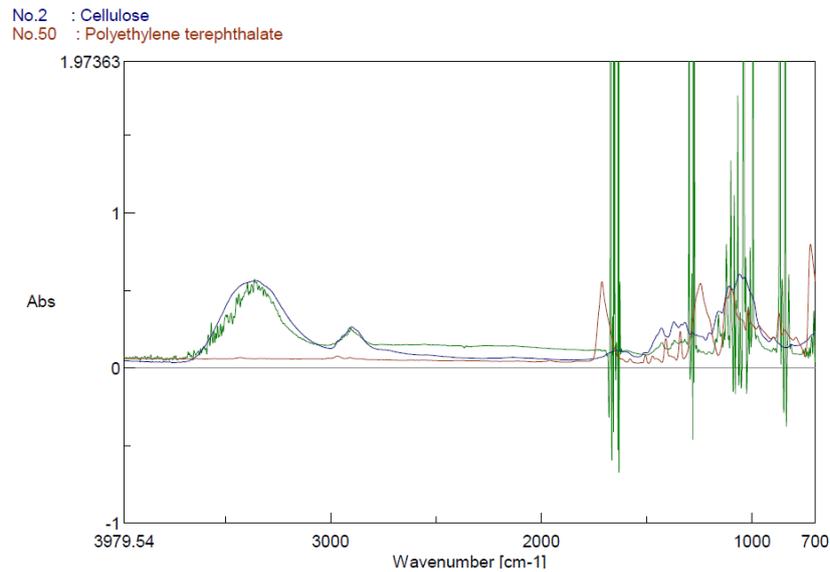


Figura 94: En verde el espectro de una partícula de celulosa analizada en el FTIR, en azul y en rojo los espectros de la celulosa y PET procedentes de la biblioteca del software con los que se hace la comparación.

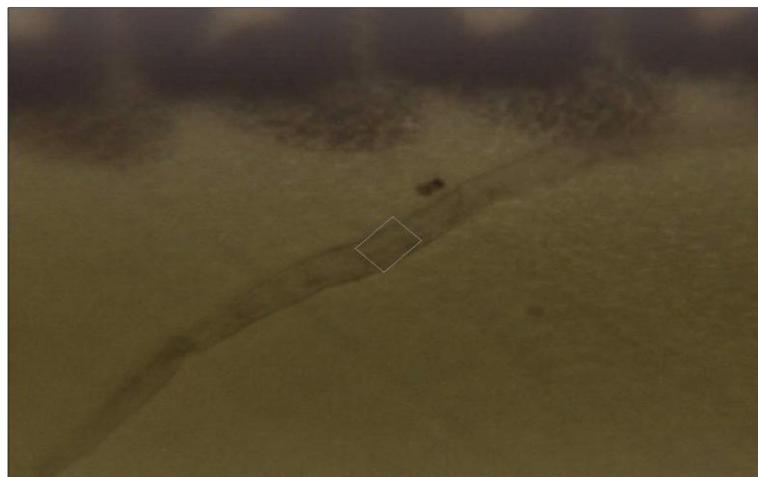


Figura 95: Fibra de celulosa en FTIR

Las siguientes tablas recopilan todos los resultados mostrando los porcentajes tanto de partículas de celulosa como de PET encontrados en las muestras realizadas en los ensayos de degradación de MP.

Tabla 13: Porcentaje de celulosa y PET en los ensayos realizados de alta concentración de PET

<b>Alta concentración PET</b>	<b>H<sub>2</sub>O + PET 55 °C</b>	<b>H<sub>2</sub>O + PET 37 °C</b>	<b>Tris-HCl + PET 55 °C</b>	<b>Tris-HCl + PET 37 °C</b>
% Celulosa en ensayos	46,42%	51,00%	46,15%	48,71%
% PET en ensayos	53,58%	49,00%	53,85%	51,29%
<b>Alta concentración PET</b>	<b>Cutinasa 2P 55 °C</b>	<b>Cutinasa 2P 37 °C</b>	<b>Lipasa CalB 55 °C</b>	<b>Lipasa CalB 37 °C</b>
% Celulosa en ensayos	40,00%	44,00%	40,00%	46,80%
% PET en ensayos	60,00%	56,00%	60,00%	53,20%

Tabla 14: Porcentaje de celulosa y PET en los ensayos realizados de baja concentración de PET

<b>Baja concentración PET</b>	<b>H<sub>2</sub>O + PET 55 °C</b>	<b>H<sub>2</sub>O + PET 37 °C</b>	<b>Tris-HCl + PET 55 °C</b>	<b>Tris-HCl + PET 37 °C</b>
% Celulosa en ensayos	57,89%	56,62%	61,70%	67,34%
% PET en ensayos	42,11%	43,38%	38,30%	32,66%
<b>Baja concentración PET</b>	<b>Cutinasa 2P 55 °C</b>	<b>Cutinasa 2P 37 °C</b>	<b>Lipasa CalB 55 °C</b>	<b>Lipasa CalB 37 °C</b>
% Celulosa en ensayos	50,00%	48,25%	45,23%	55,88%
% PET en ensayos	50,00%	51,75%	54,77%	44,12%

Se observa en las tablas que los porcentajes de PET aumentan en los ensayos donde hay una adición de enzimas. Además, los ensayos con una concentración teórica inicial alta de PET presentan unos porcentajes superiores a los ensayos con una concentración inicial más baja, siendo acordes los resultados obtenidos con lo teóricamente indicado.

Para el análisis de partículas PET de estos ensayos, se aplican los porcentajes de partículas PET indicados previamente, a la concentración total de partículas hallada en las muestras (celulosa/cupra) + PET), obteniendo la concentración de partículas PET tras finalizar el ensayo.

Se muestra en las siguientes páginas las gráficas con los resultados obtenidos de la concentración de partículas PET en los ensayos realizados en esta fase del proyecto.

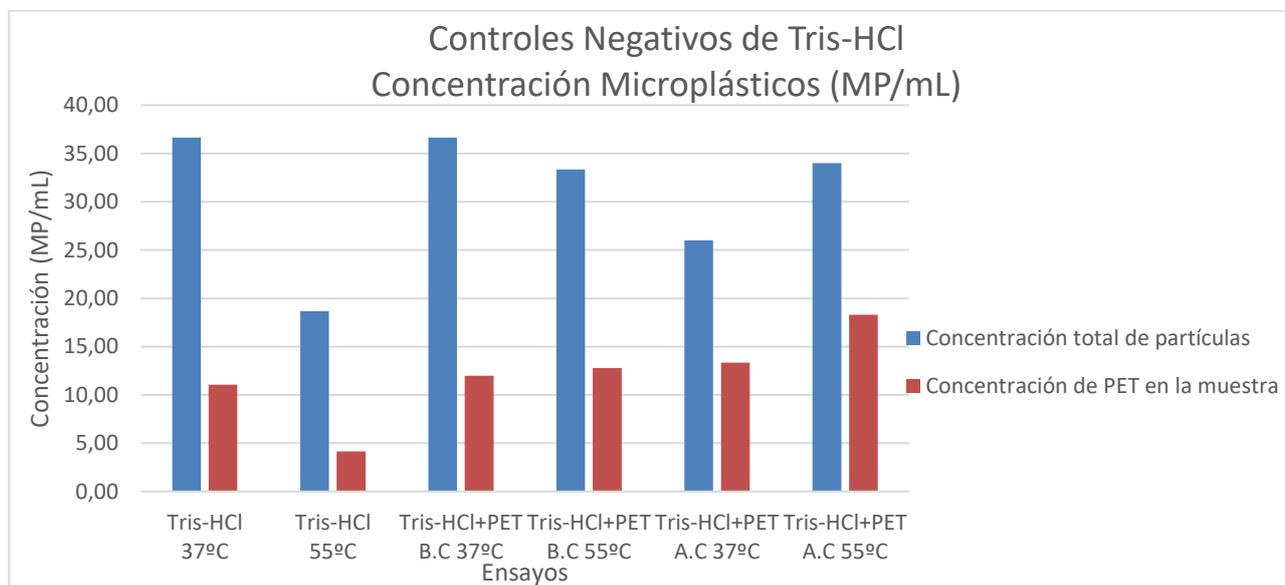


Figura 96: Concentración MP en ensayos de controles negativos H<sub>2</sub>O

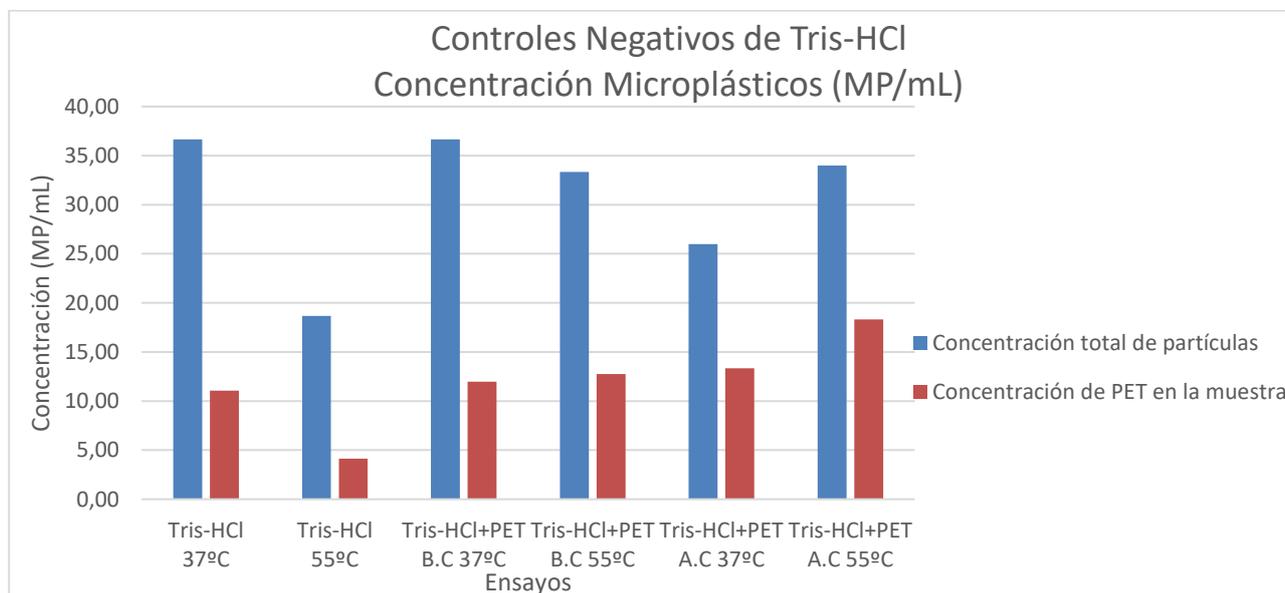


Figura 97: Concentración MP en ensayos de controles negativos Tris-HCl

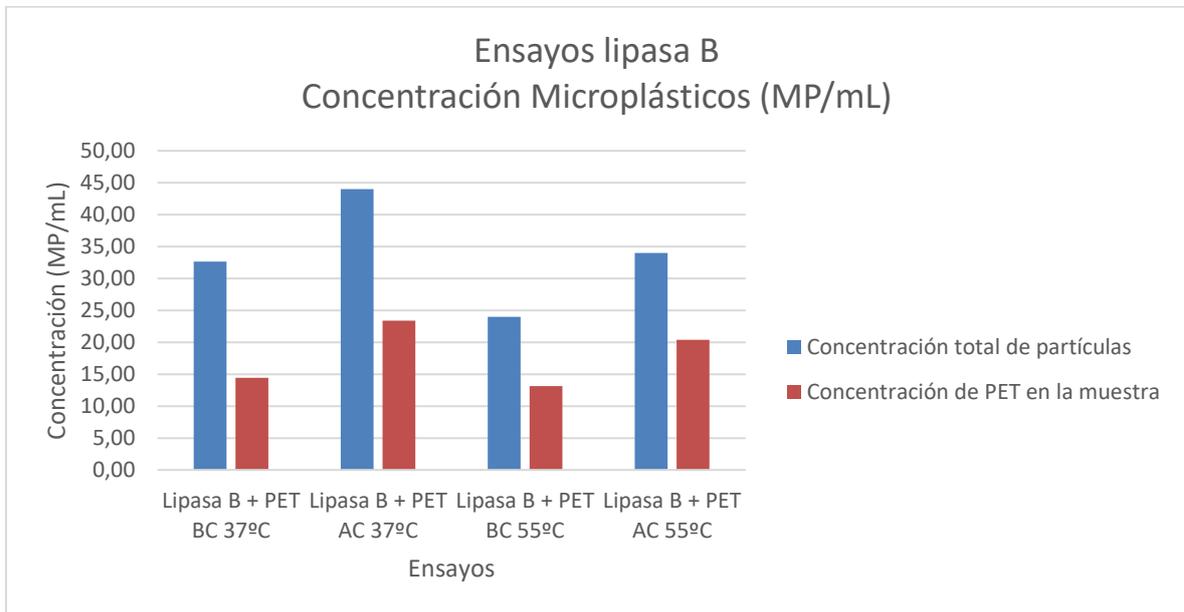


Figura 98: Concentraciones MP en los ensayos Lipasa B + PET

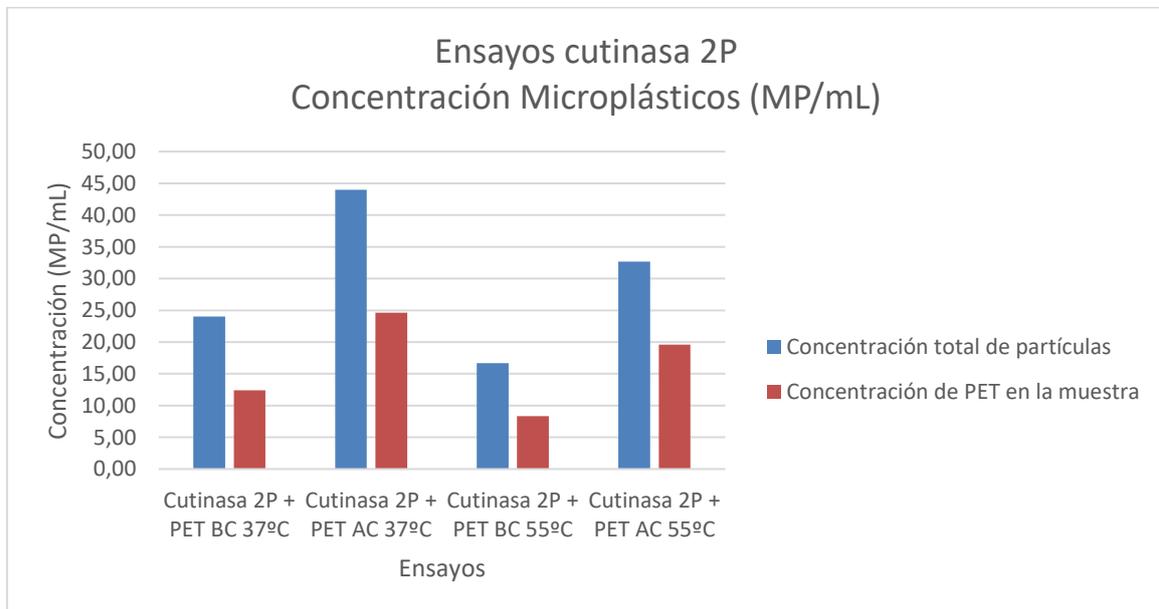


Figura 99: Concentraciones MP en los ensayos Cutinasa 2P + PET

En las siguientes tablas se recogen los resultados de las concentraciones de PET analizados en los ensayos de degradación del PET, tanto de los ensayos de los controles negativos, como los ensayos añadiendo las enzimas cutinasa y lipasa en las condiciones de estudio fijadas previamente. La columna de variación de la concentración revela como y en qué cantidad se ha modificado la concentración en los ensayos donde se añadieron las enzimas, respecto a los ensayos de controles negativos, pudiéndose de esta forma comparar el incremento observado en función de la temperatura y de la concentración de PET inicial añadida.

Tabla 15: Resumen resultados concentraciones PET en los ensayos de Lipasa B

Temperatura de ensayo	Concentración de PET definida	Medio Tris+ PET SIN enzima (MP/mL)	Ensayos Lipasa (MP/mL)	Variación Concentración Ensayos Lipasa B (MP/mL)
37 °C	Baja Concentración PET	11,975	14,413	2,437
	Alta concentración PET	13,335	23,408	10,072
55 °C	Baja Concentración PET	12,767	13,145	0,378
	Alta concentración PET	18,309	20,400	2,091

Tabla 16: Resumen resultados concentraciones PET en los ensayos de Cutinasa 2P

Temperatura de ensayo	Concentración de PET definida	Medio Tris+ PET SIN enzima (MP/mL)	Ensayos Cutinasa (MP/mL)	Variación Concentración Ensayos Cutinasa 2P (MP/mL)
37 °C	Baja Concentración PET	11,975	12,420	0,445
	Alta concentración PET	13,335	24,640	11,305
55 °C	Baja Concentración PET	12,767	8,333	-4,433
	Alta concentración PET	18,309	19,600	1,291

Los resultados muestran un aumento de la concentración de los MP en los ensayos donde se han empleado las dos enzimas (excepto en el caso de la cutinasa) a la temperatura de 55 °C. De lo que se concluye que la enzima cutinasa no está actuando en su temperatura óptima (37 °C) y se ha reducida su actividad enzimática.

A continuación, se muestran las tablas de frecuencia para los tamaños de las partículas analizadas en los filtros. Se ha despreciado el tamaño de los fragmentos de resina fluórica y de las fibras de celulosa, midiendo principalmente los fragmentos de PET

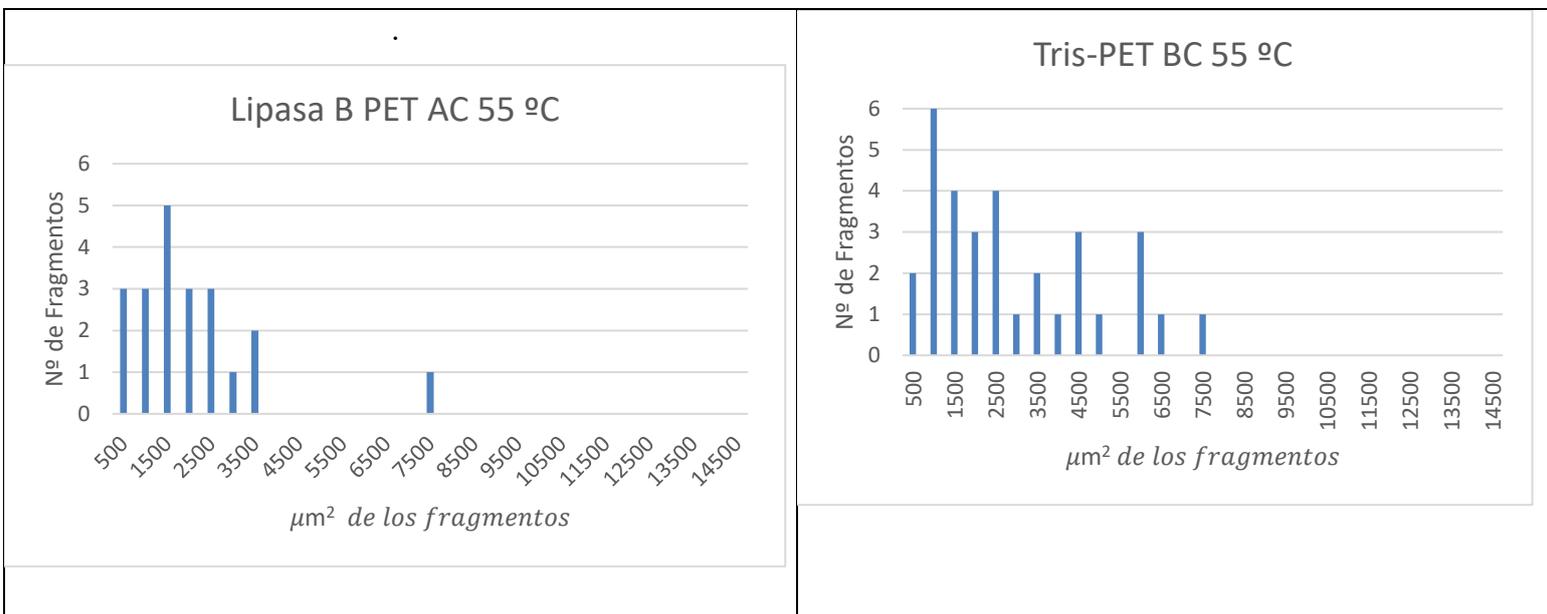


Figura 100: Tamaño de los fragmentos MP encontrados en los medios Tris-HCl a 55 °C

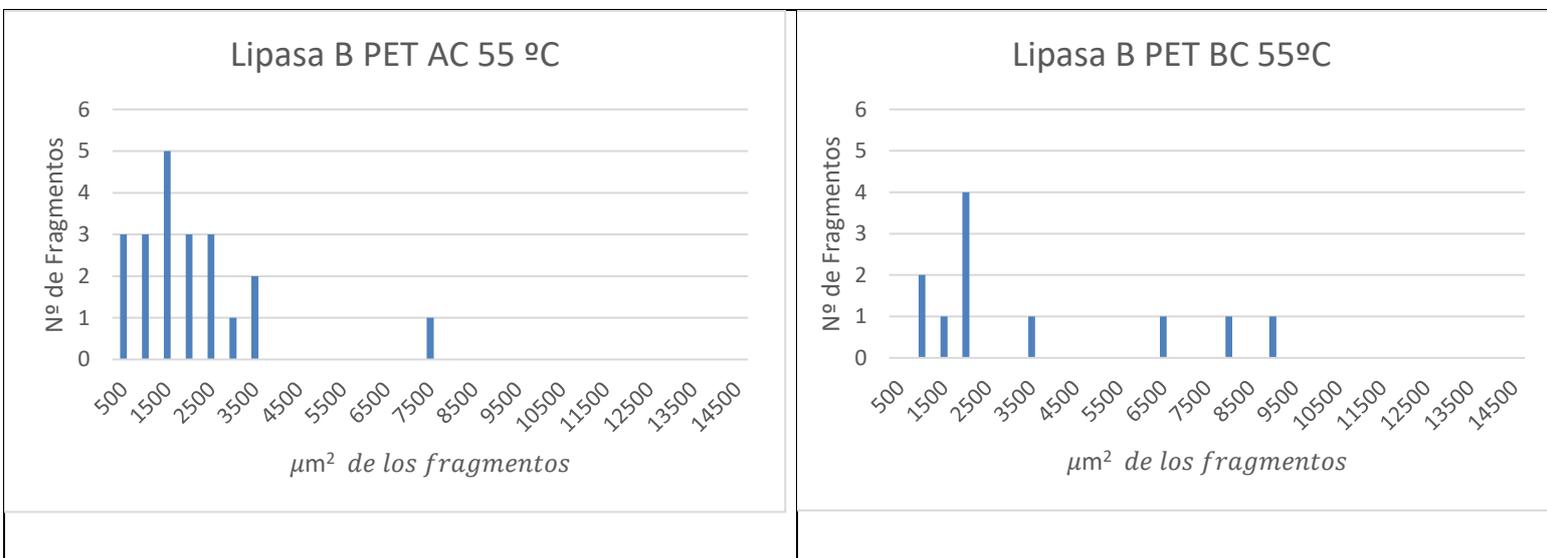


Figura 101: Tamaño de los fragmentos MP encontrados en los ensayos de la lipasa B a 55 °C

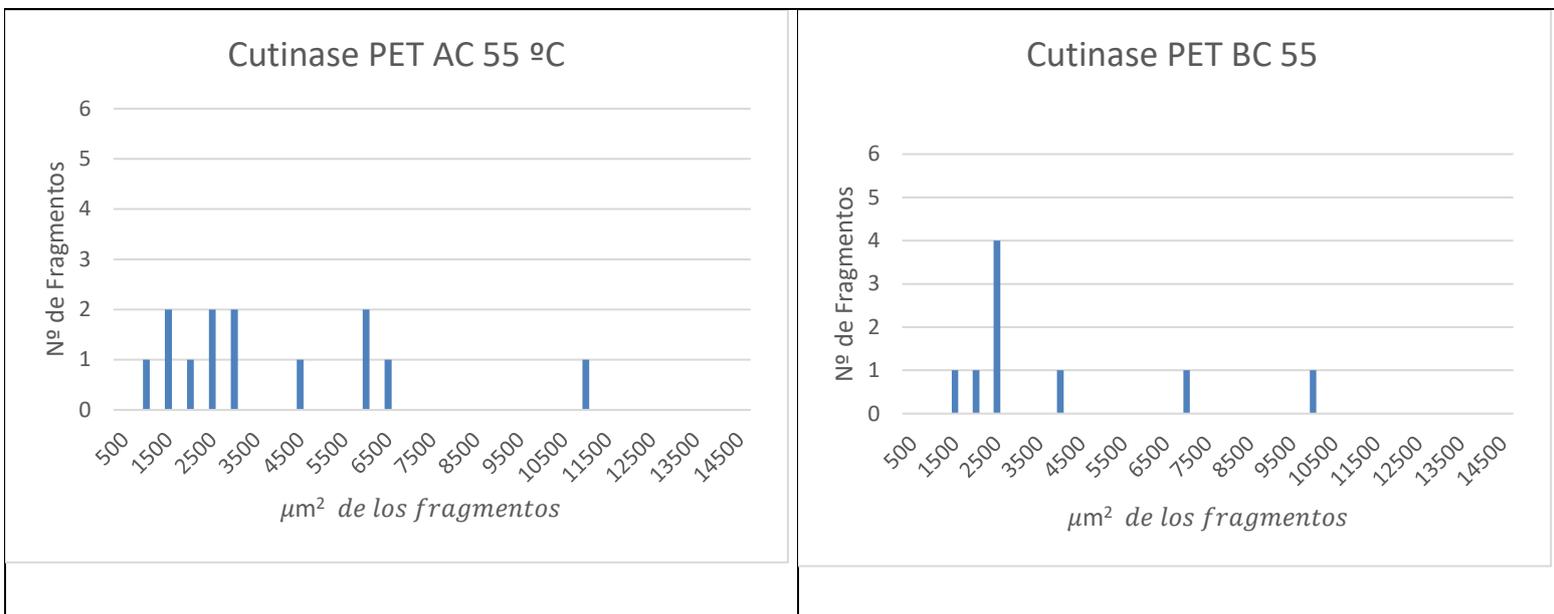


Figura 102: Tamaño de los fragmentos MP encontrados en los ensayos de la cutinasa 2P a 55 °C

Se comparan la distribución de áreas de las Figuras 100-101-102. Se observa que a la temperatura de 55°C, en los ensayos con la lipasa B (Figura 101) sí que aprecia una reducción del área de estos, en comparación con las áreas obtenidas del control negativo en Tris-HCl a la misma temperatura (Figura 102). El área de los MP en los ensayos de lipasa B se acercan a las áreas de 1500 μm<sup>2</sup> mientras que sin enzima se obtienen áreas de 11500 μm<sup>2</sup>.

En las gráficas asociadas a los ensayos en que se emplea la enzima cutinasa a 55 °C, las áreas de las partículas PET no experimentan una reducción significativa. Esto concuerda con el resultado de la concentración de MP obtenida previamente. Los resultados pueden indicar que a una temperatura de ensayo (55°C en estos ensayos) alejada de la temperatura óptima de las cutinasas (37°C), se pueda desnaturalizar la enzima limitando la actividad de esta, o al menos inactivarla.

Para determinar cómo influye la temperatura en la actividad enzimática, se han realizado los mismos ensayos con ambas enzimas a una temperatura de 37°C. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 103-105.

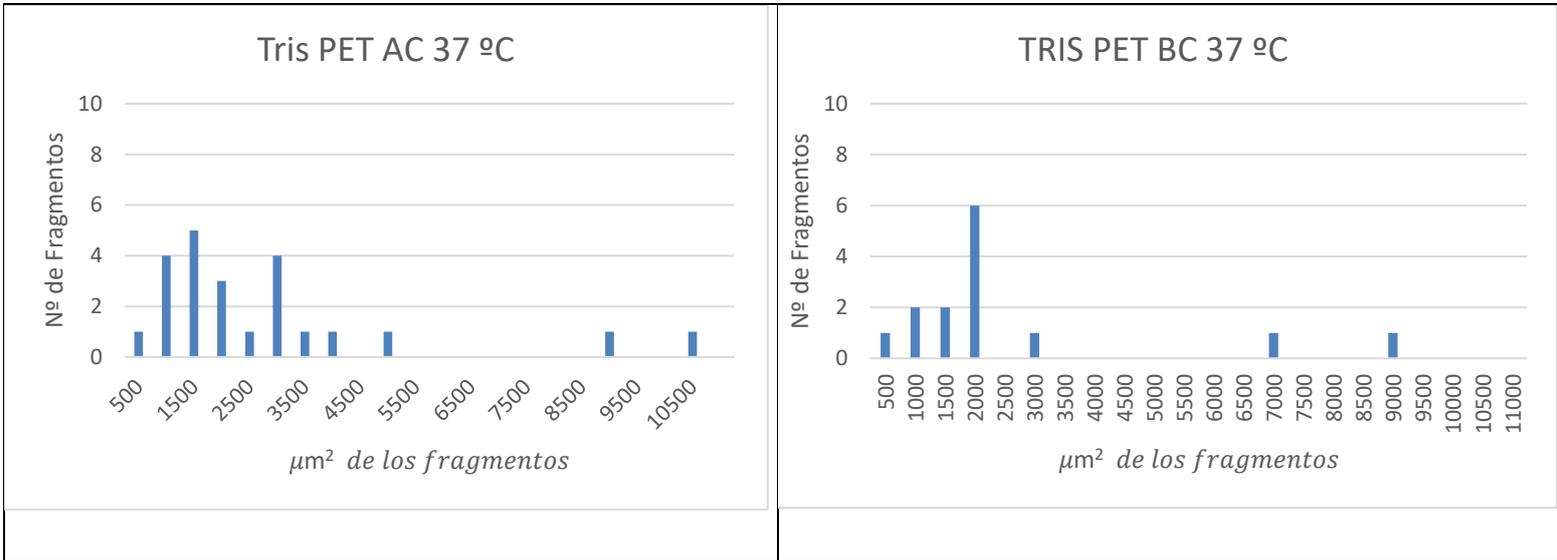


Figura 103: Tamaño de los fragmentos MP encontrados en los medios Tris-HCl a 37 °C

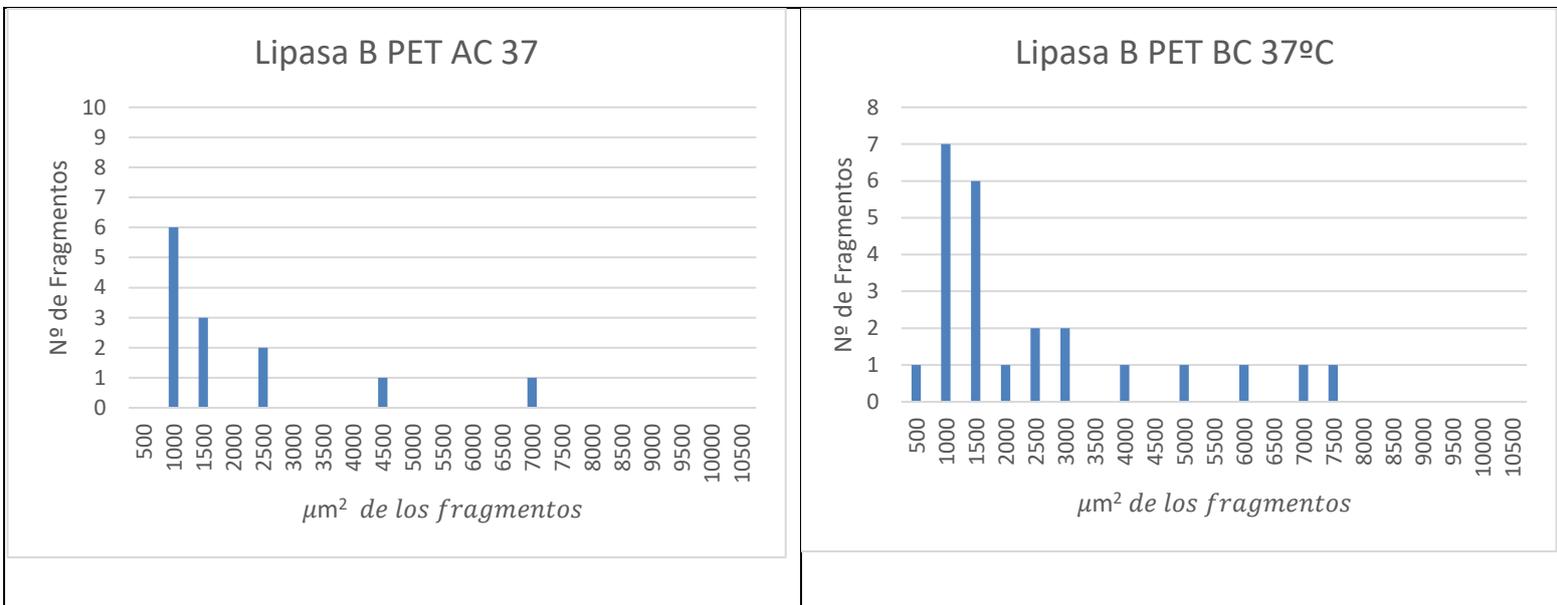
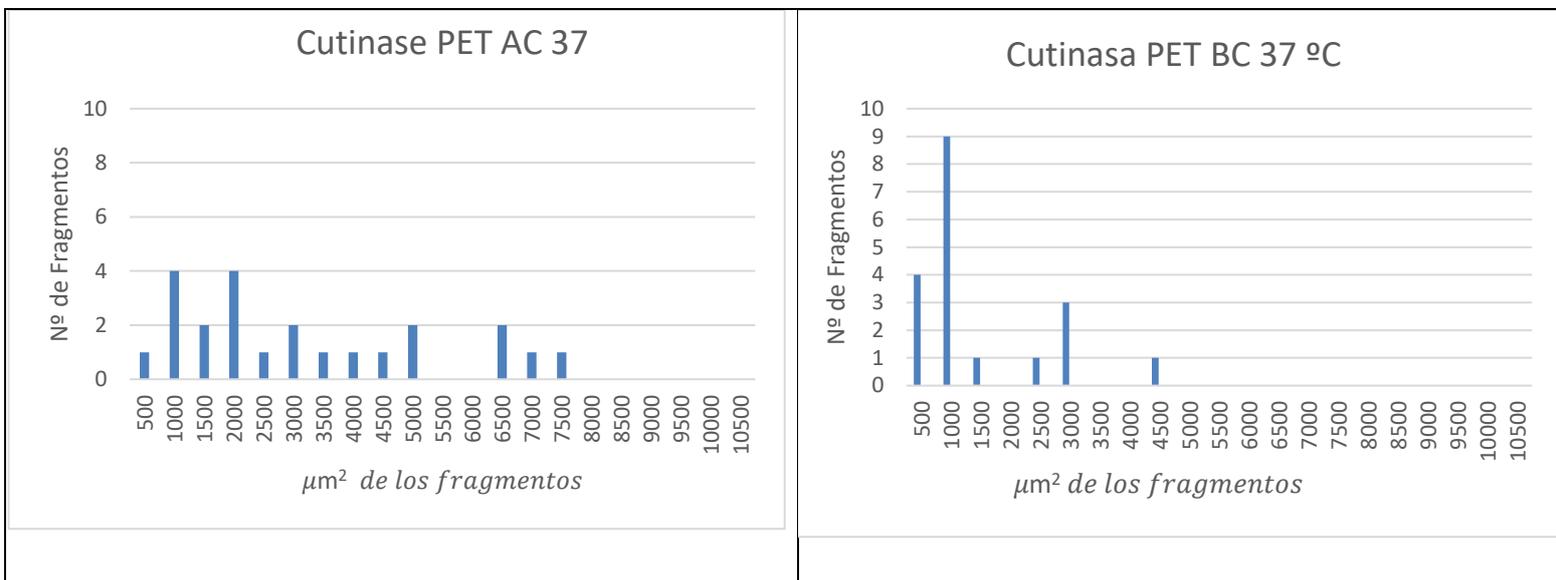


Figura 104: Tamaño de los fragmentos MP encontrados en los ensayos de la lipasa B a 37 °C



*Figura 105: Tamaño de los fragmentos MP encontrados en los ensayos de la cutinasa 2P a 37 °C*

Se observa para ambas enzimas a 37 °C, un aumento del número de partículas PET y una reducción de su área, tanto para el caso de alta o baja concentración de PET. Esto indica, en primer lugar, que el rango de temperaturas de funcionamiento de la lipasa B es más amplio que el de la enzima cutinasa ya que tanto a 55 como a 37°C muestra una buena degradación de MP. En segundo lugar, que la enzima cutinasa sí que degrada MP cuando se encuentra a su temperatura óptima.

## Capítulo 8. CONCLUSIONES Y TRABAJOS FUTUROS

En primer lugar, se expondrán las conclusiones que se han obtenido a partir de los ensayos de degradación enzimática del PET y, en segundo lugar, posibles ideas para los futuros trabajos que continúen lo expuesto en este proyecto.

### 8.1 CONCLUSIONES

- De acuerdo a lo comentado en el capítulo 7, apartado 7.1, el factor tiempo afecta a la medida de absorbancia obtenida en las muestras del buffer Tris-HCl, esto se comprueba en la Figura 57, donde las curvas patrón realizadas en distintos días presentaron distintas absorbancias a la misma concentración. Por tanto, como conclusión, los patrones de los ensayos de definición de la cinética enzimática en la disolución Tris-HCl se deben realizar al mismo tiempo que los ensayos de las enzimas, con ello se elimina el aumento gradual de la absorbancia en el tiempo debido a la acumulación de sustrato paranitrofenol butirato.
- Tras realizarse las pruebas de la actividad enzimática en las disoluciones Tris-HCl y PBS, las velocidades máximas de las reacciones enzimáticas de la disolución buffer PBS fueron inferiores a las obtenidas en el buffer Tris-HCl (incluso en algunos ensayos no se captó que hubiera ningún efecto). Esto se debe principalmente a la composición de ambas disoluciones, pudiendo afectar a la actividad enzimática las sales que conforman el medio PBS. Se comprueba que el medio Tris-HCl es el adecuado para un correcto funcionamiento de las enzimas en su actividad enzimática. Es posible que los cationes presentes en este medio afecten a la actividad de la enzima a causa de la fuerza iónica del medio.
- Las concentraciones de MP de los ensayos se incrementaron respecto a las obtenidas en los controles negativos, mostrando, en las condiciones de temperatura adecuadas, una elevada actividad enzimática de las hidrolasas, capaces de degradar el PET mediante ruptura de sus enlaces. Esta conclusión también viene respaldada por la reducción de

tamaño de las partículas mostrada de la Figura 102 a la 107, donde se puede ver un desplazamiento de los máximos en los histogramas asociados a los tamaños de partículas de PET hacia la izquierda. Este aumento de concentración de MP y disminución de tamaño, que en un primer momento podría ser perjudicial por facilitar su acceso al torrente sanguíneo, permitiría el acceso por difusión a otros organismos y a su sistema metabólico, facilitando la degradación completa del PET, y obteniendo con ello los componentes de ácido tereftálico y etilenglicol, tal y como se comentó en los capítulos 1 y 3.

- No se encontraron trazas de polipropileno en las pruebas realizadas en este proyecto, lo que podría indicar que los tubos donde se llevan a cabo las reacciones enzimáticas no sufren degradación a las temperaturas óptimas de las enzimas, de 37 y 55 °C (se encontraron principalmente trazas de PET y celulosa en los análisis de estos). Por lo tanto, se puede inferir cierta selectividad hacia el tipo de enlaces presentes en el PET.
- Respecto a las estrategias de submuestreo para el análisis de los filtros de los ensayos, se recomienda aumentar la concentración de MP a analizar para que, de esta forma, solo sea preciso analizar un 25% de la muestra y el margen de error presentado no sea elevado, sin tener que analizar hasta un 50%.
- El uso de enzimas purificadas en vez de organismos vivos ha permitido tener un buen control de los parámetros del ensayo pudiendo aplicar las condiciones óptimas de la enzima en vez de la del organismo.
- Desde la perspectiva económica este trabajo indica que se han gastado aproximadamente 207.111,84 € en la realización de este proyecto, principalmente de los dispositivos que se han empleado a lo largo del mismo. A pesar de tener unos costes elevados, sobre todo debido a los dispositivos que hay que obtener para realizar los ensayos, se ha podido comprobar en los ensayos que sí hay un efecto de las enzimas en los microplásticos, pudiendo optimizar para futuros ensayos la optimización económica, reduciendo los costes estimados de los materiales y fungibles necesarios para la degradación de los MP.

## **8.2 TRABAJOS FUTUROS**

Se presentan a continuación sugerencias para futuros trabajos, considerando nuevos parámetros de diseño.

En este proyecto solo se ha trabajado con dos medios de disolución (Tris-HCl y PBS), limitando la cantidad de ensayos que se pueden realizar para las enzimas seleccionadas. Para futuros trabajos se podrá analizar el uso de disoluciones buffer tales como disoluciones de nitrato de fosforo, nitrato de acetato y nitrato de citrato, disoluciones indicadas por la distribuidora de la cutinasa 2P para distintos valores de pH.

Solo se han realizado los ensayos de degradación del PET para las temperaturas óptimas de las enzimas comerciales fijándose el valor de pH a un valor neutro (7,6). Para futuros trabajos se podrán cambiar las temperaturas de los ensayos abarcando el rango de [30-55 °C] donde hay actividad enzimática. También se puede modificar el pH para ver cómo afecta el cambio de fuerzas iónicas al funcionamiento de las enzimas. Adicionalmente a la modificación de estos dos parámetros, también se puede tener en cuenta la adición de factores externos tales como salinidad, aditivos del PET u otros contaminantes que puedan inhibir el funcionamiento de las enzimas.

Respecto a las enzimas, las dos han demostrado tener un buen funcionamiento a sus temperaturas óptimas. Para futuros proyectos se pueden realizar combinaciones de ambas enzimas para ver su resultado en la ruptura de partículas PET añadiendo también cofactores que permitan aumentar la estabilidad de la actividad enzimática, especialmente de la cutinasa 2P, y de esta manera comprobar si hay un efecto de sinergia. Adicionalmente, también se puede aumentar la concentración de enzima en los ensayos, para ver si un aumento de este parámetro puede afectar significativamente a la degradación del PET.

Finalmente, se recomienda hacer ensayos replicados (repetiendo al menos tres veces cada ensayo) para realizar un adecuado estudio estadístico, evaluando la dispersión en los resultados obtenidos, para de esta forma obtener una cierta validez.

## Capítulo 9. BIBLIOGRAFÍA

### Referencias

- [1] GBIBI Inyectados SL. *La historia del Plástico*. Disponible en: <https://gbinyectados.com/la-historia-del-plastico/>.
- [2] G.A. Perdomo, "Plásticos y medio ambiente", *Revista Iberoamericana Polímeros*, Vol. 3 (2), PerAbril 2002, pp. 1-13.
- [3] N. F. S. Khairul Anuar, F. Huyop, G. Ur-Rehman, F. Abdullah, Y. M. Normi, M. K. Sabullah and R. Abdul Wahab, "An Overview into Polyethylene Terephthalate (PET) Hydrolases and Efforts in Tailoring Enzymes for Improved Plastic Degradation," *IJMS*, vol. 23, (20), -10-20, 2022. DOI: 10.3390/ijms232012644.
- [4] Observatorio de salud y Medio ambiente, DKV Instituto de la Vida Saludable, "Contaminación por plásticos. Uno de los mayores desafíos ambientales del siglo XXI", *Ecodes*, M. García Lamigueiro (dir.), Noviembre, 2019. Disponible en: <https://ecodes.org/hacemos/cultura-para-la-sostenibilidad/salud-y-medioambiente/observatorio-de-salud-y-medio-ambiente/contaminacion-por-plasticos-uno-de-los-mayores-desafios-ambientales-del-siglo-xxi>.
- [5] Rosamela, Alvarez, Paula Buzo and Jose Eduardo González Reyes, "Contaminación por microplásticos," *Revista de Ciencia*, Abril-Junio, 2022. Disponible en: [https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/73\\_2/PDF/Ciencia\\_73-2.pdf](https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/73_2/PDF/Ciencia_73-2.pdf).
- [6] V. Tournier, C. M. Topham, A. Gilles, B. David, C. Folgoas, E. Moya-Leclair, E. Kamionka, M. Desrousseaux, H. Texier, S. Gavalda, M. Cot, E. Guémard, M. Dalibey, J. Nomme, G. Cioci, S. Barbe, M. Chateau, I. André, S. Duquesne and A. Marty, "An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles," *Nature*, vol. 580, (7802), -04-08, 2020. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32269349/>. DOI: 10.1038/s41586-020-2149-4.
- [7] S. González Álvarez, F. J. Gómez Gómez, I. García Delgado and A. Á Chaves Manceras, "Riesgos de los Líquidos Criogénicos," Disponible en: <https://www.tecnicaindustrial.es/wp-content/uploads/Numeros/28/35/a35.pdf>.
- [8] F. J. Perez de la Cruz, M. A. Urrea Mallebrera, "Tema 8 Filtración", Universidad Politécnica de Cartagena. Disponible en: [https://ocw.bib.upct.es/pluginfile.php/6023/mod\\_resource/content/1/Tema\\_08\\_FILTRACION.pdf](https://ocw.bib.upct.es/pluginfile.php/6023/mod_resource/content/1/Tema_08_FILTRACION.pdf).

- [9] N. Abril Díaz, J. Antonio Bárcena Ruiz, E. Fernández, A. G. Cejudo, J. J. Novo, J. P. Peinado, F. Toribio Meléndez-Valdés and I. T. Fiñana, "8. Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas," Disponible en: [https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/08\\_ESPECTROFOTOMETRIA.pdf](https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETRIA.pdf).
- [10] M. Paola Acevedo, E. Catalina Ardila, L. Andrea Navarro and Universidad Santo Tomas, "Elaboración de un Espectrofotómetro Casero, Mediante la Utilización de un CD," 4 Junio, 2010. Disponible en: [https://fqmegablog.blogspot.com/2010/06/elaboracion-de-un-espectrofotometro\\_04.html](https://fqmegablog.blogspot.com/2010/06/elaboracion-de-un-espectrofotometro_04.html).
- [11] P. Roca, J. Oliver, A. M. Rodríguez and Universidad de las Islas Baleares, "Bioquímica: Técnicas y Métodos," 2003. Disponible en: <https://www.ehu.eus/biofisica/juanma/mbb/pdf/bqtypm.pdf>.
- [12] J. L. Serrano Martínez, "Tema: El Espectro Electromagnético. Absorción Visible-Ultravioleta," Disponible en: [https://www.academia.edu/12786226/Posgrado\\_en\\_INGENIER%C3%8DA\\_DEL\\_AGUA](https://www.academia.edu/12786226/Posgrado_en_INGENIER%C3%8DA_DEL_AGUA).
- [13] Grupo de Docencia de IES Juan de Aréjula, "UNIDAD DIDÁCTICA 1 TÉCNICAS APLICADAS EN EL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA," Disponible en: <https://iesjuandearejula.com/wp-content/uploads/2020/09/TECNICAS-ESPECTROFOTOMETRICAS-1.pdf>.
- [14] J. Brandt, F. Fischer, E. Kanaki, K. Enders, M. Labrenz and D. Fischer, "Assessment of Subsampling Strategies in Microspectroscopy of Environmental Microplastic Samples," *Front. Environ. Sci.*, vol. 8, -01-27, 2021. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/environmental-science/articles/10.3389/fenvs.2020.579676/full>. DOI: 10.3389/fenvs.2020.579676.
- [15] M. B. Mejuto, "Microplásticos en el medio ambiente: riesgo de contaminación metálica y perspectiva social," Junio, 2021. Disponible en: [https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/29134/BarangaMejuto\\_Michelle\\_TFG\\_2021.pdf](https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/29134/BarangaMejuto_Michelle_TFG_2021.pdf).
- [16] M. Eriksen, L. C. M. Lebreton, H. S. Carson, M. Thiel, C. J. Moore, J. C. Borerro, F. Galgani, P. G. Ryan and J. Reisser, "Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea," *PLoS ONE*, vol. 9, (12), -12-10, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0111913.
- [17] J. Boucher and D. Friot, "Primary Microplastics in the Oceans: a Global Evaluation of Sources," January, 2017. DOI: 10.2305/IUCN.CH.2017.01.en. Disponible en: <https://portals.iucn.org/library/sites/library/files/documents/2017-002-En.pdf>.
- [18] A. Guadalupe and M. Patlán, "Alma Guadalupe Martinez Patlan," Disponible en: <https://ciqa.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1025/347>.

[19] B. Bertolotti, Jorge Chávez, R. Laos, C. Rospigliosi, J. Nakamatsu and Revista de Química (PUCP), "Poliésteres y Reciclaje Químico del Poli(tereftalato de etileno)," pp. 13–20, 2005. Disponible en: <https://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/view/18726>.

[20] J. Pérez Parrilla, "Biodegradación de tereftalato de polietileno microorganismos, enzimas y perspectivas futuras," Julio, 2020. Disponible en: <https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/20671/Biodegradacion%20de%20tereftalato%20de%20polietileno%20microorganismos,%20enzimas%20y%20perspectivas%20futuras.pdf>.

[21] C. E. Torres Alpízar, C. Jesús González González, "Procesos tecnológicos de reciclaje mecánico de plásticos", Universidad de Matanzas, 2023. Disponible en: [https://rein.umcc.cu/bitstream/handle/123456789/2988/Mon23\\_Eduardo.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://rein.umcc.cu/bitstream/handle/123456789/2988/Mon23_Eduardo.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

[22] C. Peña Montes and Peralta Peláez, Luis A. y Farres, Amelia, "Biorremediación de la contaminación por plásticos," Abril-Junio, 2022. Disponible en: [https://revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/73\\_2/PDF/12\\_73\\_2\\_1438\\_Biorremediacion.pdf](https://revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/73_2/PDF/12_73_2_1438_Biorremediacion.pdf).

[23] M. Cáceres, M. Fernanda and J. Avella, "Degradación y reciclaje biológico del PET," Disponible en: <https://repositorio.uniandes.edu.co/server/api/core/bitstreams/c4478565-8c75-4428-bff3-11dd24f7a54b/content>.

[24] S. Yoshida, K. Hiraga, T. Takehana, I. Taniguchi, H. Yamaji, Y. Maeda, K. Toyohara, K. Miyamoto, Y. Kimura and K. Oda, "A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate)" Disponible en: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aad6359>.

[25] Carbios. (Jan 17). *Carbios & Partner Ensure Industrial Scale Production of PET-degrading Enzymes*. Disponible en: <https://www.specialchem.com/polymer-additives/news/carbios-pet-degrading-enzymes-000229773>.

[26] J. Merino Pérez, M. J. Noriega Borge and Universidad de Cantabria, "Enzimas," Disponible en: <https://ocw.unican.es/course/view.php?id=44>.

[27] P. Carbonero Zalduegui and Universidad Politécnica, Eds., *ENZIMAS*. 1975. Disponible en: <https://oa.upm.es/54141/>. DOI: ai:oa.upm.es:54141.

[28] Equipo Docente de la Universidad Francisco de Vitoria, "Tema 1: Cinética enzimática Tema, Bloque I," Disponible en:

[29] A. Porto Andión, "Curso de Biología Tema 14: Enzimas," Disponible en: <https://www.bionova.org.es/biocast/tema14.htm>.

[30] E. Durazo Beltrán and Universidad Autónoma de Baja California, "Facultad Ciencias Marinas, Curso: Bioquímica, Enzimas: Conceptos Básicos y Cinética," Disponible en: .

- [31] D. Díaz Plascencia and Universidad Autónoma de Chihuahua, "Tema 2: enzimas," Disponible en: [https://www.academia.edu/17957815/BIOQU%C3%8DMICA\\_TEMA\\_2\\_ENZIMAS](https://www.academia.edu/17957815/BIOQU%C3%8DMICA_TEMA_2_ENZIMAS).
- [32] K. Tipton, "Translocases (EC 7): A new EC Class," -08, 2018. Disponible en: <https://iubmb.org/wp-content/uploads/sites/10116/2018/10/Translocases-EC-7.pdf>.
- [33] K. Tipton and A. Mcdonald, "A Brief Guide to Enzyme Nomenclature and Classification," Disponible en: <https://www.bionova.org.es/biocast/tema14.htm>.
- [34] Expasy.org, "Expasy," Disponible en: <https://www.expasy.org/>.
- [35] A. De Lera Santín, "Aplicaciones enzimáticas en procesos de conservación y restauración de obras de arte. Consolidación de celulosa," 15/07, 2011. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10810/14292>.
- [36] J. Astigarraga Espeita, "Qué son los ODS y por qué debes conocerlos," 19/02, 2020. Disponible en: <https://www.ekomodo.eus/blog/empresas-por-un-mundo-mejor/que-son-los-ods-y-por-que-son-tan-importantes/>.
- [37] CalSPEC, "Microplastics Occurrence, Health Effects, and Mitigation Policies An Evidence Review for the California State Legislature," January, 2023. Disponible en: <https://uccs.ucdavis.edu/sites/g/files/dgvnsk12071/files/media/documents/CalSPEC-Report-Microplastics-Occurrence-Health%20Effects-and-Mitigation-Policies.pdf>.
- [38] Comisión Europea, "Documentos de referencia sobre las mejores técnicas disponibles," Disponible en: <https://bureau-industrial-transformation.jrc.ec.europa.eu/es/reference>.
- [39] B. Stauch, S. J. Fisher and M. Cianci, "Open and closed states of Candida antarctica lipase B: protonation and the mechanism of interfacial activation," *Journal of Lipid Research*, vol. 56, (12), pp. 2348, 10-07, 2015. DOI: 10.1194/jlr.m063388.
- [40] Y. Xue, X. Zhang, Z. Lu, C. Xu, H. Xu and Y. Hu, "Enhancing the Catalytic Performance of Candida antarctica Lipase B by Chemical Modification With Alkylated Betaine Ionic Liquids," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 10, -02-21, 2022. . DOI: 10.3389/fbioe.2022.850890.
- [41] F. Bischoff, K. Litwińska, A. Cordes, K. Baronian, R. Bode, F. Schauer and G. Kunze, "Three New Cutinases from the Yeast *Arxula adenivorans* That Are Suitable for Biotechnological Applications," *Appl Environ Microbiol*, vol. 81, (16), pp. 5497, -06-05, 2015. DOI: 10.1128/aem.00894-15.
- [42] ASA Spezialenzyme GmbH, "Cutinase 2P," Disponible en: <https://asa-enzyme.de/en/produkt/cutinase-2p/>.

- [43] R. Syedd-León, M. Sandoval-Barrantes, H. Trimiño-Vásquez, L. R. Villegas-Peñaranda and G. Rodríguez-Rodríguez, "Revisiting the fundamentals of p-nitrophenol analysis for its application in the quantification of lipases activity. A graphical update", *RU*, vol. 34, (2), pp. 31, -07-31, 2020. DOI: 10.15359/ru.34-2.2.
- [44] I. T. Fiñana, A. Galván Cejudo and E. Fernández, "6. pH y amortiguadores: Tampones fisiológicos," Disponible en: <https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/06%20pH%20AMORTIGUADORES.pdf>.
- [45] R. M. Blanco, P. Terreros, M. Fernández-Pérez, C. Otero and G. Díaz-González, "Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 30, (2), pp. 83, -08, 2004. . DOI: 10.1016/j.molcatb.2004.03.012.
- [46] Sigma Aldrich, "Lipase B Candida antarctica, recombinant from Aspergillus oryzae," Disponible en: [https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/product/sigma/62288?srsId=AfmBOooOyZ3EzOV6XhYfgeoLUv\\_Q4mOMfxZDdvKNS5\\_22k3X1TeEiPqO](https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/product/sigma/62288?srsId=AfmBOooOyZ3EzOV6XhYfgeoLUv_Q4mOMfxZDdvKNS5_22k3X1TeEiPqO).
- [47] R. A. Rojas-Luna, L. Oquendo-Ruiz, C. A. García-Alzate, V. A. Arana, R. García-Alzate and J. Trilleras, "Identification, Abundance, and Distribution of Microplastics in Surface Water Collected from Luruaco Lake, Low Basin Magdalena River, Colombia," *Water*, vol. 15, (2), -01-13, 2023. DOI: 10.3390/w15020344.

## ANEXO I DISOLUCIÓN TRIS CON ENZIMA LIPASA B

*Tabla 17: Resultados absorbancia-tiempo ensayo con simple concentración de enzima lipasa B a 55°C en disolución Tris*

Ensayo con Simple Concentración enzima a 55°C		
Tiempo real (min)	Absorbancia 405 nm	Absorbancia 380 nm
0,00	0,406	0,335
2,58	0,395	0,329
5,17	0,389	0,32
7,65	0,382	0,315
15,17	0,378	0,311
20,25	0,377	0,31
29,85	0,373	0,307
59,98	0,356	0,294

*Tabla 18: Resultados absorbancia-tiempo ensayo con doble concentración de enzima lipasa B a 55°C en disolución Tris*

Ensayo con Doble concentración enzima a 55°C		
Tiempo real (min)	Absorbancia 405 nm	Absorbancia 380 nm
0,00	0,455	0,376
2,60	0,439	0,356
4,75	0,440	0,354
7,65	0,432	0,352
10,17	0,436	0,351
12,58	0,435	0,354
15,10	0,435	0,353
31,05	0,431	0,346
59,17	0,429	0,345

*Tabla 19: Resultados absorbancia-tiempo ensayo con simple concentración de enzima lipasa B a 37 °C en disolución Tris*

<b>Ensayo con Simple Concentración enzima a 37°C</b>		
Tiempo real (min)	Absorbancia 405 nm	Absorbancia 380 nm
0,00	0,458	0,351
2,63	0,452	0,354
5,25	0,447	0,351
7,67	0,450	0,352
10,08	0,449	0,356
12,80	0,445	0,349
15,08	0,447	0,352
20,22	0,448	0,357
31,02	0,450	0,356
59,92	0,434	0,343

*Tabla 20: Resultados absorbancia-tiempo ensayo con doble concentración de enzima lipasa B a 37 °C en disolución Tris*

<b>Ensayo con Doble Concentración enzima a 37°C</b>		
Tiempo real (min)	Absorbancia 405 nm	Absorbancia 380 nm
0,00	0,447	0,357
2,52	0,434	0,345
5,42	0,442	0,341
7,83	0,445	0,350
10,25	0,432	0,337
12,45	0,441	0,347
15,08	0,437	0,345
19,83	0,440	0,347
29,83	0,429	0,345
59,83	0,422	0,327

## ANEXO II DISOLUCIÓN PBS CON ENZIMA LIPASA B

*Tabla 21: Resultados absorbancia-tiempo ensayo con simple concentración de enzima lipasa B a 55°C en disolución PBS*

Ensayo con Simple Concentración enzima a 55°C		
Tiempo real (min)	Absorbancia 405 nm	Absorbancia 380 nm
0,00	1,358	1,113
2,68	1,353	1,108
5,08	1,349	1,099
7,75	1,330	1,062
10,25	1,338	1,069
12,70	1,336	1,068
14,88	1,359	1,077
21,12	1,337	1,085
31,08	1,276	1,035
58,50	1,336	1,093

*Tabla 22: Resultados absorbancia-tiempo ensayo con doble concentración de enzima lipasa B a 55°C en disolución PBS*

Ensayo con Doble Concentración de enzima a 55°C		
Tiempo real (min)	Absorbancia 405 nm	Absorbancia 380 nm
0,00	1,398	1,122
2,63	1,463	1,174
4,93	1,364	1,097
7,67	1,391	1,122
9,83	1,385	1,115
12,50	1,385	1,111
15,25	1,400	1,110
19,90	1,380	1,111
30,02	1,387	1,103
58,50	1,329	1,061

*Tabla 23: Resultados absorbancia-tiempo ensayo con simple concentración de enzima lipasa B a 37 °C en disolución PBS*

<b>Ensayo con Simple Concentración enzima a 37°C</b>		
Tiempo real (min)	Absorbancia 405 nm	Absorbancia 380 nm
0,00	1,382	1,126
2,65	1,386	1,118
4,67	1,380	1,12
7,68	1,394	1,129
9,70	1,409	1,139
12,43	1,412	1,139
15,17	1,407	1,138
20,85	1,408	1,138
29,85	1,398	1,135
60,30	1,469	1,186

*Tabla 24: Resultados absorbancia-tiempo ensayo con doble concentración de enzima lipasa B a 37 °C en disolución PBS*

<b>Ensayo con Doble Concentración Enzima a 37°C</b>		
Tiempo real (min)	Absorbancia 405 nm	Absorbancia 380 nm
0,00	1,503	1,222
2,82	1,379	1,111
5,02	1,454	1,176
7,58	1,452	1,159
10,25	1,498	1,200
12,68	1,475	1,183
15,20	1,486	1,197
19,98	1,489	1,204
30,22	1,412	1,146
55,83	1,498	1,204

## ANEXO III DISOLUCIÓN TRIS CON ENZIMA CUTINASA 2P

*Tabla 25: Resultados absorbancia-tiempo ensayo con simple concentración de enzima cutinasa 2P a 55°C en disolución Tris*

Ensayo con Simple Concentración de Enzima a 55°C		
Tiempo real (min)	Absorbancia 405 nm	Absorbancia 380 nm
0,00	1,195	1,012
2,47	1,163	0,975
5,52	1,167	0,985
7,83	1,161	0,976
9,83	1,165	0,979
12,50	1,131	0,942
14,88	1,157	0,965
20,08	1,144	0,951
29,83	1,152	0,938
60,08	1,136	0,943

*Tabla 26: Resultados absorbancia-tiempo ensayo con doble concentración de enzima cutinasa 2P a 55°C en disolución Tris*

Ensayo con Doble Concentración de Enzima a 55°C		
Tiempo real (min)	Absorbancia 405 nm	Absorbancia 380 nm
0,00	1,157	0,946
2,55	1,163	0,963
4,68	1,148	0,949
7,13	1,144	0,946
9,80	1,144	0,942
12,53	1,144	0,943
14,75	1,136	0,934
19,67	1,132	0,929
29,75	1,131	0,929
57,75	1,123	0,922

*Tabla 27: Resultados absorbancia-tiempo ensayo con simple concentración de enzima cutinasa 2P a 37 °C en disolución Tris*

<b>Ensayo con Simple Concentración de Enzima a 37°C</b>		
Tiempo real (min)	Absorbancia 405 nm	Absorbancia 380 nm
0,00	1,287	1,063
2,72	1,199	0,983
4,77	1,196	0,983
7,38	1,171	0,956
9,92	1,180	0,964
12,47	1,156	0,949
14,75	1,175	0,964
20,08	1,162	0,953
29,48	1,149	0,940
60,08	1,154	0,948

*Tabla 28: Resultados absorbancia-tiempo ensayo con doble concentración de enzima cutinasa 2P a 37 °C en disolución Tris*

<b>Ensayo con Doble Concentración de Enzima a 37°C</b>		
Tiempo real (min)	Absorbancia 405 nm	Absorbancia 380 nm
0,00	1,238	1,014
6,25	1,169	0,956
7,72	1,170	0,957
10,25	1,179	0,963
12,67	1,156	0,945
15,08	1,182	0,961
19,67	1,175	0,956
30,08	1,168	0,953
60,02	1,166	0,952

## ANEXO IV DISOLUCIÓN PBS CON ENZIMA CUTINASA 2P

*Tabla 29: Resultados absorbancia-tiempo ensayo con simple concentración de enzima cutinasa 2P a 55°C en disolución PBS*

Ensayo con Simple Concentración enzima a 55°C		
Tiempo real (min)	Absorbancia 405 nm	Absorbancia 380 nm
0,00	1,991	1,666
2,45	1,922	1,581
5,25	1,976	1,630
7,83	1,978	1,640
10,25	1,956	1,618
13,32	1,945	1,618
15,17	1,958	1,611
20,03	1,948	1,604
29,58	1,944	1,611
60,45	1,904	1,556

*Tabla 30: Resultados absorbancia-tiempo ensayo con doble concentración de enzima cutinasa 2P a 55°C en disolución PBS*

Ensayo con Doble Concentración de enzima a 55°C		
Tiempo real (min)	Absorbancia 405 nm	Absorbancia 380 nm
0,00	1,935	1,594
2,40	1,959	1,614
4,67	1,990	1,644
7,33	1,984	1,627
10,25	1,963	1,620
12,23	1,982	1,627
14,75	1,963	1,628
19,83	1,942	1,596
29,50	1,970	1,616
58,00	1,948	1,589

*Tabla 31: Resultados absorbancia-tiempo ensayo con simple concentración de enzima cutinasa 2P a 37 °C en disolución PBS*

<b>Ensayo con Simple Concentración de Enzima a 37°C</b>		
Tiempo real (min)	Absorbancia 405 nm	Absorbancia 380 nm
0,00	2,004	1,606
2,72	1,924	1,547
4,77	1,990	1,610
7,38	1,951	1,576
9,92	1,956	1,589
12,47	1,993	1,617
14,75	2,015	1,625
20,08	1,972	1,592
29,48	1,961	1,596
60,08	1,961	1,583

*Tabla 32: Resultados absorbancia-tiempo ensayo con doble concentración de enzima cutinasa 2P a 37 °C en disolución PBS*

<b>Ensayo con Doble Concentración de Enzima a 37°C</b>		
Tiempo real (min)	Absorbancia 405 nm	Absorbancia 380 nm
0,00	1,950	1,580
2,67	1,922	1,553
6,25	1,936	1,557
7,72	1,938	1,557
10,25	1,938	1,546
12,67	1,918	1,534
15,08	1,922	1,536
19,67	1,871	1,510
30,08	1,931	1,552
60,02	1,925	1,553